



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIA LUÍSA DIAS

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS
RECEPTORES DE QUIMIOCINAS *CCR5* DELTA32 E *CCR2*-
V64I E DO NÍVEL PLASMÁTICO DE RANTES EM
INDIVÍDUOS OBESOS E NÃO-OBESOS**

FLÁVIA LUÍSA DIAS

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS
RECEPTORES DE QUIMIOKINAS *CCR5* DELTA32 E *CCR2*-
V64I E DO NÍVEL PLASMÁTICO DE RANTES EM
INDIVÍDUOS OBESOS E NÃO-OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Co-orientador: Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira..

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Dias, Flávia Luísa.

Análise dos polimorfismos genéticos dos receptores de quimiocinas CCR5 Delta32 e CCR2-V64I e do nível plasmático de RANTES em indivíduos obesos e não-obesos / Flávia Luísa Dias. - Londrina, 2016.

67 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Carlos Eduardo Coral Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Obesidade - Teses. 2. CCR5 - Teses. 3. Polimorfismo Genético - Teses. 4. RANTES - Teses. I. Watanabe, Maria Angelica Ehara. II. Oliveira, Carlos Eduardo Coral. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

FLÁVIA LUÍSA DIAS

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS RECEPTORES
DE QUIMIOCINAS CCR5 DELTA32 E CCR2-V64I E DO NÍVEL
PLASMÁTICO DE RANTES EM INDIVÍDUOS OBESOS E NÃO-
OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^ª. Dra. Maria Angelica Ehara
Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dra. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dra. Flávia Troncon Rosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

“ Se conseguimos ver mais longe hoje, foi por estar de pé sobre ombro de gigantes”

Isaac Newton

Agradeço primeiramente à **Deus**, o grande responsável por todas as conquistas da minha vida.

À minha orientadora, **Profª Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe**, por estes três anos em que estive em seu laboratório. Obrigada pelo acolhimento e por todos os ensinamentos. Sou muito grata pela amizade e confiança, e, principalmente, pela dedicação dada ao projeto proposto neste trabalho. Foi um honra ter como orientadora uma profissional exemplar, tão voltada ao crescimento intelectual de seus orientandos e ao cuidado de seus ‘filhos’ acadêmicos.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira**, pela grande dedicação à este projeto. Agradeço por todo o aprendizado que me proporcionou e pela amizade. Este trabalho não seria possível sem a sua colaboração e esforço.

Aos membros da banca examinadora, **Profª Dra. Roberta Losi Guembarovski**, **Profª Dra. Flávia Troncon Rosa** e **Profª Dra. Marla Karine Amarante**, pelas grandes contribuições à este trabalho.

À **UNIFIL Centro Universitário Filadélfia** e todos os funcionários que colaboraram prontamente na obtenção das amostras.

Ao colega de mestrado, **Diego Lima Petenuci**, pela colaboração nas coletas deste trabalho. Agradeço o seu esforço e dedicação. Aproveito para agradecer aos colegas de laboratório **Bruna Karina Banin Hirata** e **Glauco Akelington F. Vitiello** pelas inúmeras contribuições e por todos os momentos de amizade e companheirismo.

À grande família do laboratório, **Carolina Batista Ariza**, **Vânia Darc de Castro**, **Karen Brajão de Oliveira**, **Julie Massayo**, **Thiago Cezar Fujita**, **Patricia Midori Ozawa**, **Kleber Trujilo**, **Cintya Mayumi Ishibashi**, **Alberto Y. Sakagushi**, **Carlos Hiroji Hiroki**, **Felipe Campos de Almeida**, **Leticia Pacholak**, **Mayara Tiemi Enokida**, **Nathalia Tataki**,

Nathalia de Souza Pereira e Guilherme Martelossi Cebinelli, pela convivência nestes anos, repleta de discussões intelectuais e muitos momentos de descontração e alegria. Todos os momentos juntos estarão eternizados em minha memória e coração.

À grande amiga, **Jacqueline Fanti**, pelo apoio incondicional e por todos os momentos de amizade e carinho. A sua amizade é um dos grandes feitos do meu período de UEL. Muito obrigada. Aproveito para agradecer imensamente aos **colegas do laboratório de Parasitologia** pelo apoio ao final deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental** e todo o seu corpo docente pela oportunidade de aprendizado nestes dois anos.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À minha amada família, **Luís Fernando Pinto Dias, Inamar Luiza de Souza Dias, Guilherme Luís Dias, Ana Luísa Dias, Barbara Carvalho Lunardelli e Felipe Alcântara Rosa**, meus queridos avós **Geraldo e Inamar**, tios e primos das famílias **Souza, Negrão, Hildebrando, Gonçalves e Dias**, que foram o meu suporte e minha alavanca, agradeço pelo apoio e torcida em todos os momentos. Cada alegria e conquista desta jornada, compartilho com todos.

Ao meu namorado, **André Luiz Encinas Audibert**, por todo apoio e incentivo. Agradeço por me amparar nos obstáculos que tive e se alegrar comigo nas conquistas e vitórias. Aproveito para agradecer aos amigos **Caroline, Jair, Esther, Caio, João e Fernanda** pela torcida e pelos momentos de alegrias que me ajudaram a tornar essa jornada mais leve.

Aos amigos do **Movimento de Schoenstatt** e do grupo **Dom Bosco Jr.** pelas orações e torcida.

“Se seus sonhos estão nas nuvens, eles estão no lugar certo. Agora construa os alicerces.”

Shakespeare

DIAS, Flávia Luísa. **Análise de polimorfismos genéticos dos receptores de quimiocinas *CCR5*delta32 e *CCR2-V64I* e do nível plasmático de RANTES em indivíduos obesos e não-obesos.** 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A obesidade é definida como uma doença resultante de um desequilíbrio energético, onde o consumo calórico é maior que o gasto, que tem como consequência o acúmulo de ácidos graxos nas células do tecido adiposo, manifestado pelo aumento de peso corporal. O tecido adiposo é imunologicamente dinâmico e possui uma concentração de leucócitos residentes responsáveis pela homeostase. A mudança destas células para um perfil inflamatório tem sido implicada na patogênese da obesidade. De fato, a ativação de macrófagos no tecido adiposo é relacionada à desregulação metabólica, assim como a migração de monócitos derivados da medula óssea e sua diferenciação em macrófagos com fenótipo inflamatório no tecido adiposo obeso é direcionada por quimiocinas e seus receptores. A este respeito, a citocina quimiotática regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES) e os receptores 5 e 2 da família de quimiocinas CC (*CCR5* e *CCR2*) desempenham papéis importantes, controlando o recrutamento e a polarização de macrófagos no tecido adiposo, com subsequente desenvolvimento de resistência à insulina e obesidade. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o impacto dos polimorfismos *CCR2-V64I* (rs1799864) e *CCR5-Δ32* (rs333) e os níveis plasmáticos de RANTES em 90 indivíduos sobrepesos e obesos, em comparação com 90 indivíduos não-obesos. Os polimorfismos no *CCR5* e *CCR2* foram detectados a partir do DNA genômico do sangue total, utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP), respectivamente. As tabelas de contingência de 2 × 2 e análise de regressão múltipla foram utilizadas para determinar a associação dos genótipos com obesidade. ELISA para RANTES humana foi usada para determinar os níveis da quimiocina no plasma. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo buscando associar os polimorfismos *CCR2-V64I* e *CCR5-Δ32* e a suscetibilidade à obesidade na população brasileira. Como resultado, não houve diferenças significativas nas frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos do *CCR2* e *CCR5*, bem como em relação ao risco de obesidade ($p > 0,05$). No entanto, um aumento significativo da RANTES plasmático foi detectado no grupo de obesos comparados ao grupo controle ($p=0,0003$). Quando estratificados por grau de obesidade e comparados ao grupo controle, os níveis plasmáticos de RANTES nos obesos classe I ($n = 10$; $p = 0,002$) e obesos classe II ($n = 17$; $p = 0,004$) foram significativamente maiores, embora apenas uma tendência foi notada no grupo de obesos classe III ($n = 13$; $p = 0,07$). Foi demonstrando um aumento significativo no RANTES plasmático dos homens obesos comparadas aos homens não-obesos ($p=0,004$), porém este aumento não foi evidenciado entre as mulheres. Mulheres do grupo não-obeso apresentaram concentrações maiores de RANTES plasmático em relação aos homens do mesmo grupo ($p=0,02$), porém esta diferença entre gêneros não foi notada no grupo obeso. A constatação de que entre as pessoas não-obesas, o gênero tem um efeito significativo sobre a concentração RANTES é potencialmente importante e deve ser investigada. No entanto, os níveis plasmáticos de RANTES foram significativamente maiores no grupo obeso, independentemente do gênero, sugerindo uma relação desta quimiocina com o excesso de peso, demonstrando um possível alvo de intervenções terapêuticas na obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. *CCR5*. Macrófago. RANTES. Polimorfismo genético.

DIAS, Flávia Luísa. **Analysis of genetic polymorphisms of chemokine receptors *CCR5* Δ 32 and *CCR2*-V64I and plasma levels of RANTES in obese and non-obese individuals.** 2016. 67 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Obesity is defined as a disease resulting from an energy imbalance where caloric intake is greater than the expenditure, which results in the accumulation of fatty acids in the adipose cells, manifested by an increase in body weight. Adipose tissue is immunologically dynamic and has a concentration of resident leukocytes responsible for homeostasis. The shift of these cells to an inflammatory profile has been implicated in the pathogenesis of obesity. In fact, activation of macrophages in adipose tissue is related to metabolic dysregulation, as well as migration of bone marrow derived-monocytes and their differentiation into macrophages with inflammatory phenotype in the obese adipose tissue is directed by chemokines and their receptors. In this regard, the chemotactic cytokine regulated on activation, expressed and secreted by normal T cells (RANTES) and the 5 and 2 CC-chemokine family receptors (*CCR5* and *CCR2*) play important roles controlling recruiting and polarization of macrophages in adipose tissue, with subsequent development of insulin resistance and obesity. Therefore, the aim of this study was to investigate the impact of *CCR2*-V64I (rs1799864) and *CCR5*- Δ 32 (rs333) polymorphisms and plasma levels of RANTES in 90 overweight and obese subjects compared with 90 non-obese subjects. The *CCR5* and *CCR2* polymorphisms were detected from genomic DNA of whole blood using the conventional polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP), respectively. The 2×2 contingency tables and multiple regression analysis were used to determine the association of genotypes with obesity. ELISA for human RANTES was used to determine chemokine plasma levels. To our knowledge, this is the first study looking for an association of *CCR2*-V64I and *CCR5*- Δ 32 polymorphisms and susceptibility to obesity in the Brazilian population. As a result, there were no significant differences in genotypic and allelic frequencies of *CCR2* and *CCR5* polymorphisms, as well as in relation to the risk of obesity ($p > 0.05$). However, a significant increase in plasma RANTES was detected in the obese group compared to the control group ($p = 0.0003$). When stratified by grade of obesity and compared to the control group, the plasma RANTES levels in class I obese ($n = 10$; $p = 0.002$) and class II obese ($n = 17$; $p = 0.004$) were significantly higher, although only a tendency was noted in the class III obese group ($n = 13$; $p = 0.07$). It was demonstrated a significant increase of plasma RANTES in obese men compared to non-obese men ($p = 0.004$), but this increase was not evidenced among women. Women in the control group present higher plasma RANTES concentrations in relation to men of the same group ($p = 0.02$), although this difference between gender was not noticeable in the obese group. The finding that among non-obese people, gender has a significant effect on RANTES concentration is potentially important and should be investigated. However, plasma levels of RANTES were significantly higher in the obese group, regardless of gender, suggesting a relationship with this chemokine and overweight, demonstrating a possible target for therapeutic interventions in obesity.

Keywords: Obesity. *CCR5*. Macrophage. RANTES. Genetic polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Prevalência de excesso de peso e obesidade na população brasileira com 20 anos ou mais, por sexo. Dados evolutivos dos últimos 40 anos.....	14
Figura 2 – Classificação do IMC segundo a OMS.....	15
Figura 3 – Combinação das medidas de circunferência abdominal e IMC para avaliação de obesidade e riscos de comorbidades (diabetes e doenças cardiovasculares)	15
Figura 4 – Interface imune da inflamação do tecido adiposo	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta 32$	Delta trinta e dois
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Adenina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BCC	Balança de Composição Corporal
CCL2	Quimiocina 2 da família CC
CCL3	Quimiocina 3 da família CC
CCL4	Quimiocina 4 da família CC
CCL5	Quimiocina 5 da família CC
CCL7	Quimiocina 7 da família CC
CCL8	Quimiocina 8 da família CC
CCL13	Quimiocina 13 da família CC
CCR	Receptor da família de quimiocinas CC
CCR1	Receptor 1 da família de quimiocinas CC
CCR2	Receptor 2 da família de quimiocinas CC
CCR2A	Receptor 2 isoforma A da família de quimiocinas CC
CCR2B	Receptor 2 isoforma B da família de quimiocinas CC
CCR3	Receptor 3 da família de quimiocinas CC
CCR5	Receptor 5 da família de quimiocinas CC
CCR6	Receptor 6 da família de quimiocinas CC
CCR9	Receptor 9 da família de quimiocinas CC
CD3	Grupo de diferenciação 3
CD68	Grupo de diferenciação 68
CD103	Grupo de diferenciação 103
CEPS	Centro de Educação para a Saúde
CR	Receptor da família de quimiocinas C
CX3CR	Receptor da família de quimiocinas CX3C
CX3CR1	Receptor 1 da família de quimiocinas CX3C
CXCR	Receptor da família de quimiocinas CXC
CXCR4	Receptor 4 da família de quimiocinas CXC
CXCR5	Receptor 5 da família de quimiocinas CXC

CXCR6	Receptor 6 da família de quimiocinas CXC
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeos Trifosfato
E	Estatura
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
G	Guanina
GC	Gordura Corporal
GPCR	Domínio Transmembranar Acoplado a Proteína G
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana subtipo 1
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
ILC2	Célula Linfóide Inata do Tipo 2
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS-1	Substrato 1 do Receptor de Insulina
kDA	Quilodalton
Kg	Quilograma
Kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
MAPK	Proteína kinase ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MgCl ₂	Miligrama de cloro
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos 1
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta
mM	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Célula Assassina Natural
NKT	Célula Assassina Natural Invariante
nm	Nanometro
OMS (WHO)	Organização Mundial da Saúde

P	Peso
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Par de Base
PI3K	Fosfatidil Inositol 3-Fosfato Quinase
PLC- β	Fosfolipase C β
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
Th1	Célula T auxiliar 1
Th2	Célula T auxiliar 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T regulatória
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
wt	Selvagem

SUMÁRIO

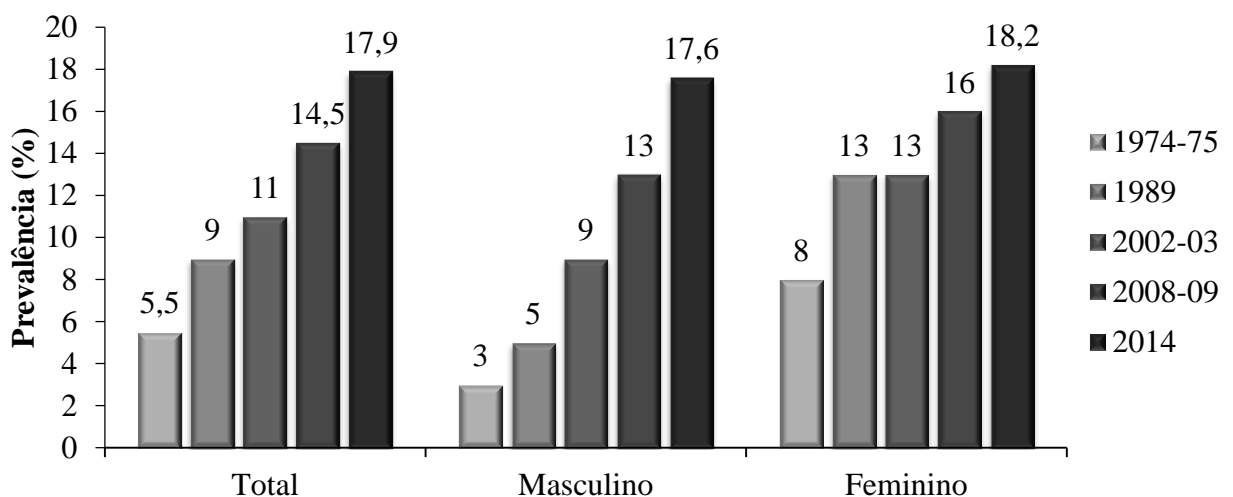
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBESIDADE E INFLAMAÇÃO	15
1.2	QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES	17
1.3	OBESIDADE, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES	20
1.4	POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR 5 DE QUIMIOCINA C-C (CCR5)	22
1.5	POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR 2 DE QUIMIOCINA C-C (CCR2)	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	26
3.2	VOLUNTÁRIOS	26
3.3	AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	27
3.4	DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR CCR2-V64I (rs1799864)	28
3.4.1	Tratamento Enzimático do Produto de PCR – Polimorfismo do CCR2.....	29
3.5	DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR CCR5 (rs333).....	30
3.6	QUANTIFICAÇÃO DA CITOCINA CCL5 POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	31
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
4	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	32
5	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICES	59
	APÊNDICE A – Parecer Consubstanciado do CEP	60
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	63
	ANEXO	65
	ANEXO A – Formulário Anamnese – Projeto Obesidade	66

1 INTRODUÇÃO

Caracterizada como uma epidemia mundial, a obesidade é uma doença de prevalência crescente, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A maioria da população mundial hoje vive em países onde a mortalidade relacionada à obesidade é maior que a relacionada à desnutrição. Os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 contabilizam mais de 1.9 bilhões de adultos acima do peso ideal para sua altura, sexo e idade, sendo cerca de 600 milhões com diagnóstico de obesidade (WHO, 2015).

No Brasil, a prevalência de excesso de peso e obesidade também aumentou consideravelmente nos últimos anos. A figura 1 apresenta a evolução desses índices ao longo dos quatro inquéritos nacionais: “Estudo Nacional de Despesa Familiar 1975-1975”, “Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição 1989” e “Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 e 2008-2009” (BRASIL, 2010). Os últimos dados coletados em 2014 pelo Ministério da Saúde no sistema Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) indicam que 17,9% da população adulta entrevistada é obesa, sendo os maiores índices verificados em adultos do sexo feminino (18,2%) (BRASIL, 2014).

Figura 1 – Prevalência de obesidade na população brasileira com 20 anos ou mais, por sexo. Dados evolutivos dos últimos 40 anos.



Fonte: Adaptado de BRASIL (2010) e BRASIL (2014).

A obesidade é definida como uma doença resultante de um desequilíbrio energético, onde o consumo calórico é maior que o gasto, que tem como consequência o

acúmulo de ácidos graxos nas células do tecido adiposo, manifestado pelo aumento de peso corporal (HURT et al., 2014). Devido à esta manifestação, o reconhecimento do sobrepeso e da obesidade não demanda grandes instrumentos, porém o diagnóstico correto requer a identificação de níveis de risco que necessitam de formas de quantificação. As medidas antropométricas que aferem a massa corporal e a distribuição de gordura são as formas mais utilizadas atualmente na avaliação clínica. O Índice de Massa Corporal (IMC), um dos indicadores mais importantes no diagnóstico de sobrepeso e obesidade, é quantificado a partir das medidas de peso corporal e estatura. A OMS classifica este índice (Figura 2) baseando-se em padrões internacionais (ABESO, 2009)

Figura 2 – Classificação do IMC segundo a OMS.

Classificação	IMC (kg/m ²)	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5-24,9	Médio
Sobrepeso	≥ 25	-
Pré-obeso	25,0 a 29,9	Aumentado
Obeso I	30,0 a 34,9	Moderado
Obeso II	35,0 a 39,9	Grave
Obeso III	≥ 40,0	Muito grave

Fonte: ABESO (2009).

A combinação do IMC com outras medidas antropométricas permite um diagnóstico mais preciso por associar o peso com a massa de gordura corporal e sua distribuição. A bioimpedância é uma ferramenta que tem como finalidade determinar o fracionamento de composição corporal a partir da condução de corrente elétrica pelo corpo, permitindo quantificar a massa muscular e a massa adiposa do indivíduo (EICKEMBERG et al., 2011). Sabe-se que a gordura visceral (intra-abdominal) é um fator de risco potencial para doenças, por isso a OMS classifica a medida de circunferência abdominal e sua relação com riscos de comorbidades, combinando esta medida com o IMC (Figura 3) (ABESO, 2009).

Figura 3 – Combinação das medidas de circunferência abdominal e IMC para avaliação de obesidade e riscos de comorbidades (diabetes e doenças cardiovasculares).

Risco de complicações metabólicas	IMC (kg/m ²)	Circunferência abdominal (cm)	
		Homem: 94-102	102+
		Mulher: 80-88	88+
Baixo peso	< 18,5	-	-
Peso saudável	18,5-24,9	-	Aumentado
Sobrepeso	25-29,9	Aumentado	Alto
Obesidade	≥ 30	Alto	Muito alto

Fonte: ABESO (2009).

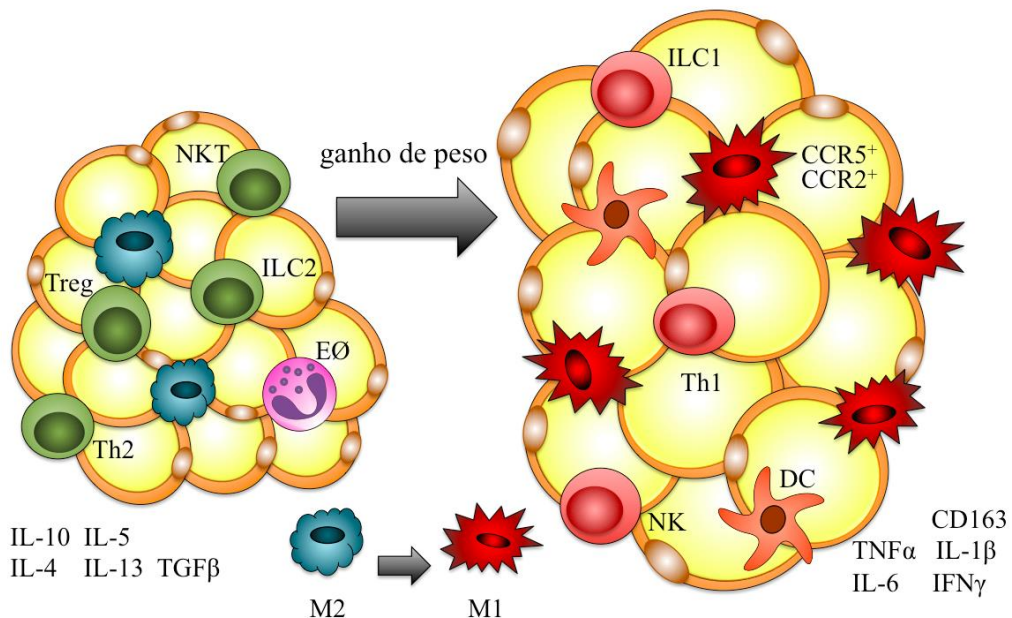
Os fatores associados ao desenvolvimento da obesidade são diversos e incluem componentes genéticos (Síndrome de Prader-Willi) e hereditários (histórico familiar), comportamentais (hábitos alimentares, sedentarismo, tabagismo, etilismo), socioculturais (renda familiar, nível de escolaridade, estado civil) e psicossociais (NIH, 1998). Dentre os aspectos comportamentais, o consumo excessivo de alimentos, em especial de gorduras e de açúcares simples, tem papel fundamental no desenvolvimento desta doença (SPARKS et al., 2005; ALLER et al., 2011). A obesidade está envolvida em outras doenças metabólicas, como diabetes, hipertensão arterial, dislipidemias, esteatose hepática, aterosclerose, bem como problemas respiratórios, osteoartrite, doenças neurodegenerativas e câncer. Este envolvimento está fortemente relacionado à um processo de inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, 2006; ALAM; NG; LARBI, 2012).

1.1 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

O tecido adiposo é um órgão composto por adipócitos e células do sistema imune, com diferentes funções, sendo a principal delas o armazenamento energético (HAUSMAN et al., 2001). Este tecido é imunologicamente dinâmico e possui uma concentração de leucócitos residentes. Em seu estado normal, estas populações incluem linfócitos T auxiliares 2 (Th2), linfócitos T-regulatórios (Treg), células linfóides inatas do tipo 2 (ILC-2), células T invariantes natural killer (NKT), eosinófilos e macrófagos M2 (fenótipo associado com resolução da inflamação e remodelamento tecidual). Estas células são responsáveis pela manutenção de um estado anti-inflamatório, pela produção de citocinas como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento e transformação beta (TGF-β), que regulam a homeostase do local (SCHIPPER et al., 2012; SHU; BENOIST; MATHIS, 2012; LEE; LEE, 2014; CASTOLDI et al., 2015).

Durante o balanço energético positivo, os adipócitos sofrem hiperplasia e hipertrofia, estocando o excesso de energia em forma de triglicérides. Este crescimento descontrolado das células, associado à hipóxia e aumento do estresse oxidativo local, provoca uma alteração do microambiente, favorecendo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (SUN et al., 2012). Por meio de complexos celulares enzimáticos, esses estímulos promovem a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteínas kinase ativadas por mitógenos (MAPK) (BAEUERLE; HENKEL, 1994; GHOSH; MAY; KOPP, 1998; SANTANGELO et al., 2007) que atuam na regulação da síntese e da sinalização intracelular de mediadores inflamatórios. Esses fatores de transcrição se ligam a regiões promotoras de genes que codificam elementos da resposta imune e promovem a liberação de quimiocinas, como a regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES), promovendo uma diferenciação de monócitos para macrófagos M1 (fenótipo associado com perfil pró-inflamatório), assim como um recrutamento e ativação de células natural killer (NK), neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T helper 1 (Th1) (Figura 4) (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; KAMINSKA, 2005; CASTOLDI et al., 2015).

Figura 4 – Interface imune da inflamação do tecido adiposo.



Fonte: o próprio autor.

A resposta inflamatória na obesidade tem sido associada à resistência à insulina no tecido adiposo e no fígado. Os mediadores inflamatórios ativam complexos enzimáticos que promovem a fosforilação de resíduos de serina no substrato-1 do receptor de

insulina (IRS-1), ao invés de resíduos de tirosina, e inibem a cascata de sinalização da insulina (FEINSTEIN et al., 1993; CAI et al., 2005). Apesar de os músculos periféricos não serem fonte primordial de produtos inflamatórios, citocinas séricas como a IL-6, TNF α e a interleucina 1 (IL-1) também podem induzir resistência à insulina nestes tecidos (STEINBERG et al., 2006).

Diferente de uma resposta aguda, o estado inflamatório induzido pela obesidade ocorre gradual e moderadamente e, secundário ao desequilíbrio resultante, parece impedir uma resposta anti-inflamatória efetiva, o que o torna crônico (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Dados recentes indicam que o tecido adiposo de pessoas obesas está infiltrado por macrófagos M1. Interessantemente, alguns estudos demonstraram que a perda de peso está relacionada com a redução de macrófagos M1 no tecido adiposo e com a melhora do perfil inflamatório (ARON-WISNEWSKY et al., 2009).

A alteração para o estado inflamatório, devido à polarização de macrófagos do fenótipo M2 para M1 é alvo de importantes estudos e diversos deles apontam esta como uma das principais causas da cronicidade da inflamação no tecido adiposo obeso. Além desta polarização, os mecanismos responsáveis pelo recrutamento de monócitos que serão diretamente diferenciados em macrófagos M1 e de outras células de perfil inflamatório para o tecido adiposo são intimamente relacionados com a liberação de citocinas quimiotáticas e a expressão de seus receptores (DECLEVES et al., 2011).

1.2 QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES

As quimiocinas são membros da superfamília das citocinas quimiotáticas, inicialmente caracterizadas devido a sua associação com resposta inflamatória, por estimular a quimiotaxia de leucócitos durante a inflamação (THELEN, 2001; DOWSLAND et al., 2003). Contudo, sabe-se que as quimiocinas desempenham diversas outras funções, tais como: homeostase, proliferação celular, hematopoiese, interações vírus/célula, angiogênese e neovascularização (BAGGIOLINI; LOETSCHER, 2000; BELPERIO et al., 2000; HWANG et al., 2005; STRIETER et al., 2005; CHEN et al., 2006).

Mais de cinquenta quimiocinas estão descritas e possuem estruturas terciárias similares que consistem em um terminal amino (que atua como domínio de sinalização), seguido de uma longa alça (que contém importantes determinantes de ligação), três folhas β e uma α hélice C-terminal (MURDOCH et al., 2000; ROSSI; ZLOTNIK, 2000; ALLEN; CROWN; HANDEL, 2007). A maioria das quimiocinas tem quatro cisteínas

conservadas e de acordo com o número de aminoácidos existentes entre os dois primeiros resíduos de cisteína da extremidade N-terminal, as quimiocinas são classificadas em quatro subfamílias: CXC, CC, CX3C e C, onde C representa cisteína e X ou X3 representa um ou três aminoácidos (ROSSI; ZLOTNIK, 2000; MELLADO et al., 2001; ALLEN; CROWN; HANDEL, 2007).

As quimiocinas que possuem duas cisteínas adjacentes, separadas por um aminoácido (CXC) são denominadas alfa, enquanto as que possuem duas cisteínas adjacentes (CC) são denominadas beta. As quimiocinas alfa atraem neutrófilos e são produzidas por células mononucleares ativadas, e as beta atraem macrófagos e monócitos, sendo produzidas por células T ativadas. No ano 2000, um sistema de nomenclatura foi introduzido no qual cada ligante e receptor foi identificado pela subfamília recebendo um número identificador (MURPHY et al., 2000).

A quimiocina RANTES, também denominada CCL5, é uma proteína de 68 aminoácidos que induz a migração de leucócitos, mediando principalmente o tráfego de linfócitos T e monócitos. Esta quimiocina também exerce função sobre outras células do sistema imune como basófilos, eosinófilos, células NK, mastócitos e células dendríticas (APPAY; ROWLAND-JONES, 2001). Apesar dos benefícios da atividade quimiotática da RANTES, permitindo recrutamento de células imunes às áreas de infecções, a produção aumentada de RANTES está associada com vários efeitos negativos e relacionada com diversas doenças, tais como a aterosclerose, artrite reumatóide, doenças hepáticas e diabetes (BATURCAM et al., 2014).

As quimiocinas exercem seus efeitos através da interação com receptores de sete domínios transmembranares acoplados a proteína G (GPCR) presentes na membrana de células alvo. Foram descritos pelo menos 20 receptores de quimiocinas e assim como no caso dos seus ligantes, os receptores também podem ser agrupados em quatro famílias principais: CR, CCR, CXCR e CX3CR, que interagem com quimiocinas C, CC, CXC e CX3C, respectivamente (MELLADO et al., 2001; ZHU et al., 2012). Alguns receptores, como o CCR6, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6 e CX3CR1 são específicos, ligando-se apenas a uma só quimiocina. Porém, diferentes quimiocinas podem interagir com o mesmo receptor e um único ligante pode estabelecer ligações com diferentes receptores. Estas interações ocorrem com afinidade e atividade funcional semelhantes, o que sugere um elevado grau de redundância (BALKWILL, 2004; GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011).

Todos estes receptores são compostos de aproximadamente 350 aminoácidos e com peso molecular próximo de 40kDa. O domínio extracelular consiste de uma extremidade N-terminal e três alças extracelulares que atuam na ligação à quimiocina. A região intracelular é composta de três alças e a extremidade C-terminal, que intervêm na transdução de sinal (MURPHY, 1994). A ligação da quimiocina ao respectivo receptor muda a conformação do mesmo e leva à dissociação das subunidades da proteína G. Estas subunidades por sua vez ativam uma variedade de vias de sinalização que envolve componentes clássicos como a fosfolipase C beta (PLC- β), o fosfatidil inositol 3-fosfato quinase (PI3K) e a cascata da MAPK. Algumas destas vias podem ativar moléculas efetoras envolvidas no rearranjo do citoesqueleto, implicando na adesão e migração celular (MELLADO et al., 2001; FRIEDL; WOLF, 2003; SOLDEVILA; GARCÍA-ZEPEDA, 2007)

O CCR5 pertence a superfamília de receptores triméricos transmembrana acoplados à proteína G ligadora do nucleotídeo guanina, que compreende a maior família de proteínas do corpo humano (RAPORT et al., 1996). Ele exerce suas atividades via proteína G e interage com as quimiocinas RANTES, proteínas 1 α inflamatória de macrófagos (MIP-1 α)/CCL3 e MIP-1 β /CCL4 (SAMSON et al., 1996) e está envolvido na quimiotaxia de determinados leucócitos para os sítios de inflamação (LIU et al., 1996; MARTINSON et al., 1997). Este receptor é expresso na superfície celular de linfócitos T com fenótipo de memória ou efetor e Tregs, monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas (BLANPAIN et al., 2002; CHANG et al., 2012)

Este receptor contém 352 aminoácidos com uma massa molecular de 40,6 kDa e compartilha 71% de identidade sequencial com o CCR2, onde a maioria das diferenças estão localizadas sobre os domínios extracelulares e citoplasmáticos (COMBADIÈRE; AHUJA; MURPHY, 1995; RAPORT et al., 1996; SAMSON et al., 1996). O CCR2 é um receptor de quimiocina CC que possui afinidade por CCL2, CCL7, CCL8 e CCL13 (LUSTER, 1998). Este receptor é expresso principalmente por células do sistema imune, incluindo os monócitos/macrófagos, basófilos, mastócitos, linfócitos T, células NK e células dendríticas (CHARO et al., 1994; POLENTARUTTI et al., 1997; SANDERS et al., 2000)

Existem duas isoformas de CCR2, o CCR2 tipo A (CCR2A) e tipo B (CCR2B), que diferem somente em sua região C-terminal, sugerindo que são derivados de um único gene, via “splicing” alternativo. Embora esta diferença entre as isoformas seja pequena, ela é suficiente para causar uma drástica alteração na sua localização nas células. Enquanto o CCR2B é expresso na superfície celular, o CCR2A é detectado predominantemente no citoplasma (WONG et al., 1997). Todavia, quando a isoforma CCR2A é expressa na

superfície celular, interage com a quimiocina CCL2 e responde de maneira similar à isoforma CCR2B (SANDERS et al., 2000).

As quimiocinas, assim como seus receptores, são reguladas e expressas de forma diferente em células e tecidos, podendo desempenhar diferentes funções em condições fisiológicas e nas doenças (OTA, 2013). Recentemente, muitos esforços têm sido empenhados nos estudos relacionando obesidade, inflamação, quimiocinas e seus receptores.

1.3 OBESIDADE, QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES

O tecido adiposo em obesos é caracterizado tanto pelo recrutamento de macrófagos M1 quanto pela ativação de eventos pró-inflamatório a partir dos adipócitos ou pré-adipócitos que começam a secretar quimiocinas como RANTES e CCL2. Posteriormente, macrófagos CCR2⁺ e/ou CCR5⁺ se acumulam, presumivelmente para manter a inflamação com macrófagos M1 ativados classicamente no tecido adiposo obeso. Monócitos saem da medula óssea de um modo dependente de CCR2 e são recrutados para os tecidos inflamados (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

A correlação de certas quimiocinas CC e a expressão de seus receptores com parâmetros metabólicos em pacientes obesos diferenciam-se comparada com o tecido adiposo normal. Estudos demonstram que o CCL5 e CCR1 são associados com aumento da concentração de ácidos graxos livres no plasma e geração da resistência à insulina em indivíduos obesos (HUBER et al., 2008). Wu et al. (2007) demonstram que o CCR5, principal receptor de RANTES, e o CCR3 foram induzidos no tecido adiposo de roedores e humanos obesos. No mesmo estudo, foi relatado um aumento de células T no tecido adiposo de obesos dependente e associado ao aumento da expressão de RANTES, bem como seu receptor CCR5.

Apesar do papel e do mecanismo do RANTES no tecido adiposo ainda não ser completamente compreendido, esta quimiocina é envolvida no recrutamento de células mononucleares para os locais de inflamação pela ligação à receptores CCR1, CCR3 e CCR5. Na obesidade, tem sido demonstrado um aumento de macrófagos e células T no tecido adiposo (BATURCAM et al., 2014). Madani et al. (2009) demonstraram que a expressão desta quimiocina no tecido adiposo, em conjunto com o seu receptor (CCR5), está correlacionada com a expressão de marcador de macrófagos CD68. E Wu et al. (2007) mostraram que os níveis de mRNA RANTES estão altamente correlacionados com o marcador de células T CD3 no tecido adiposo visceral humano. Os dados relatados por

Baturcam et al. (2014) e Lubrano et al. (2015) demonstram um aumento significativo nos níveis de RANTES circulante em indivíduos obesos comparados ao grupo controle.

O eixo CCL2/CCR2 desempenha um papel central na resistência à insulina induzida pela obesidade. A interação do CCL2 com seu receptor CCR2 é considerada crucial na resistência à insulina induzida pela obesidade. Tem sido demonstrado em sistema murino, que o eixo MCP-1/CCR2 é de grande importância para a promoção de recrutamento de macrófagos do tecido adiposo. No entanto há relatos sugerindo que o CCL2 não é crítico na obesidade e recrutamento de macrófagos (INOUYE et al., 2007; KIRK et al., 2008).

Em um estudo recente sobre diabetes, Kitade et al. (2012) identificaram e caracterizaram um papel crítico para o CCR5 na regulação do tecido adiposo e resposta inflamatória à obesidade e ao desenvolvimento de resistência à insulina. Em primeiro lugar, a expressão de CCR5 e os seus ligantes é aumentada significativamente e é igual à de CCR2 e dos seus ligantes no tecido adiposo de camundongos obesos, particularmente na fração de macrófagos. Em segundo, a análise por citometria de fluxo demonstrou claramente um aumento de macrófagos CCR5⁺ no tecido adiposo em resposta a uma dieta rica em gordura. Finalmente, e mais importante, camundongos CCR5^{-/-} são protegidos contra a resistência à insulina, a esteatose hepática e a diabetes induzida por alimentação rica de gorduras.

CCR5 também pode regular a migração de monócitos para o tecido adiposo. Uma vez que estas células, diferenciadas em macrófagos se encontram presentes e ativadas no tecido, juntamente com os adipócitos e outros tipos celulares, podem perpetuar um ciclo vicioso de recrutamento de macrófagos, de produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , com posterior comprometimento da função dos adipócitos. Portanto, o CCR5, de forma independente a partir de e/ou cooperativamente com CCR2, desempenha um papel fundamental na indução e manutenção da inflamação induzida na obesidade (OTA, 2013).

A severidade da inflamação no tecido adiposo varia consideravelmente entre indivíduos que são afetados pelo mesmo processo patológico. Diversos determinantes cooperam para isto e entre eles, as quimiocinas desempenham papel importante. A atividade inflamatória das quimiocinas acontece a partir da interação com seus receptores, portanto alterações nestas moléculas, como a presença de variantes genéticas polimórficas, influenciam diretamente no potencial de ação da quimiocina (ROVIN; LU; SAXENA, 1999).

1.4 POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR 5 DE QUIMIOCINA C-C (CCR5)

Muitas vezes, alterações na sequência de muitos genes podem acontecer em mais de 1% da população, sendo denominados polimorfismos genéticos. Estas alterações podem, de certo modo, influenciar na expressão de genes acarretando em modificações no sistema biológico e na patogênese de doenças (SCHAFER; HAWKINS, 1998).

Assim como o CCR2, o gene CCR5 está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21) (RAPORT et al., 1996; SAMSON et al., 1996). O CCR5 ganhou destaque ao ser identificado como um co-receptor essencial para a entrada celular da cepa R5 do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (ALKHATIB et al., 1996; DENG et al., 1996; DRAGIC et al., 1996; FENG et al., 1996). O papel predominante do CCR5 para a entrada celular e replicação viral é ilustrada pela resistência ao HIV apresentada em indivíduos que possuíam uma deleção de 32 pares de bases (pb) no gene deste receptor (LIU et al., 1996; SAMSON et al., 1996; REICHE et al., 2008).

A deleção de 32-pb (delta CCR5 ou CCR5- Δ 32), também denominado, rs 333, ocorre em domínios repetidos no gene *CCR5* e resulta na perda de três dos sete domínios transmembranares, duas das três alças externas e o domínio de sinalização intracelular, além de uma mudança no quadro de leitura que produz uma proteína truncada, a qual não é expressa sobre a superfície celular (MCNICHOLL et al., 1997). Tem sido encontrada uma considerável variação na distribuição global do CCR5- Δ 32. Estudos têm mostrado uma alta frequência do alelo mutado Δ 32 (aproximadamente 10%) em caucasianos (GHARAGOZLOO et al., 2005).

Além de resistência ao HIV, a variante polimórfica CCR5- Δ 32 também pode conferir proteção contra artrite reumatoide (PRAHALAD et al., 2006), porém, este polimorfismo genético tem sido associado ao aumento da susceptibilidade em diversas doenças como o lúpus eritematoso sistêmico (CARVALHO et al., 2014), esclerose múltipla (SHAHBAZI et al., 2009; MOLLER et al., 2014), diabetes (SONG; KIM; LEE, 2014), hiperplasia prostática e câncer de próstata (KUCUKGERGIN et al., 2012; ZAMBRA et al., 2013).

Diversas pesquisas tem investigado a relação entre este polimorfismo com doenças cardiovasculares, relatando resultados conflitantes. O estudo realizado por Afzal et al. (2008) demonstrou uma redução dos riscos de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral isquêmico e doenças arteriais atribuídas a presença do alelo polimórfico. Opostamente à este estudo, Karaali et al. (2010) reportaram uma frequência do alelo CCR5-

$\Delta 32$ significativamente maior em pacientes que sofreram infarto do miocárdio em comparação com controles, assim como Ghilardi et al. (2008) encontraram um aumento no risco de aneurisma aórtico nos portadores do alelo mutado.

Ainda não existem estudos relacionando este polimorfismo com obesidade ou síndrome metabólica, porém alguns pesquisadores tem buscado relacionar este polimorfismo com resistência à insulina e diabetes. No estudo de Kalev et al. (2003) não houve diferença na frequência do CCR5- $\Delta 32$ nos indivíduos diabéticos e controles, mas o polimorfismo estava associado com o curso clínico da diabetes de tipo 1 e com o início precoce da doença. Gambelunghe et al. (2003) não encontrou diferença significativa na frequência do alelo CCR5- $\Delta 32$ entre pacientes diabéticos e controles.

1.5 POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR 2 DE QUIMIOCINA C-C (CCR2)

O gene *CCR2* está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21) e o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) mais estudado neste gene consiste na troca de uma guanina por uma adenina no éxon 1, na posição 190 do gene. Esta troca resulta na substituição do aminoácido valina por uma isoleucina na posição 64 da proteína CCR2 recebendo a denotação CCR2-V64I (rs1799864) (SMITH et al., 1997; KOSTRIKIS et al., 1998).

Segundo Nakayama et al. (2004) o nível de expressão na superfície celular da isoforma CCR2A mutada é significativamente maior do que o do *CCR2* sem a mutação. No entanto, esta substituição de valina por isoleucina não afeta os níveis de expressão da isoforma CCR2B. Além disso, a substituição 64I aumenta a meia vida do CCR2A nas células. Em um ensaio de imunoprecipitação, estes autores demonstraram que o CCR2A co-precipitou com formas imaturas de CCR5, sugerindo que o CCR2A pode se ligar ao CCR5 no citoplasma e diminuir a sua expressão na superfície celular.

O polimorfismo CCR2-V64I tem sido associado com maior suscetibilidade à aterosclerose, sarcoidose, esclerose múltipla e atraso na progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em indivíduos infectados pelo HIV-1 (LEE et al., 1998; HIZAWA et al., 1999; MIYAGISHI et al., 2003; PETRKOVA et al., 2003; ORTLEPP et al., 2005; SHRESTHA et al., 2006). Além disso, Zafiropoulos et al. (2004) em um estudo com mulheres com câncer de mama de uma população grega encontraram que o alelo mutado deste polimorfismo pode também pode conferir proteção contra o desenvolvimento desta doença.

Estudos tem buscado associar o polimorfismo CCR2-V64I com doenças cardiovasculares. Valdes et al. (2002) e Szalai et al. (2001) relataram que o alelo variante V64I foi associado com a diminuição da calcificação da artéria coronária e risco reduzido de doenças coronarianas graves, respectivamente. Por outro lado, Ortlepp et al. (2005) encontraram uma associação com o aumento do risco de infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, assim como o estudo de Petrkoval et al. (2003), em que o alelo V64I foi significativamente associado com infarto do miocárdio.

Assim como o polimorfismo CCR5-Δ32, a associação entre a obesidade e o polimorfismo CCR2-V64I não foi alvo de investigação de estudos na população sul-americana, porém Guzman-Ornelas et al. (2016) encontraram uma associação entre este polimorfismo, o excesso de peso e resistência a insulina na população mexicana. Gambelunghe et al. (2004) buscaram associar este SNP na população europeia, porém não encontraram diferença na frequência alélica entre pacientes diabéticos e controles.

Estudos já elucidaram a importância do sistema imune no tecido adiposo e neste aspecto, o processo inflamatório tem papel chave na obesidade e as células envolvidas são direcionadas pelas quimiocinas e seus receptores. Considerando o envolvimento da quimiocina RANTES e os receptores CCR5 e CCR2 na migração de células imunes no tecido adiposo e o impacto de polimorfismos genéticos nas propriedades destas proteínas, torna-se relevante o estudo da influência destas moléculas na obesidade e em suas consequências.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os polimorfismos genéticos dos receptores de quimiocinas CCR5 Delta32 e CCR2-V64I e o nível plasmático de RANTES em indivíduos obesos e não-obesos

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e coletar amostras de sangue periférico de indivíduos obesos e não-obesos;
- Aferir o estado nutricional e caracterizar a composição corporal a partir do IMC e porcentagem de gordura corporal (GC) dos indivíduos envolvidos na pesquisa;
- Avaliar a distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos rs333 do gene *CCR5* e rs1799864 do gene *CCR2* entre obesos e não obesos;
- Analisar a associação do risco-relativo entre os parâmetros nutricionais, dados clínicos e os genótipos dos polimorfismos estudados;
- Quantificar os níveis plasmáticos de RANTES em indivíduos obesos e não obesos;
- Verificar a associação entre a expressão de RANTES plasmático e as classes de obesidade, gênero e presença de comorbidades.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina – UEL e colocado em prática somente mediante declaração de consentimento assinada pelos participantes, após explicação detalhada do seu desenvolvimento (TCLE – Apêndice A).

3.2 VOLUNTÁRIOS

Este estudo caracterizou-se como estudo caso-controle e analítico transversal. Foi desenvolvido no Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismo de DNA do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina (Documento de Autorização do Laboratório - Apêndice C) em parceria com o ambulatório de Nutrição da Clínica de Educação para Saúde (CEPS) do Centro Universitário Filadélfia.

Foram selecionados para o estudo 90 voluntários, de ambos os sexos com diagnóstico de sobrepeso e obesidade. A seleção dos participantes foi realizada a partir da classificação pelo Índice de Massa Corporal (IMC) e porcentagem de gordura, sendo selecionados indivíduos IMC acima de 26 kg/m² (WHO, 1995) e porcentagem de gordura acima da média estipulada pelo protocolo de Jackson e Pollock (1978) e Jackson, Pollock e Ward (1980).

Para o grupo controle, foram selecionados 90 voluntários, de ambos os sexos, com diagnóstico de eutrofia e livres de doenças metabólicas. A seleção dos participantes foi realizada a partir da classificação pelo Índice de Massa Corporal (IMC) e porcentagem de gordura, sendo selecionados indivíduos com IMC entre 18,5 e 25,9 kg/m² (WHO, 1995), porcentagem de gordura dentro da média para idade e sexo de acordo com o protocolo de Jackson e Pollock (1978) e Jackson, Pollock e Ward (1980), e livres de comorbidades associadas à obesidade. Indivíduos que não atenderam estes critérios foram excluídos deste grupo.

3.3 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

A avaliação nutricional foi realizada por meio de avaliação antropométrica e quantificação da porcentagem de gordura corporal. A avaliação antropométrica foi realizada por meio de medidas de peso (P), estatura (E), Índice de Massa Corporal (IMC), e a quantificação da porcentagem de gordura corporal foram estimadas pelo método de bioimpedância elétrica pela Balança de Composição Corporal (BCC) (WHO, 1995).

a) Peso (P): a pesagem (em Kg) dos indivíduos do grupo caso foi realizada em balança eletrônica Filizola® (São Paulo, SP – Brasil), com capacidade para 300 Kg e precisão de 0,2 Kg. Os indivíduos do grupo controle foram pesados (em Kg) em balança eletrônica Wiso® (São José, SP – Brasil) com capacidade para 150 Kg e precisão de 0,1 Kg.

b) Estatura (E): a medida da estatura foi feita com os indivíduos em posição ereta, cabeça em plano vertical, descalços, com pés e calcanhares juntos e o peso distribuído igualmente sobre os mesmos, com calcanhares apoiados na haste graduada, inextensível, a qual fornece o valor em metros.

c) Circunferência Abdominal: a medida da circunferência abdominal do grupo caso foi realizada com fita antropométrica na região abdominal à altura do umbigo, identificada lateralmente entre a crista ilíaca e a porção mais baixa da caixa torácica.

d) Índice de massa corpórea (IMC): medida da massa corpórea em relação à estatura calculada a partir da conversão das medidas de peso e estatura na fórmula $IMC (Kg/m^2) = P/E^2$.

e) Para determinação da composição de gordura corporal (GC) do grupo caso, foi utilizada a balança com monitor de composição corporal (BCC) da marca Tanita®, modelo BC533, com capacidade para 150 Kg e precisão de 0,1 Kg. No grupo controle, foi utilizada a balança com monitor de composição corporal (BCC) da marca Wiso® (São José, SP – Brasil) com capacidade para 150 Kg e precisão de 0,1 Kg. Para avaliação na BCC não são necessários procedimentos específicos; assim, o avaliado permaneceu com os pés descalços para subir na balança. O teste durou aproximadamente um minuto e a avaliação da composição corpórea se deu a partir de uma corrente elétrica de baixa intensidade pelos membros inferiores, a qual determinou a gordura corporal. Os resultados encontrados foram avaliados de acordo com os protocolos de Jackson e Pollock (1978) e Jackson, Pollock e Ward (1980).

3.4 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR CCR2-V64I (rs1799864)

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado o DNA extraído do sangue periférico dos indivíduos a partir de protocolo Salting-out e quantificado por espectrofotômetro NanoDrop 2000c® (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) na razão 260/280nm.

Os primers utilizados para a amplificação do gene *CCR2* foram sintetizados de acordo com Sezgin et al. (2011):

primer CCR2 forward: 5' TTGGTTTTGTGGGCAACATGATGG 3'

primer CCR2 reverse: 5' CATTGCAATCCCAAAGACCCACTC 3'

As condições da reação de amplificação estão apresentadas no quadro abaixo:

Reagentes	Volume
10X PCR Buffer	2,5µL
MgCl ₂ 50mM	1,0µL
dNTP 1,25mM	2,5µL
CCR2 sense 2,5µM	1,5µL
CCR2 antisense 2,5µM	1,5µL
Taq polimerase (1 unidade)	0,2µL
H ₂ O ultrapura (Milli-Q)	14,8µL
DNA 100nm	1 µL
Volume Final	25µL

Os ciclos de temperatura no termociclador seguiram o protocolo:

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
94°C	5 min	1
94°C	30 s	40
55°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	1

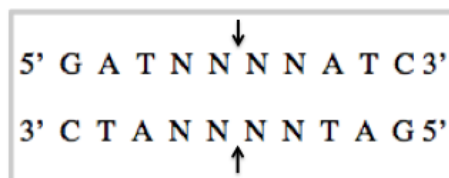
A verificação da amplificação do fragmento de DNA de 173 pb foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, corado com solução de nitrato de prata.

3.4.1 Tratamento Enzimático do Produto de PCR – Polimorfismo do *CCR2*

O produto amplificado para o polimorfismo do *CCR2* foi submetido à digestão enzimática, na presença da enzima de restrição *BsaBI* durante 4h em banho-maria a 60°C, nas condições descritas no quadro a seguir:

Reagentes	Volume
H ₂ O MilliQ	8,3 µL
Buffer	1,2µL
<i>BsaBI</i> (5U)	0,5µL
Produto de PCR	2,0µL
Volume Final	12,0µL

A enzima *BsaBI* reconhece o sítio de restrição representado abaixo:



Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, posteriormente corado com nitrato de prata. A mutação ocorre de G para A na posição 190 do gene *CCR2*. Portanto, é possível observar um dos três genótipos para as diferentes amostras:

- 1) GG (genótipo sem mutação) (173pb)
- 2) GA (genótipo em heterozigose) (173pb, 149pb e 24pb)
- 3) AA (genótipo em homozigose) (149pb e 24pb)

3.5 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR CCR5 (RS333)

Os primers utilizados para a amplificação do gene *CCR5* foram sintetizados de acordo com Martinson et al. (1997):

primer CCR5 sense: 5' ACCAGATCTCAAAAAGAA 3'

primer CCR5 antisense: 5' CATGATGGTGAAGATAAGCCTCA 3'

As condições da reação de amplificação estão apresentadas no quadro abaixo:

Reagentes	Volume
10X PCR Buffer	2,5µL
MgCl ₂ 50mM	0,75µL
dNTP 1,25mM	2,0µL
CCR5 sense 2,5µM	1,5µL
CCR5 antisense 2,5µM	1,5µL
Taq polimerase (1 unidade)	0,25µL
H ₂ O ultrapura (Milli-Q)	15,5µL
DNA 100ng	1µL
Volume Final	25µL

Os ciclos de temperatura no termociclador seguiram o protocolo:

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
94°C	5 min	1
94°C	1 min	35
57°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

A verificação da amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, corado com solução de nitrato de prata. O produto da PCR revelou um fragmento de 225 pb. Nos pacientes em que a mutação está presente, ocorre uma deleção de 32pb, sendo observada, portanto, uma banda de 193pb. Portanto, pode ser observado um dos três genótipos para as diferentes amostras:

- 1) wt/wt (genótipo sem mutação) (225pb)
- 2) wt/ Δ 32 (genótipo em heterozigose) (225pb e 193pb)
- 3) Δ 32/ Δ 32 (genótipo em homozigose) (193pb)

3.6 QUANTIFICAÇÃO DA CITOCINA CCL5 POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A dosagem de CCL5 a partir do plasma dos indivíduos foi realizada através de kits comerciais com anticorpo anti-CCL5 humano purificado (ELISA Ready SET-Go, E-Bioscience, E.U.A.). Para realização desta análise quantitativa, foi necessária a geração de uma curva padrão usando o padrão proteico diluído serialmente. Os procedimentos de quantificação da citocina seguiram as recomendações do fabricante. As amostras foram preparadas em duplicatas na placa e a leitura a 450nm foi realizada em leitor de ELISA Bio-Tek ELS 800 (Bioscience) em até 30 minutos após a adição da solução de bloqueio.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Prism 6 para Windows, versão 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, E.U.A.). A distribuição normal foi testada por meio do teste D'Agostino Pearson. As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão (SD) para os parâmetros com distribuição normal e mediana e intervalo interquartil (IQ3-IQ1) para dados com distribuição não-normal. A análise Kruskal-Wallis de teste da mediana foi usada seguida pelo teste de Mann-Whitney usado para as comparações. As frequências genóticas e as diferenças nos alelos dos polimorfismos CCR2 e CCR5 entre o grupo caso e o grupo controle foram calculados utilizando um teste qui-quadrado. Foi analisado Hardy-Weinberg em cada polimorfismo pelo teste do qui-quadrado. A odds ratio e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram determinados para avaliar associação estudo de caso-controle. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

ASSOCIATION OF INCREASED CIRCULATING RANTES BUT NOT *CCR2* rs1799864 AND *CCR5* rs333 GENETIC VARIANTS IN OBESITY

ABSTRACT

The inflammatory shift in adipose tissue environment has been implicated in the pathogenesis of obesity. In fact, activation of macrophages in adipose tissue is related to metabolic dysregulation, and migration of bone marrow derived macrophages to obese adipose tissue is driven by chemokines and their receptors. In this regard, RANTES and chemokine receptors *CCR5* and *CCR2* play important roles, controlling adipose tissue macrophages recruitment and polarization, and subsequent development of insulin resistance and obesity. Then, the purpose of this study was to investigate the impact of *CCR2* (rs1799864) and *CCR5* (rs333) polymorphisms and RANTES plasma levels in 90 obese subjects, compared to 90 healthy non-obese. Polymorphisms were detected from the whole blood genomic DNA using PCR and RFLP-PCR. The 2×2 contingency tables and multiple regression analysis were used for determining the association of genotypes with obesity. ELISA for human RANTES was used to determine its plasma levels. There were no significant associations in allelic and genotypic frequencies of *CCR2* and *CCR5* polymorphisms and obesity susceptibility ($p>0.05$). However, a significant increase in plasma RANTES were detected in the class I obese group ($p=0.002$) and class II obese group ($p=0.004$) compared to non-obese group. Non-obese female subjects and obese males presented significant higher levels of RANTES compared to males in non-obese group ($p=0.02$ and $p=0.004$, respectively). Presence of comorbidities (hypertension and type II diabetes) and genotypes of *CCR5* polymorphism did not influence circulating RANTES in obese subjects. To the best of our knowledge, this is the first report describing *CCR2* and *CCR5* polymorphisms association with obesity. Thereby, RANTES may be an important molecular target in the disease onset, enabling the transition to more exacerbated metabolic disorder that will lead to major comorbidities, such as diabetes and metabolic syndrome.

Key words: obesity, *CCR5*, macrophage, RANTES, genetic polymorphism.

Introduction

Obesity has become a serious public health issue because of its high prevalence worldwide, and increased risk of chronic diseases, such as diabetes and hypertension. In Brazil, the Surveillance System of Risk and Protective Factors for Chronic Non-Communicable Diseases (BRASIL 2015) has estimated that over 50% of the population is overweight and 17.9% is obese. It is known that overweight is defined as having excessive body weight for a particular height from fat, muscle, bone, water, or a combination of these factors; otherwise, obesity is defined as having excessive body fat derived from multiple factors, but mainly from energy imbalance that leads to tissue stress and damage, associated to metabolic dysfunction (Krebs, Himes et al. 2007).

The metabolic disturbances due to obesity lead to immune activation, upregulating plasma levels of chronic low-grade inflammation markers such as growth factors, cytokines and chemokines (Andersen, Murphy et al. 2016). Chemokines act in immune defense by driving and controlling the migration, activation, differentiation and survival of various subsets of specific leucocytes, in the physiology of acute and chronic inflammatory processes, as well as in pathological conditions (Viola and Luster 2008). The mechanisms that link inflammation to metabolism have a multi-faceted function in the pathogenesis of obesity, through macrophage-related pathways, and in this context, chemokines play an important role, especially the regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) or CCL5 (Decleves, Mathew et al. 2011).

RANTES is a member of the CC chemokine beta subfamily that has been associated with glucose intolerance, type 2 diabetes (T2DM) and other cardiovascular risk factors. In obesity, the expression of this chemokine is elevated in the adipose tissue and, together with CC chemokine receptor 5 (CCR5), is positively correlated with CD68⁺ (macrophage marker) expression (Madani, Karastergiou et al. 2009).

The CCR5 belongs to the trimeric guanine nucleotide-binding-protein-coupled seven-transmembrane receptor superfamily, which comprises the largest superfamily of proteins in the body, and is normally expressed in T lymphocytes, macrophages and dendritic cells. It is involved in the chemotaxis of leucocytes to inflammation sites, and, especially in adipose tissue macrophage recruitment, and M1/M2 polarization in obesity (Spagnolo, Renzoni et al. 2005). Indeed, *CCR5* ablation in mice prevents insulin resistance, diabetes, and fatty liver induced by high fat diet. The beneficial effects of *CCR5* deficiency are the result of both the

decrease of adipose tissue macrophage recruitment and the M2-dominant shift of adipose tissue macrophage polarization (Kitade, Sawamoto et al. 2012).

It was described a polymorphism in the *CCR5* gene, called CCR5-Δ32 (rs333, c.554_585del32), corresponding to a 32 basepair (bp) deletion that occur at a site of a repeat motif, resulting in a frame shift in the coding sequence and producing a defective protein, which is not expressed on the cell surface (McNicholl, Smith et al. 1997), which may affect activating signals displayed by its ligands, such as RANTES.

On the other hand, CCR2 chemokine receptor is another important molecule, mainly expressed by monocytes/macrophages, basophils, mast cells, T lymphocytes, NK cells, and dendritic cells (Polentarutti, Allavena et al. 1997), which also participates in leukocyte traffic to inflammatory sites. A single nucleotide polymorphism in *CCR2* gene (rs1799864, c.190G>A or p.Val64Ile), consists in a substitution from a guanine to an adenine at position 190 of the coding sequence. It results in a substitution from valine to isoleucine at position 64 in the CCR2 protein (Kostrikis, Huang et al. 1998), which leads to enhanced gene expression and prolonged half-life of a CCR2 isoform (Nakayama, Tanaka et al. 2004).

A potential therapeutic value of targeting certain immune resident cells (such as M2 macrophages, T regulatory cells, or myeloid-derived suppressor cells) and/or certain cytokines, adipokines, or chemokines and their receptors have been shown to improve insulin resistance and restrain organ damage in T2DM obese patients by limiting the pro-inflammatory milieu (Makki, Froguel et al. 2013).

Considering the involvement of chemokines and their receptors in controlling activation and migration of macrophages and other immune cells to the adipose tissue, and the impact of genetic polymorphisms in the functional properties of such molecules along with scarce data regarding polymorphisms of chemokine receptors and obesity risk, we aimed to determine whether genetic variants in *CCR2* and *CCR5* are associated with obesity susceptibility, and to compare RANTES plasma concentration in healthy non-obese and obese subjects.

METHODS

Human subjects

Following approval from the Human Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil (No. 996.367– CAAE No. CAAE: 39410314.2.0000.5231),

inclusion of the individuals in the study was conditioned to obtain a written informed consent form. A nutritional assessment was performed in 90 sequential patients and 90 control non-obese subjects listed for nutrition diagnosis at Filadelfia University Center – UNIFIL, Londrina, Paraná, Brazil. Nutritional assessment included weight, height and body fat composition estimation using a bivalent (foot to foot) bioimpedance analysis (Electronic Scale BC533, Tanita, Tokyo, Japan and Electronic Scale W905, Wiso, São José, Brazil).

Body Mass Index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. Overweight and Obese (case group) classification were defined based on the respective BMI standard cut points that have been recommended by the World Health Organization (WHO): BMIs of ≥ 25 and < 30 kg/m² for Overweight; BMIs of ≥ 30 and $< 34,9$ kg/m² for class I obesity (n= 29); BMIs of ≥ 35 and $< 39,9$ kg/m² for class II obesity (n= 17); BMIs ≥ 40 kg/m² for class III obesity (n= 13) (WHO 2000), and included waist circumference (WC) evaluation.

For the control group (non-obese), BMI classification combined with the body fat percentage was used to classify eutrophic individuals, whom presented a BMI of ≥ 18 and $< 24,9$ kg/m², and percentage of fat within the average for age and gender according to Jackson and Pollock (1978) and Jackson, Pollock et al. (1980) protocols.

CCR2 and CCR5 Polymorphisms detection

Peripheral blood was obtained (EDTA tubes) from the subjects, and genomic DNA was extracted from buffy coat using Salting-out protocol. DNA concentration (ng/μl) and purity were determined by spectrophotometry (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, U.S.A.).

Genotyping of *CCR2* rs1799864 polymorphism was performed by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) technique. The sequence of forward and reverse primers used for amplification of the G190A region was 5' TTG GTT TTG TGG GCA ACA TGA TGG 3' and 5' CAT TGC AAT CCC AAA GAC CCA CTC 3' respectively, according to Sezgin, Koksall et al. (2011). The PCR was performed in 25 μl final volume, using 100 ng of genomic DNA, 0.12 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1x reaction buffer, 0.15 μmol of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). The amplification conditions for PCR were 94°C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, DNA extension at 72°C for 30 s, and the final extension at 72°C for 5 min. Two μl of each PCR product was digested

for 4 h at 60°C with 5 units of *Bsa* BI restriction enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

The 32-bp deletion of *CCR5* rs333 was screened by PCR. Primers used to flank the deletion region were described by Martinson, Chapman et al. (1997): 5' ACC AGA TCT CAA AAA GAA 3' and 5' CAT GAT GGT GAA GAT AAG CCT CA 3'. The reaction was carried out in a final volume of 25 µl, using 100 ng of genomic DNA, 0.1 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1x reaction buffer, 0.15 µmol of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). The reaction mixture was first subjected to 1 cycle of 5 min of initial denaturation at 94°C, 35 cycles of 1 min of denaturation at 94°C, and 1 min of annealing at 55°C, and 1 min of extension at 72°C. After amplification, the reaction mixture was subjected to a final cycle of 10 min of extension at 72°C.

All amplification cycles were performed in PCR system A200 Gradient thermal cycler (LongGene, Hangzhou, China). PCR and digested products were electrophoresed on 10% acrylamide gels for 2 hours, and stained using silver nitrate method. Negative controls (without DNA) were included in all reactions to assure that there were no contaminants.

Determination of plasma RANTES levels

Analysis was performed on blood plasma, using RayBio® Human Rantes (RayBiotech, Norcross, GA, U.S.A.) ELISA kit, according to manufacturer's instructions. Optical density (OD) was read at 450nm using ELX-300 Reader (BioTek Instruments Inc., VT, U.S.A.). Results were expressed in ng/mL. Each case and control sample was assayed in two biological replicates. Data processing was performed using the analytical curve-fitting software Gen5 (BioTek).

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using the Prism 6 for Windows, version 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, U.S.A.). Normal distribution was tested using D'Agostino Pearson omnibus test. Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD) for parameters with normal distribution and median and interquartile range (IQ3–IQ1) for data with non-normal distribution. Mann–Whitney U test was used for comparisons. Hardy–Weinberg equilibrium at each polymorphism and differences in the alleles and genotype frequencies of the *CCR2* and *CCR5* polymorphisms between the non-

obese and obese were calculated using a Chi-square test. Odds ratio and 95% confidence interval (95% CI) were determined to evaluate case-control association study. A two-sided $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Demographics and nutritional data

The mean ages for the control and case groups were, 35.1 y (SD: ± 20.6 ; range: 20-80 y) and 38.9 y (SD: ± 15.0 ; range: 17-80 y), respectively ($p=0.1$). Women represented 65.5% ($n=59$) and 78.8% ($n=71$), while 34.5% ($n=31$) and 21.2% ($n=29$) were men for control and case group, respectively.

The mean BMIs for the control and case groups were 22.3 kg/m² (SD: ± 2.8 ; range: 17.4-32.0 kg/m²) and 33.3 kg/m² (SD: ± 6.5 ; range: 25.1-66.1 kg/m²), respectively ($p < 0.0001$). The body fat percentage (BF%) average in control and case groups was 21.7% (SD: ± 3.5 ; range: 13.7-29.9 %) and 40.3% (SD: ± 9.2 ; range: 24.9-62.0 %), respectively. The waist circumference average in case group was 107.1cm (SD: ± 14.6 ; range: 75-149 cm) (Table 1). The control group had no comorbidities, whereas 15 (37.5%) had hypertension and 7 (17.5%) had diabetes in the case group.

Table 1. Nutritional and Demographic Characteristics

	<i>Mean for control group</i>	<i>Men</i>	<i>Women</i>	<i>Mean for case group</i>	<i>Men</i>	<i>Women</i>
No. Patients	90	31	59	90	19	71
Age (y)	35.1	35.02	35.39	38.9	44.26	37.4
Weigh (kg)	63.96	64.19	57.82	88.65	102.32	85.0
BMI (kg/m ²)	22.26	22.28	20.96	33.33	34.15	33.1
Body fat percentage (%)	21.68	21.57	23.19	40.31	36.69	41.3
Waist Circumference (cm)	-	-	-	107.1	108.9	105.3

NOTE: Data expressed as means. Abbreviation: BMI= body mass index.

Results from Genotyping

After DNA amplification by PCR, products of 173- and 225-bp for *CCR2* and *CCR5* polymorphisms, respectively, were detected in all samples. The identified genotypes of *CCR2* polymorphism were labeled according to the presence or absence of enzyme restriction site.

Thus, GG genotype is homozygote for the absence (173-bp), GA genotype is heterozygote for the presence and absence (173- and 149-bp) and AA genotype is homozygote for the presence of the restriction site (149-bp). The genotypes of *CCR5* polymorphism could be defined according to the presence of a 225-bp sequence in wild type (wt) alleles and 193-bp sequence in $\Delta 32$ alleles (Figure 1).

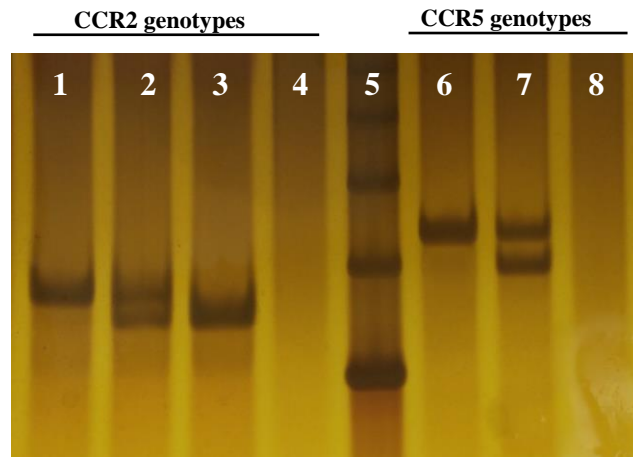


Figure 1. Genotyping of the *CCR2* rs1799864 and *CCR5* rs333 polymorphisms. Results from acrylamide gel electrophoresis of enzymatic digestion and PCR products stained by silver nitrate method. Lane 1: GG genotype (173-bp); lane 2: GA genotype (173- and 149-bp); lane 3: AA genotype (149-bp); lane 4: negative control; lane 5: 100-bp ladder; lane 6: wt/wt genotype (225-bp); lane 7: wt/ $\Delta 32$ genotype (225/193-bp); lane 8: negative control.

Genotypic and allelic frequencies

The *CCR2* and *CCR5* polymorphisms genotypes in control and case groups were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($p > 0.05$). Genotypic and allelic frequencies of *CCR2* rs1799864 and *CCR5* rs333 polymorphisms were similar between control and case groups, as shown in Table 2. Case-control association study was performed and did not revealed significant associations between both genetic polymorphisms and obesity susceptibility, considering genotypes, dominant model and allele frequencies.

Table 2. Comparison of the genotype and allele frequencies of the *CCR2* (rs1799864) and *CCR5* (rs333) polymorphisms between controls and case groups

	Control n (%)	Case n (%)	OR (95% CI)	p
<i>CCR2 rs1799864</i>				
GG	67 (74.5)	57 (63.3)	Reference	
GA	22 (24.4)	31 (34.5)	1.66 (0.86-3.18)	0.14
AA	1 (1.1)	2 (2.2)	2.35 (0.21-26.62)	0.6
AA+GA	23 (25.5)	33 (36.7)	1.69 (0.89-3.20)	0.15
G allele	156 (86.7)	145 (80.6)	Reference	
A allele	24 (13.3)	35(19.4)	1.57 (0.89-2.77)	0.15
<i>CCR5 rs333</i>				
wt/wt	85 (94.4)	79 (87.8)	Reference	
wt/ Δ 32	5 (5.6)	11 (12.2)	2.37 (0.79-7.1)	0.35
Δ 32/ Δ 32	0 (0)	0 (0)		
wt/ Δ 32 + Δ 32/ Δ 32	5 (5.6)	11 (12.2)	2.37 (0.79-7.1)	0.35
wt allele	175 (97.2)	169 (93.9)	Reference	
Δ 32 allele	5 (2.8)	11 (6.1)	2.28 (0.77-6.7)	0.2

Case group represents both overweight (n=31) and obese (n=59) patients. Control group represents non-obese subjects. OR: Odds ratio; CI: confidence interval; p value determined by *Fisher's* exact test.

RANTES plasma concentrations in non-obese and obese subjects

Blood plasma RANTES concentrations were assessed in 80 subjects: 40 non-obese- and 40 obese-subjects. The mean plasma RANTES concentration was significantly higher in obese group (mean=18.37 ng/mL, \pm 1.99) compared to non-obese group (mean=15.04 ng/mL, \pm 4.47; p=0.0003) (Figure 2).

According to the International Classification and based on World Health Organization recommendations, BMI were used to classify obese-subjects as overweight and obesity. In this regard, plasma RANTES were compared between non-obese and class I, II and III of obesity. A significant increase in plasma RANTES were detected in the class I obese group (n=10; p=0.002) and class II obese group (n=17; p=0.004), although a trend was noted in the class III obese group (n=13; p=0.07) (Figure 3).

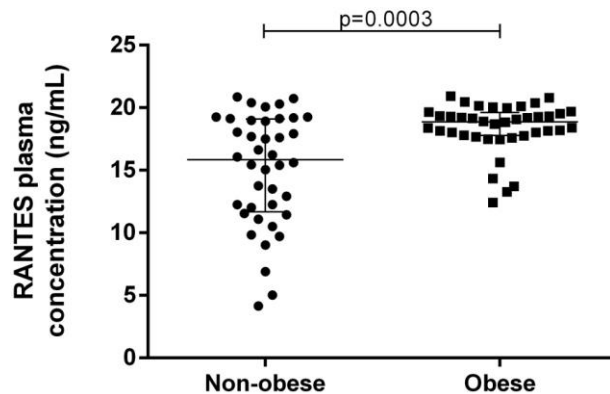


Figure 2. Scatter plot illustrating medians and interquartile range levels of systemic blood plasma concentrations of RANTES. RANTES were quantified in non-obese (median 15.84ng/mL \pm 4.47) and obese (18.87ng/mL \pm 1.99) groups using ELISA kit for human RANTES/CCL5 (Raybiotech, U.S.A.). $p=0.0003$ denotes statistically significant difference (Mann Whitney U test).

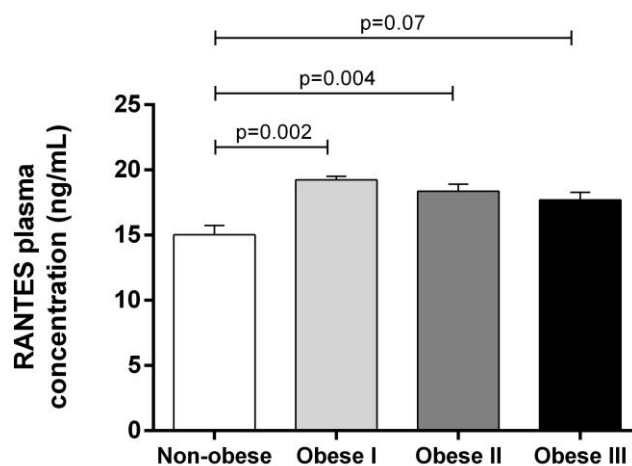


Figure 3. Plasma concentrations of RANTES between non-obese, class I, class II and class III obese-subjects. The mean plasma RANTES concentration were compared between non-obese (median 15.84ng/mL; mean 15.04ng/mL \pm 4.5) and class I (19.42 ng/mL; 19.24ng/mL \pm 0.86), class II (19.24ng/mL; 19.25ng/mL \pm 1.1), and class III (18.17ng/mL; 18.49ng/mL \pm 0.8) obese groups. p values determined using Mann Whitney U test.

In view of a possible influence of gender on chemokine concentrations, plasma RANTES were compared between non-obese and obese groups, stratified by gender (Figure 4). In non-obese group, increased plasma RANTES was found in female in contrast to male samples ($p=0.02$); however, this difference was not detected in obese group ($p=0.64$). A significant increase in plasma RANTES were detected in males from obese compared with non-obese group ($p=0.004$), whereas chemokine levels in female samples were similar ($p=0.32$).

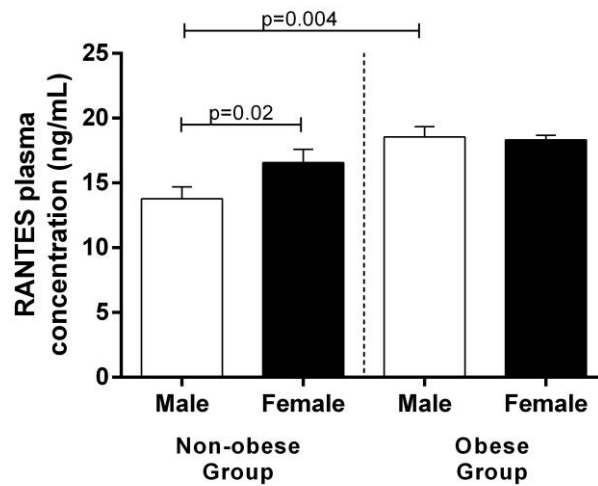


Figure 4. Plasma RANTES concentrations between non-obese and obese groups, stratified by gender. The median plasma RANTES concentration were compared between non-obese male (median 14.40ng/mL; mean 13.79ng/mL \pm 4.2) and female (18.31ng/mL; 16.57ng/mL \pm 4.3), and obese male (19.27ng/mL; 18.56ng/mL \pm 2.1) and female (18.84ng/mL; 18.33ng/mL \pm 1.9). p values determined using Mann Whitney U test.

Moreover, there were no significant differences comparing plasma RANTES concentrations between carriers of *CCR5-Δ32* allele and wt/wt subjects ($p=0.68$), or in obese-subjects with the presence or absence of hypertension or T2DM ($p=0.86$ and $p=0.93$, respectively).

DISCUSSION

Evaluating the demographic and nutritional parameters of the subjects in this study, it was possible to evidence that women represented the major percentage in the obese group. This data corroborates to those recorded in VIGITEL survey, conducted by the Brazilian Ministry of Health, where the prevalence of obesity was higher among women compared to men (BRASIL 2015).

All the anthropometric parameters were elevated in the obese group compared with the non-obese control group. In this regard, BMI and waist circumference are the most used measures to identify obesity and associated diseases risk. The association between BMI and cardio-metabolic risk factors is common in the literature, but researches have highlighted the importance of correlating BMI with waist circumference for more reliable results of diseases relative risk (Ngueta, Laouan-Sidi et al. 2014). In this study, all obese subjects presented waist circumference above the recommended for each gender (102cm for men and 88cm for women), according to the classification table of National Institutes of Health (NHLBI 1998).

Thus, it may represent a group with high risk for metabolic diseases.

Obesity is a complex disease, in which not only the imbalance of energy intake from the diet and energy expenditure is involved, but genetic and environmental factors play an important role, including immunological mediation. In humans, obesity is related to low-grade inflammation, being considered a chronic inflammatory disease. In this context, the inflammatory response triggered by obesity involves different immune system components such as leucocytes, cytokines and chemokines.

The activation and recruitment of leucocytes are regulated by chemotactic and proinflammatory chemokines and their receptors. CCR2 and CCR5 are G protein coupled receptors that bind chemokines, such as MCP-1, RANTES and MIP-1 (Murphy, Tian et al. 1996). The rs333 and rs1799864 polymorphisms in the *CCR5* and *CCR2* genes, respectively, can alter expression and function of both receptors, which may result in different signaling extents in response to activation, promoted by their ligands.

This was the first time that both *CCR2* rs1799864 and *CCR5* rs333 polymorphisms had been reported in obesity. Allelic and genotypic frequencies of both polymorphisms did not differ between control and case groups. In addition, the case-control study did not show significant association between the genotypes of *CCR2* and *CCR5* polymorphisms and obesity susceptibility.

Several researchers have investigated the association between *CCR2* and *CCR5* polymorphisms with chronic diseases with conflicting results. Gonzalez, Alvarez et al. (2001) and Kallel, Abdesslem et al. (2012) demonstrated a protective effect of *CCR5* $\Delta 32$ allele against myocardial infarction contrasting with other studies that found no association between *CCR5* polymorphism and cardiovascular diseases (Apostolakis, Baritaki et al. 2007, Sharda, Gilmour et al. 2008). Zhang, Liu et al. (2015) have also found no associations between *CCR5* $\Delta 32$ and *CCR2* A allele with hypertension and T2DM, which differed from the results of Nakajima, Tanaka et al. (2002) and Prasad, Tiwari et al. (2007).

Recently, Guzman-Ornelas, Petri et al. (2016) described a positive association between *CCR2* rs1799864 polymorphism and individuals with insulin resistance. In this group, median BMI (28.6 kg/m^2 , IQ range 24.4–31.7) and waist circumference (95.0 cm, IQ range 83–103) were different from individuals without insulin resistance (24.9 kg/m^2 , IQ range 22.6–28.9; and 86.5 cm, IQ range 77.1–93.1, respectively).

In consideration of our results, any association of *CCR2* polymorphism and obesity susceptibility was revealed. Furthermore, control (non-obese) and case (obese) groups of this study had different BMI and waist circumference (Table 1), and allele frequencies reported

here represented a cohort with different background (ancestry), which possibly may explain contrasting results from those of Guzman-Ornelas, Petri et al. (2016). In addition, this is the first report who sought a relation between *CCR5* rs333 and obesity, although without significant association.

It has been demonstrated that obesity is associated with increased accumulation of not only macrophages, but also T cells in adipose tissue. RANTES mRNA levels are highly correlated with the T cell marker CD3 in human visceral adipose tissue. Overall, these data indicated that RANTES might be a novel link between obesity, adipose tissue inflammation, and insulin resistance (Wu, Ghosh et al. 2007).

In this context, it was investigated the plasma level of RANTES. The mean plasma concentration in non-obese group was 15.04 ng/mL and in obese group 18.37 ng/mL. There was significant difference between both groups ($p=0.0003$). These results corroborate to those reported by Baturcam, Abubaker et al. (2014), who showed a significant increase in circulating RANTES in obese subjects compare to lean group.

The data found in this study demonstrated a significant increase in plasma CCL5 in the class I obese group ($p=0.002$) and class II obese group ($p=0.004$), although only a trend was noted in the class III obese group ($p=0.07$), which represented the group with highest risk for metabolic diseases (Figure 3).

Lubrano, Valacchi et al. (2015) investigated plasma levels of selected growth factors, cytokines and chemokines, in groups of obese patients with metabolic syndrome and without metabolic syndrome, comparing to healthy subjects as controls, in view of demonstrating the different patterns of inflammatory factors of two obese groups with similar clinical features, but with different metabolic status. In the results, all plasma levels were significantly elevated in obese individuals with metabolic syndrome but only platelet-derived growth factor (PDGF), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and RANTES were significantly elevated in obese without metabolic syndrome. They also demonstrated that plasma levels of RANTES were remarkably increased in obese group compared to obese patients with metabolic syndrome, assuming that this chemokine may be a molecular target for interrupting the transition between obesity and metabolic syndrome.

Moreover, according to the literature, it is possible that gender and particular hormones influence the relationship between obesity and low-grade chronic inflammation. Gender differences in the secretory function of adipose tissue may explain some of the disparity between fat accumulation and distribution (Garcia-Bailo, Roke et al. 2012). In this respect, we stratified non-obese and obese groups by gender, and observed a significant increase in

plasma RANTES of obese male group and female non-obese group compared with non-obese males ($p=0.02$ and $p=0.004$, respectively). Further, there was no difference between plasma RANTES in male and female obese subjects, and comparing females of both groups.

These data corroborate those found by Garcia-Bailo, Roke et al. (2012), which demonstrated a significant increase in plasma RANTES in healthy women compared to healthy men, and Farooq, Knez et al. (2013), who found no differences between serum RANTES comparing overweight men and women in an Arabic population. Recently, Escobar-Morreale, Martinez-Garcia et al. (2016) found higher concentrations of low-grade chronic inflammation markers and related them with body fat in women comparing with men; however, they did not evaluate RANTES levels.

Studies have shown the important role of immune cells in the adipose tissue dysfunction and the consequent development of obesity and other metabolic disorders. It is clear the importance of immune system in the pathogenesis of this disease, but due to complexity of the immunologic mechanisms and multiple factors involved in obesity, the trigger of inflammation in adipose tissue and its path to the systemic metabolic disorder is still unknown.

Based on the results, it is possible to suggest that obesity susceptibility is not related to *CCR2* rs1799864 and *CCR5* rs333 polymorphisms, although sample size is limited and must be confirmed in larger cohorts. Furthermore, gender may exert significant effect on RANTES plasma concentrations, which should be investigated. Nevertheless, RANTES plasma levels were significantly higher in obese group, regardless of gender, leading to important outcomes, and suggesting a target for therapeutic interventions. All in all, the link between immune system and obesity involves alteration of the adipose tissue microenvironment, and overexpression of chemokine receptors and secreted chemokines may influence disease evolution.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação of State University of Londrina (PROPPG-UEL). Flávia Luísa Dias was a fellow of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brazil.

Informed consent: "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Declaration of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interests regarding the publication of this manuscript.

REFERENCES

- Andersen, C. J., K. E. Murphy and M. L. Fernandez (2016). "Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity." *Adv Nutr* **7**(1): 66-75.
- Apostolakis, S., S. Baritaki, G. E. Kochiadakis, N. E. Igoumenidis, D. Panutsopoulos and D. A. Spandidos (2007). "Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease." *Thromb Res* **119**(1): 63-71.
- Baturcam, E., J. Abubaker, A. Tiss, M. Abu-Farha, A. Khadir, F. Al-Ghimlas, I. Al-Khairi, P. Cherian, N. Elkum, M. Hammad, J. John, S. Kavalakatt, C. Lehe, S. Warsame, K. Behbehani, S. Dermime and M. Dehbi (2014). "Physical exercise reduces the expression of RANTES and its CCR5 receptor in the adipose tissue of obese humans." *Mediators Inflamm* **2014**: 627150.
- BRASIL (2015). *Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde.
- Decleves, A. E., A. V. Mathew, R. Cunard and K. Sharma (2011). "AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet." *J Am Soc Nephrol* **22**(10): 1846-1855.
- Escobar-Morreale, H. F., M. A. Martinez-Garcia, R. Montes-Nieto, E. Fernandez-Duran, S. Temprano-Carazo and M. Luque-Ramirez (2016). "Effects of glucose ingestion on circulating inflammatory mediators: Influence of sex and weight excess." *Clin Nutr*.
- Farooq, A., W. L. Knez, K. Knez, A. Al-Noaimi, J. Grantham and V. Mohamed-Ali (2013). "Gender differences in fat distribution and inflammatory markers among Arabs." *Mediators Inflamm* **2013**: 497324.
- Garcia-Bailo, B., K. Roke, D. M. Mutch, A. El-Soheymy and A. Badawi (2012). "Association between circulating ascorbic acid, alpha-tocopherol, 25-hydroxyvitamin D, and plasma cytokine concentrations in young adults: a cross-sectional study." *Nutr Metab (Lond)* **9**(1): 102.
- Gonzalez, P., R. Alvarez, A. Batalla, J. R. Reguero, V. Alvarez, A. Astudillo, G. I. Cubero, A. Cortina and E. Coto (2001). "Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction." *Genes Immun* **2**(4): 191-195.
- Guzman-Ornelas, M. O., M. H. Petri, M. Vazquez-Del Mercado, E. Chavarria-Avila, F. I. Corona-Meraz, S. L. Ruiz-Quezada, P. M. Madrigal-Ruiz, J. Castro-Albarran, F. Sandoval-Garcia and R. E. Navarro-Hernandez (2016). "CCL2 Serum Levels and Adiposity Are Associated with the Polymorphic Phenotypes -2518A on CCL2 and 64ILE on CCR2 in a Mexican Population with Insulin Resistance." *J Diabetes Res* **2016**: 5675739.

- Jackson, A. S. and M. L. Pollock (1978). "Generalized equations for predicting body density of men." *Br J Nutr* **40**(3): 497-504.
- Jackson, A. S., M. L. Pollock and A. Ward (1980). "Generalized equations for predicting body density of women." *Med Sci Sports Exerc* **12**(3): 175-181.
- Kallel, A., S. Abdessalem, Y. Sediri, M. S. Mourali, M. Feki, R. Mechmeche, R. Jemaa and N. Kaabachi (2012). "Polymorphisms in the CC-chemokine receptor-2 (CCR2) and -5 (CCR5) genes and risk of myocardial infarction among Tunisian male patients." *Clin Biochem* **45**(6): 420-424.
- Kitade, H., K. Sawamoto, M. Nagashimada, H. Inoue, Y. Yamamoto, Y. Sai, T. Takamura, H. Yamamoto, K. Miyamoto, H. N. Ginsberg, N. Mukaida, S. Kaneko and T. Ota (2012). "CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status." *Diabetes* **61**(7): 1680-1690.
- Kostrikis, L. G., Y. Huang, J. P. Moore, S. M. Wolinsky, L. Zhang, Y. Guo, L. Deutsch, J. Phair, A. U. Neumann and D. D. Ho (1998). "A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation." *Nat Med* **4**(3): 350-353.
- Krebs, N. F., J. H. Himes, D. Jacobson, T. A. Nicklas, P. Guilday and D. Styne (2007). "Assessment of child and adolescent overweight and obesity." *Pediatrics* **120 Suppl 4**: S193-228.
- Lubrano, C., G. Valacchi, P. Specchia, L. Gnessi, E. P. Rubanenko, E. A. Shuginina, A. I. Trukhanov, L. G. Korkina and C. De Luca (2015). "Integrated Haematological Profiles of Redox Status, Lipid, and Inflammatory Protein Biomarkers in Benign Obesity and Unhealthy Obesity with Metabolic Syndrome." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**: 14.
- Madani, R., K. Karastergiou, N. C. Ogston, N. Miheisi, R. Bhome, N. Haloob, G. D. Tan, F. Karpe, J. Malone-Lee, M. Hashemi, M. Jahangiri and V. Mohamed-Ali (2009). "RANTES release by human adipose tissue in vivo and evidence for depot-specific differences." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(6): E1262-1268.
- Makki, K., P. Froguel and I. Wolowczuk (2013). "Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines." *ISRN Inflamm* **2013**: 139239.
- Martinson, J. J., N. H. Chapman, D. C. Rees, Y. T. Liu and J. B. Clegg (1997). "Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion." *Nat Genet* **16**(1): 100-103.
- McNicholl, J. M., D. K. Smith, S. H. Qari and T. Hodge (1997). "Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele." *Emerg Infect Dis* **3**(3): 261-271.
- Murphy, W. J., Z. G. Tian, O. Asai, S. Funakoshi, P. Rotter, M. Henry, R. M. Strieter, S. L. Kunkel, D. L. Longo and D. D. Taub (1996). "Chemokines and T lymphocyte activation: II. Facilitation of human T cell trafficking in severe combined immunodeficiency mice." *J Immunol* **156**(6): 2104-2111.
- Nakajima, K., Y. Tanaka, T. Nomiya, T. Ogihara, L. Piao, K. Sakai, T. Onuma and R. Kawamori (2002). "Chemokine receptor genotype is associated with diabetic nephropathy in Japanese with type 2 diabetes." *Diabetes* **51**(1): 238-242.
- Nakayama, E. E., Y. Tanaka, Y. Nagai, A. Iwamoto and T. Shioda (2004). "A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform." *AIDS* **18**(5): 729-738.
- Ngueta, G., E. A. Laouan-Sidi and M. Lucas (2014). "Does waist circumference uncorrelated with BMI add valuable information?" *J Epidemiol Community Health* **68**(9): 849-855.
- NHLBI (1998). *Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults: The Evidence Report*. Bethesda (MD), National Heart, Lung, and Blood Institute.
- Polentarutti, N., P. Allavena, G. Bianchi, G. Giardino, A. Basile, S. Sozzani, A. Mantovani and M. Introna (1997). "IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1

- receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences." *J Immunol* **158**(6): 2689-2694.
- Prasad, P., A. K. Tiwari, K. M. Kumar, A. C. Ammini, A. Gupta, R. Gupta and B. K. Thelma (2007). "Association of TGFbeta1, TNFalpha, CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians." *BMC Med Genet* **8**: 20.
- Sezgin, I., B. Koksai, G. Bagci, H. K. Kurtulgan and O. Ozdemir (2011). "CCR2 polymorphism in chronic renal failure patients requiring long-term hemodialysis." *Intern Med* **50**(21): 2457-2461.
- Sharda, S., A. Gilmour, V. Harris, V. P. Singh, N. Sinha, S. Tewari, V. Ramesh, S. Agrawal and S. Mastana (2008). "Chemokine receptor 5 (CCR5) deletion polymorphism in North Indian patients with coronary artery disease." *Int J Cardiol* **124**(2): 254-258.
- Spagnolo, P., E. A. Renzoni, A. U. Wells, S. J. Copley, S. R. Desai, H. Sato, J. C. Grutters, A. Abdallah, A. Taegtmeier, R. M. du Bois and K. I. Welsh (2005). "C-C chemokine receptor 5 gene variants in relation to lung disease in sarcoidosis." *Am J Respir Crit Care Med* **172**(6): 721-728.
- Viola, A. and A. D. Luster (2008). "Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**: 171-197.
- WHO (2000). "Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation." *World Health Organ Tech Rep Ser* **894**: i-xii, 1-253.
- Wu, H., S. Ghosh, X. D. Perrard, L. Feng, G. E. Garcia, J. L. Perrard, J. F. Sweeney, L. E. Peterson, L. Chan, C. W. Smith and C. M. Ballantyne (2007). "T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity." *Circulation* **115**(8): 1029-1038.
- Zhang, Z., J. Liu, H. Wang, H. Wu, X. Wu, J. Dong and L. Liao (2015). "Association between chemokine receptor 5 (CCR5) delta32 gene variant and atherosclerosis: a meta-analysis of 13 studies." *Int J Clin Exp Med* **8**(1): 658-665.

5 CONCLUSÕES

- Não houve associação significativa entre os polimorfismos *CCR2* rs1799864 e *CCR5* rs333 e suscetibilidade à obesidade;
- Entretanto, houve uma diferença significativa entre a concentração plasmática média de RANTES entre o grupo obeso e o grupo controle;
- Houve um aumento significativo de RANTES plasmático no grupo de obesos classe I e classe II, e uma tendência foi notada no grupo de obesos classe III;
- Mulheres não obesas e homens obesos apresentaram níveis plasmáticos médios maiores que homens não-obesos;
- Embora os níveis plasmáticos de RANTES foram maiores no grupo obeso, não houve diferença entre homens e mulheres, além de não haver diferença entre mulheres de ambos os grupos;
- Os níveis de RANTES plasmático não diferiram entre indivíduos obesos hipertensos ou diabéticos e obesos não hipertensos ou não diabéticos;
- Finalmente, não houve diferença significativa entre os níveis plasmáticos de RANTES e os diferentes genótipos do polimorfismo rs333 do *CCR5*.

REFERÊNCIAS

ABESO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2009-2010**. [s.l.: s.n.]

AFZAL, A. R.; KIECHL, S.; DARYANI, Y. P.; WEERASINGHE, A.; ZHANG, Y.; REINDL, M.; MAYR, A.; WEGER, S.; XU, Q.; WILLEIT, J. Common CCR5-del32 frameshift mutation associated with serum levels of inflammatory markers and cardiovascular disease risk in the Bruneck population. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 39, n. 7, p. 1972–8, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436884>>.

ALAM, I.; NG, T. P.; LARBI, A. **Does inflammation determine whether obesity is metabolically healthy or unhealthy? the aging perspective** *Mediators of Inflammation*, 2012. .

ALKHATIB, G.; COMBADIÈRE, C.; BRODER, C. C.; FENG, Y.; KENNEDY, P. E.; MURPHY, P. M.; BERGER, E. A. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5270, p. 1955–8, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658171>>.

ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 787–820, 2007.

ALLER, E. E. J. G.; ABETE, I.; ASTRUP, A.; ALFREDO, M. J.; VAN BAAK, M. A. **Starches, sugars and obesity** *Nutrients*, 2011. .

APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S. L. **RANTES: A versatile and controversial chemokine** *Trends in Immunology*, 2001. .

ARON-WISNEWSKY, J.; TORDJMAN, J.; POITOU, C.; DARAKHSHAN, F.; HUGOL, D.; BASDEVANT, A.; AISSAT, A.; GUERRE-MILLO, M.; CLÉMENT, K. Human adipose tissue macrophages: M1 and M2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 11, p. 4619–4623, 2009.

BAEUERLE, P. a; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 141–79, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011280>>.

BAGGIOLINI, M.; LOETSCHER, P. **Chemokines in inflammation and immunity** *Immunology Today*, 2000. .

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540–550, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc1388>>.

BATURCAM, E.; ABUBAKER, J.; TISS, A.; ABU-FARHA, M.; KHADIR, A.; AL-GHIMLAS, F.; AL-KHAIRI, I.; CHERIAN, P.; ELKUM, N.; HAMMAD, M.; JOHN, J.; KAVALAKATT, S.; LEHE, C.; WARSAME, S.; BEHBEHANI, K.; DERMIME, S.; DEHBI, M. Physical exercise reduces the expression of RANTES and its CCR5 receptor in the adipose

tissue of obese humans. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

BELPERIO, J. a; KEANE, M. P.; ARENBERG, D. a; ADDISON, C. L.; EHLERT, J. E.; BURDICK, M. D.; STRIETER, R. M. CXC chemokines in angiogenesis that regulate angiogenesis, including the CXC che-. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, n. July, p. 1–8, 2000.

BLANPAIN, C.; LIBERT, F.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. CCR5 and HIV infection. **Receptors Channels**, v. 8, n. 1, p. 19–31, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12402506>>.

BRASIL. VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico 2013. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.**, p. 120p.: il. –(Série G. Estatística e Informação em, 2014).

BRASIL - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. **Biblioteca do Ministerio do Planejamento, Orçamento e Gestão**, p. 130, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf>.

CAI, L.; DE BEER, M. C.; DE BEER, F. C.; VAN DER WESTHUYZEN, D. R. Serum amyloid a is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2954–2961, 2005.

CARVALHO, C.; CALVISI, S. L.; LEAL, B.; BETTENCOURT, A.; MARINHO, A.; ALMEIDA, I.; FARINHA, F.; COSTA, P. P.; SILVA, B. M.; VASCONCELOS, C. CCR5-Delta32: implications in SLE development. **International journal of immunogenetics**, v. 41, n. 3, p. 236–241, 2014.

CASTOLDI, A.; NAFFAH DE SOUZA, C.; CAMARA, N. O. S.; MORAES-VIEIRA, P. M. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 637, 2015.

CHANG, L.-Y.; LIN, Y.-C.; KANG, C.-W.; HSU, C.-Y.; CHU, Y.-Y.; HUANG, C.-T.; DAY, Y.-J.; CHEN, T.-C.; YEH, C.-T.; LIN, C.-Y. The indispensable role of CCR5 for in vivo suppressor function of tumor-derived CD103+ effector/memory regulatory T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 2, p. 567–74, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664873>>.

CHARO, I. F.; MYERS, S. J.; HERMAN, A.; FRANCI, C.; CONNOLLY, A. J.; COUGHLIN, S. R. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 7, p. 2752–2756, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146186>>.

CHEN, G.-S.; YU, H.-S.; LAN, C.-C. E.; CHOW, K.-C.; LIN, T.-Y.; KOK, L.-F.; LU, M.-P.; LIU, C.-H.; WU, M.-T. CXC chemokine receptor CXCR4 expression enhances tumorigenesis and angiogenesis of basal cell carcinoma. **The British journal of dermatology**, v. 154, n. 5, p.

910–918, 2006.

COMBADIÈRE, C.; AHUJA, S. K.; MURPHY, P. M. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. **J Biol Chem**, v. 270, p. 16491–16494, 1995.

Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7622448>.

DECLÈVES, a.-E.; MATHEW, a. V.; CUNARD, R.; SHARMA, K. AMPK Mediates the Initiation of Kidney Disease Induced by a High-Fat Diet. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, p. 1846–1855, 2011.

DENG, H.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTMAZ, D.; BURKHART, M.; DI MARZIO, P.; MARMON, S.; SUTTON, R. E.; HILL, C. M.; DAVIS, C. B.; PEIPER, S. C.; SCHALL, T. J.; LITTMAN, D. R.; LANDAU, N. R. **Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.** *Nature*, 1996. .

DOWSLAND, M. H.; HARVEY, J. R.; LENNARD, T. W. J.; KIRBY, J. a; ALI, S. Chemokines and breast cancer: a gateway to revolutionary targeted cancer treatments? **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 7, p. 579–92, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678790>>.

DRAGIC, T.; LITWIN, V.; ALLAWAY, G. P.; MARTIN, S. R.; HUANG, Y.; NAGASHIMA, K. A.; CAYANAN, C.; MADDON, P. J.; KOUP, R. A.; MOORE, J. P.; PAXTON, W. A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. **Nature**, v. 381, n. 6584, p. 667–673, 1996. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nature/journal/v381/n6584/abs/381667a0.html>\n<http://www.nature.com/nature/journal/v381/n6584/pdf/381667a0.pdf>>.

EICKEMBERG, M.; OLIVEIRA, C.; RORIZ, A. K.; SAMPAIO, L. R. Bioimpedância elétrica e sua aplicação em avaliação nutricional Bioelectric impedance analysis and its use for nutritional assessments. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 6, p. 883–893, 2011.

FEINSTEIN, R.; KANETY, H.; PAPA, M. Z.; LUNENFELD, B.; KARASIK, A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 35, p. 26055–26058, 1993.

FENG, Y.; BRODER, C. C.; KENNEDY, P. E.; BERGER, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5263, p. 872–877, 1996.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. **Biochemical Society symposium**, v. 285, n. 70, p. 277–285, 2003.

GAMBELUNGHE, G.; GHADERI, M.; BROZZETTI, A.; DEL SINDACO, P.; GHARIZADEH, B.; NYREN, P.; HJELMSTROM, P.; NIKITINA-ZAKE, L.; SANJEEVI, C. B.; FALORNI, A. Lack of Association of CCR2-64I and CCR5-Delta 32 with Type 1 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes in Adults. **Human immunology**, v. 64, n. 6, p. 629–632, jun. 2003.

GAMBELUNGHE, G.; GHADERI, M.; GHARIZADEH, B.; BROZZETTI, A.; TORTOIOLI,

C.; DEL SINDACO, P.; SANJEEVI, C. B.; HJELMSTRÖM, P.; SIRSJÖ, A.; NYREN, P.; SANTEUSANIO, F.; FALORNI, A. Lack of association of human chemokine receptor gene polymorphisms CCR2-64I and CCR5-Delta32 with autoimmune Addison's disease. **European Journal Of Immunogenetics: Official Journal Of The British Society For Histocompatibility And Immunogenetics**, v. 31, n. 2, p. 73–76, 2004. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=15086346&site=ehost-live>>.

GHARAGOZLOO, M.; DOROUDCHI, M.; FARJADIAN, S.; PEZESHKI, A. M.; GHADERI, A. The frequency of CCR5 Δ 32 and CCR2-64I in southern Iranian normal population. **Immunology Letters**, v. 96, n. 2, p. 277–281, 2005.

GHILARDI, G.; BIONDI, M. L.; TURRI, O.; PATERI, F.; D'ERIL, G. M.; SCORZA, R. Genetic control of chemokines in severe human internal carotid artery stenosis. **Cytokine**, v. 41, n. 1, p. 24–28, 2008.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B AND REL PROTEINS : Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annual review of Immunology**, v. 16, p. 225–260, 1998.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>>.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. **As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas** *Acta Medica Portuguesa*, 2011.

GUZMAN-ORNELAS, M.-O.; PETRI, M. H.; VAZQUEZ-DEL MERCADO, M.; CHAVARRIA-AVILA, E.; CORONA-MERAZ, F.-I.; RUIZ-QUEZADA, S.-L.; MADRIGAL-RUIZ, P.-M.; CASTRO-ALBARRAN, J.; SANDOVAL-GARCIA, F.; NAVARRO-HERNANDEZ, R.-E. CCL2 Serum Levels and Adiposity Are Associated with the Polymorphic Phenotypes -2518A on CCL2 and 64ILE on CCR2 in a Mexican Population with Insulin Resistance. **Journal of diabetes research**, v. 2016, p. 5675739, 2016.

HAUSMAN, D. B.; DIGIROLAMO, M.; BARTNESS, T. J.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, R. J. The biology of white adipocyte proliferation. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 2, n. 4, p. 239–254, 2001.

HIZAWA, N.; YAMAGUCHI, E.; FURUYA, K.; JINUSHI, E.; ITO, A.; KAWAKAMI, Y. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 159, n. 6, p. 2021–2023, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10351956>.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–7, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167474>>. HUBER, J.; KIEFER, F. W.; ZEYDA, M.; LUDVIK, B.; SILBERHUMER, G. R.; PRAGER, G.; ZLABINGER, G. J.; STULNIG, T. M. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles

in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3215–3221, 2008.

HURT, R. T.; EDAKKANAMBETH VARAYIL, J.; MUNDI, M. S.; MARTINDALE, R. G.; EBBERT, J. O. **Designation of Obesity as a Disease: Lessons Learned From Alcohol and Tobacco** *Current Gastroenterology Reports*, 2014. .

HWANG, J.; SON, K. N.; CHAN, W. K.; KO, J.; DOE, S. N.; KWON, B. S.; YONG, S. G.; KIM, J. Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. **Cytokine**, v. 30, n. 5, p. 254–263, 2005.

INOUE, K. E.; SHI, H.; HOWARD, J. K.; DALY, C. H.; LORD, G. M.; ROLLINS, B. J.; FLIER, J. S. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2242–2250, 2007.

JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. **The British Journal of Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 497–504, 1978.

JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L.; WARD, A. Generalized equation for predicting body density of women. **Med. Sci. Sports Exer.**, v. 12, n. 3, p. 175–182, 1980. Disponível em: <http://journals.lww.com/acsm-msse/Fulltext/1980/23000/Generalized_equations_for_predicting_body_density.9.aspx>.

KALEV, I.; OSELIN, K.; PÄRLIST, P.; ZILMER, M.; RAJASALU, T.; PODAR, T.; MIKELSAAR, A. V. CC-chemokine receptor CCR5-del32 mutation as a modifying pathogenetic factor in type I diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 17, n. 6, p. 387–391, 2003.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 253–62, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198162>>.

KARAALI, Z. E.; SOZEN, S.; YURDUM, M.; CACINA, C.; TOPTAS, B.; GOK, O.; AGACHAN, B. Effect of genetic variants of chemokine receptors on the development of myocardial infarction in Turkish population. **Mol Biol Rep**, v. 37, n. 7, p. 3615–3619, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182805>>.

KIRK, E. A.; SAGAWA, Z. K.; MCDONALD, T. O.; O'BRIEN, K. D.; HEINECKE, J. W. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue. **Diabetes**, v. 57, n. 5, p. 1254–1261, 2008.

KITADE, H.; SAWAMOTO, K.; NAGASHIMADA, M.; INOUE, H.; YAMAMOTO, Y.; SAI, Y.; TAKAMURA, T.; YAMAMOTO, H.; MIYAMOTO, K. I.; GINSBERG, H. N.; MUKAIDA, N.; KANEKO, S.; OTA, T. CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1680–1690, 2012.

KOSTRIKIS, L. G.; HUANG, Y.; MOORE, J. P.; WOLINSKY, S. M.; ZHANG, L.; GUO, Y.; DEUTSCH, L.; PHAIR, J.; NEUMANN, A. U.; HO, D. D. A Chemokine Receptor CCR2

Allele Delays HIV-1 Disease Progression and Is Associated with a CCR5 Promoter Mutation. **Nature medicine**, v. 4, n. 3, p. 350–353, mar. 1998.

KUCUKGERGIN, C.; ISMAN, F. K.; CAKMAKOGLU, B.; SANLI, O.; SECKIN, S. Association of polymorphisms in MCP-1, CCR2, and CCR5 genes with the risk and clinicopathological characteristics of prostate cancer. **DNA and cell biology**, v. 31, n. 8, p. 1418–1424, 2012. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=22612293>>.

LEE, B.; DORANZ, B. J.; RANA, S.; YI, Y.; MELLADO, M.; FRADE, J. M.; MARTINEZ-A, C.; O'BRIEN, S. J.; DEAN, M.; COLLMAN, R. G.; DOMS, R. W. Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7450–7458, 1998.

LEE, B.-C.; LEE, J. Cellular and Molecular Players in Adipose Tissue Inflammation in the Development of Obesity-Induced Insulin Resistance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 3, p. 446–462, mar. 2014.

LIU, R.; PAXTON, W. A.; CHOE, S.; CERADINI, D.; MARTIN, S. R.; HORUK, R.; MACDONALD, M. E.; STUHLMANN, H.; KOUP, R. A.; LANDAU, N. R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367–377, 1996.

LUBRANO, C.; VALACCHI, G.; SPECCHIA, P.; GNESSI, L.; RUBANENKO, E. P.; SHUGININA, E. a.; TRUKHANOV, A. I.; KORKINA, L. G.; DE LUCA, C. Integrated Haematological Profiles of Redox Status, Lipid, and Inflammatory Protein Biomarkers in Benign Obesity and Unhealthy Obesity with Metabolic Syndrome. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/490613/>>.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

LUSTER, A. D. Chemokines-chemiotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436–445, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459648>>.

MADANI, R.; KARASTERGIOU, K.; OGSTON, N. C.; MIHEISI, N.; BHOME, R.; HALOON, N.; TAN, G. D.; KARPE, F.; MALONE-LEE, J.; HASHEMI, M.; JAHANGIRI, M.; MOHAMED-ALI, V. RANTES release by human adipose tissue in vivo and evidence for depot-specific differences. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 6, p. E1262–8, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19240255>.

MARTINSON, J. J.; CHAPMAN, N. H.; REES, D. C.; LIU, Y. T.; CLEGG, J. B. **Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion.** *Nature genetics*, 1997. .

MCNICHOLL, J. M.; SMITH, D. K.; QARI, S. H.; HODGE, T. **Host Genes and HIV: The Role of the Chemokine Receptor Gene CCR5 and Its Allele (Δ32 CCR5) Emerging Infectious Diseases**, 1997. .

MELLADO, M.; RODRÍGUEZ-FRADE, J. M.; MAÑES, S.; MARTÍNEZ-A, C. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. **Annual review of immunology**, v. 19, p. 397–421, 2001.

MIYAGISHI, R.; NIINO, M.; FUKAZAWA, T.; YABE, I.; KIKUCHI, S.; TASHIRO, K. C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 145, n. 1-2, p. 135–138, 2003.

MOLLER, M.; SONDERGAARD, H. B.; KOCH-HENRIKSEN, N.; SORENSEN, P. S.; SELLEBJERG, F.; OTURAI, A. B. The Chemokine Receptor CCR5 Delta32 Allele in Natalizumab-Treated Multiple Sclerosis. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 129, n. 1, p. 27–31, jan. 2014.

MURDOCH, C.; MURDOCH, C.; FINN, a; FINN, a. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3032–43, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807766>>.

MURPHY, P. M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 593–633, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011292>>.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HÉBERT, C. a; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. a. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 1, p. 145–176, 2000.

NAKAYAMA, E. E.; TANAKA, Y.; NAGAI, Y.; IWAMOTO, A.; SHIODA, T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. **AIDS (London, England)**, v. 18, n. 5, p. 729–738, 2004.

NIH - NATIONAL INSTITUTO OF HEALTH. **Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. the evidence report, nih publication no. 98-4083.** [s.l: s.n.]v. 158

ORTLEPP, J. R.; KRANTZ, C.; KIMMEL, M.; VON KORFF, A.; VESPER, K.; SCHMITZ, F.; MEVISSSEN, V.; JANSSENS, U.; FRANKE, A.; HANRATH, P.; ZERRES, K.; HOFFMANN, R. Additive effects of the chemokine receptor 2, vitamin D receptor, interleukin-6 polymorphisms and cardiovascular risk factors on the prevalence of myocardial infarction in patients below 65 years. **International Journal of Cardiology**, v. 105, n. 1, p. 90–95, 2005.

OTA, T. CCR5: A novel player in the adipose tissue inflammation and insulin resistance? **Adipocyte**, v. 2, n. June, p. 99–103, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3661115&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

PETRKOVA, J.; CERMAKOVA, Z.; DRABEK, J.; LUKL, J.; PETREK, M. CC chemokine

receptor (CCR)2 polymorphism in Czech patients with myocardial infarction. **Immunology Letters**, v. 88, n. 1, p. 53–55, 2003.

POLENTARUTTI, N.; ALLAVENA, P.; BIANCHI, G.; GIARDINA, G.; BASILE, A.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A.; INTRONA, M. IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 158, n. 6, p. 2689–2694, 1997. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9058802&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/uuid/41A73AE3-73A5-42CB-9FBC-361DCD6F08E6>>.

PRAHALAD, S.; BOHNSACK, J. F.; JORDE, L. B.; WHITING, A.; CLIFFORD, B.; DUNN, D.; WEISS, R.; MOROLDO, M.; THOMPSON, S. D.; GLASS, D. N.; BAMSHAD, M. J. Association of two functional polymorphisms in the CCR5 gene with juvenile rheumatoid arthritis. **Genes and immunity**, v. 7, n. 6, p. 468–75, 2006. Disponível em: <<http://proxy.library.upenn.edu:2219/gene/journal/v7/n6/full/6364317a.html>>.

RAPORT, C. J.; GOSLING, J.; SCHWEICKART, V. L.; GRAY, P. W.; CHARO, I. F. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 29, p. 17161–17166, 1996.

REICHE, E. M. V.; EHARA WATANABE, M. A.; BONAMETTI, A. M.; MORIMOTO, H. K.; AKIRA MORIMOTO, A.; WIECHMANN, S. L.; MATSUO, T.; CARVALHO DE OLIVEIRA, J.; VISSOCI REICHE, F. Frequency of CCR5-Delta32 Deletion in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in Healthy Blood Donors, HIV-1-Exposed Seronegative and HIV-1-Seropositive Individuals of Southern Brazilian Population. **International journal of molecular medicine**, v. 22, n. 5, p. 669–675, nov. 2008.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The Biology of Chemokines and Their Receptors. **Annual review of immunology**, v. 18, p. 217–242, 2000.

ROVIN, B. H.; LU, L.; SAXENA, R. A Novel Polymorphism in the MCP-1 Gene Regulatory Region That Influences MCP-1 Expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 259, n. 2, p. 344–348, jun. 1999.

SAMSON, M.; LABBE, O.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. **Biochemistry**, v. 35, n. 11, p. 3362–3367, 1996.

SANDERS, S. K.; CREAN, S. M.; BOXER, P. A.; KELLNER, D.; LAROSA, G. J.; HUNT, S. W. Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p. 4877–4883, 2000. Disponível em: <<http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046012>\n<http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/165/9/4877.pdf>>.

SANTANGELO, C.; VARÌ, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali dell'Istituto**

Superiore di Sanita, v. 43, n. 4, p. 394–405, 2007.

SCHAFER, A. J.; HAWKINS, J. R. DNA variation and the future of human genetics. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 33–9, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9447590>>.

SCHIPPER, H. S.; PRAKKEN, B.; KALKHOVEN, E.; BOES, M. **Adipose tissue-resident immune cells: Key players in immunometabolism** *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2012. .

SEZGIN, I.; KOKSAL, B.; BAGCI, G.; KURTULGAN, H. K.; OZDEMIR, O. CCR2 Polymorphism in Chronic Renal Failure Patients Requiring Long-Term Hemodialysis. **Internal medicine (Tokyo, Japan)**, v. 50, n. 21, p. 2457–2461, 2011.

SHAHBAZI, M.; EBADI, H.; FATHI, D.; ROSHANDEL, D.; MAHAMADHOSEENI, M.; RASHIDBAGHAN, A.; MAHAMMADI, N.; MAHAMMADI, M. R.; ZAMANI, M. CCR5-Delta32 allele is associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Iranian population. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1205–1209, 2009.

SHRESTHA, S.; STRATHDEE, S. A.; GALAI, N.; OLEKSYK, T.; FALLIN, M. D.; MEHTA, S.; SCHAID, D.; VLAHOV, D.; O'BRIEN, S. J.; SMITH, M. W. Behavioral Risk Exposure and Host Genetics of Susceptibility to HIV-1 Infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 1, p. 16–26, jan. 2006.

SHU, C. J.; BENOIST, C.; MATHIS, D. **The immune system's involvement in obesity-driven type 2 diabetes** *Seminars in Immunology*, 2012. .

SMITH, M. W.; CARRINGTON, M.; WINKLER, C.; LOMB, D.; DEAN, M.; HUTTLEY, G.; O'BRIEN, S. J. **CCR2 chemokine receptor and AIDS progression**. *Nature medicine* UNITED STATES, out. 1997. .

SOLDEVILA, G.; GARCÍA-ZEPEDA, E. A. **The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes** *Signal Transduction*, 2007. .

SONG, G. G.; KIM, J. H.; LEE, Y. H. The chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and type 1 diabetes, Behcet's disease, and asthma: a meta-analysis. **Immunol Invest**, v. 43, n. 2, p. 123–136, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171669>>.

SPARKS, L. M.; XIE, H.; KOZA, R. A.; MYNATT, R.; HULVER, M. W.; BRAY, G. A.; SMITH, S. R. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 1926–1933, 2005.

STEINBERG, G. R.; MACAULAY, S. L.; FEBBRAIO, M. A.; KEMP, B. E. AMP-activated protein kinase — the fat controller of the energy railroad 1. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, v. 84, p. 655–665, 2006.

STRIETER, R. M.; BURDICK, M. D.; GOMPERTS, B. N.; BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P. **CXC chemokines in angiogenesis** *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2005. .

SUN, S.; JI, Y.; KERSTEN, S.; QI, L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. **Annual review of nutrition**, v. 32, p. 261–86, 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4041712&tool=pmcentrez&render type=abstract>>.

SZALAI, C.; DUBA, J.; PROHASZKA, Z.; KALINA, A.; SZABO, T.; NAGY, B.; HORVATH, L.; CSASZAR, A. Involvement of Polymorphisms in the Chemokine System in the Susceptibility for Coronary Artery Disease (CAD). Coincidence of Elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G Genotype in CAD Patients. **Atherosclerosis**, v. 158, n. 1, p. 233–239, set. 2001.

THELEN, M. Dancing to the Tune of Chemokines. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 129–134, fev. 2001.

VALDES, A. M.; WOLFE, M. L.; O'BRIEN, E. J.; SPURR, N. K.; GEFTER, W.; RUT, A.; GROOT, P. H. E.; RADER, D. J. Val64Ile Polymorphism in the C-C Chemokine Receptor 2 Is Associated with Reduced Coronary Artery Calcification. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22, n. 11, p. 1924–1928, nov. 2002.

WHO. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization technical report series**, 1995. .

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight, fact sheet n°311**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

WONG, L. M.; MYERS, S. J.; TSOU, C. L.; GOSLING, J.; ARAI, H.; CHARO, I. F. Organization and Differential Expression of the Human Monocyte Chemoattractant Protein 1 Receptor Gene. Evidence for the Role of the Carboxyl-Terminal Tail in Receptor Trafficking. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1038–1045, jan. 1997.

WU, H.; GHOSH, S.; PERRARD, X. D.; FENG, L.; GARCIA, G. E.; PERRARD, J. L.; SWEENEY, J. F.; PETERSON, L. E.; CHAN, L.; SMITH, C. W.; BALLANTYNE, C. M. T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. **Circulation**, v. 115, n. 8, p. 1029–1038, fev. 2007.

YOSHIMURA, T.; ROBINSON, E. a; TANAKA, S.; APPELLA, E.; KURATSU, J.; LEONARD, E. J. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. **The Journal of experimental medicine**, v. 169, n. 4, p. 1449–1459, 1989.

ZAFIROPOULOS, A.; CRIKAS, N.; PASSAM, A. M.; SPANDIDOS, D. A. **Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. Journal of medical genetics** England, maio 2004. .

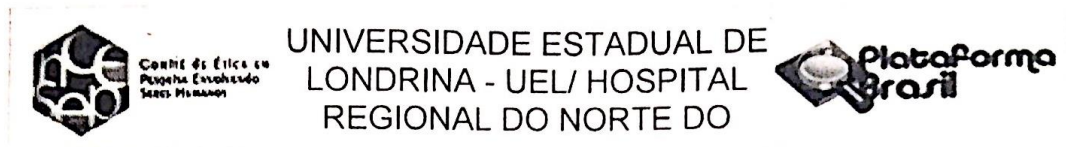
ZAMBRA, F. M. B.; BIOLCHI, V.; BRUM, I. S.; CHIES, J. A. B. CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Human Immunology**, v. 74, n. 8, p. 1003–1008, 2013.

ZHU, Q.; HAN, X.; PENG, J.; QIN, H.; WANG, Y. The Role of CXC Chemokines and Their Receptors in the Progression and Treatment of Tumors. **Journal of molecular histology**, v. 43, n. 6, p. 699–713, dez. 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do polimorfismo genético de receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2 e nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias na população infanto-juvenil e adulta com obesidade no Norte do Paraná.

Pesquisador: Flávia Troncon Rosa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39410314.2.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 996.367

Data da Relatoria: 10/03/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa pretende analisar o polimorfismo genético dos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2 e o nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias na população infanto-juvenil e adulta com obesidade no Norte do Paraná. Para tanto, serão coletadas amostras de sangue periférico de 90 indivíduos obesos e 90 não-obesos infanto-juvenis e adultos para obtenção de DNA e plasma das amostras. Os participantes serão recrutados da Clínica de Educação para Saúde (CEPS) do Centro Universitário Filadélfia durante os atendimentos realizados no Ambulatório de Nutrição.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Analisar o polimorfismo genético dos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2 e o nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias na população infanto-juvenil e adulta com

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



Continuação do Parecer 996.367

obesidade no

Norte do Paraná.

Objetivos específicos

- Selecionar e coletar amostras de sangue periférico de indivíduos obesos e não-obesos infanto-juvenis e adultos para obtenção de DNA e plasma das amostras;
- Avaliar o estado nutricional e caracterizar a composição corporal, massa livre de gordura (MLG) e gordura corporal (GC) dos indivíduos envolvidos na pesquisa;
- Avaliar a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos rs333 do gene CCR5 e rs1799864 do gene CCR2 entre obesos e não obesos, e a associação do risco-relativo entre os parâmetros nutricionais e os genótipos dos polimorfismos estudados;
- Estimar a expressão proteica da IL-6 e TNF no plasma de obesos e não obesos, verificar sua associação com os genótipos dos polimorfismos descritos e estabelecer uma correlação dos efeitos moduladores exercidos por estas citocinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora o presente estudo não resultará em nenhum dano físico, a exceção de algum desconforto relativo a coleta de sangue. No entanto, para minimizar esse risco a coleta será realizada por profissional treinado. Poderá haver algum constrangimento no momento da avaliação do estado nutricional devido a aferição de peso e medida da circunferência abdominal, mas que será minimizado com a privacidade oferecida na sala de avaliação e sigilo absoluto das informações.

Benefícios: espera-se ao final do projeto que sejam identificados alguns marcadores que indiquem se um determinado indivíduo apresenta maior ou menor risco para o desenvolvimento de obesidade e doenças associadas. Dessa forma, futuramente, será possível direcionar as ações preventivas para grupos específicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante considerando que a prevalência de obesidade no Brasil aumentou consideravelmente nos últimos anos. Dados recentes indicam que o tecido adiposo de pessoas obesas está infiltrado por macrófagos, podendo este ser a maior fonte da produção local de citocinas pró-inflamatórias.

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisas Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



Continuação do Parecer: 996.367

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta folha de rosto em nome de pesquisadora da UNIFIL, vinculada e assinada pelo Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da UEL, apresenta TCLE em acordo com a resolução. Apresenta declaração da Clínica de Educação para a Saúde da UNIFIL e do Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos-DNA da UEL. O cronograma apresenta um período grande para coleta de dados de fevereiro de 2015 a agosto de 2016. Apresenta orçamento de R\$ 17.491,00, segundo relato da pesquisadora o projeto será encaminhado para solicitação de auxílio financeiro para agências de fomento de pesquisa estaduais e nacionais.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

LONDRINA, 24 de Março de 2015

Assinado por:

Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo da pesquisa:

“Análise do polimorfismo genético de receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2 e nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias na população infanto-juvenil e adulta com obesidade no Norte do Paraná ”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa **“Análise do polimorfismo genético de receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2 e nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias na população infanto-juvenil e adulta com obesidade no Norte do Paraná”**, realizada na Clínica de Educação para Saúde da UniFil. O objetivo da pesquisa é **verificar se há pequenas alterações nas células do sistema imunológico induzida por pequenas alterações no seu DNA. O DNA é a estrutura celular que identifica e diferencia os seres vivos, contém nossas informações genéticas, que determinam o tipo de cabelo, estatura, cor da pele e da íris dos olhos, bem como a pré-disposição ao desenvolvimento de uma ou outra doença. Essa pesquisa busca estudar se essas pequenas alterações tem relação ou não com a obesidade.**

A sua participação é muito importante para nos ajudar a descobrir essa resposta e, futuramente, melhorar as formas de prevenção e tratamento dessa doença. Se você concordar em participar, será necessário que você e/ou seu filho compareçam 1 vez à Clínica de Educação para Saúde (CEPS) para realização da avaliação do estado nutricional (medidas de peso, altura, circunferência abdominal e avaliação do consumo alimentar) e coletado sangue, somente 3 mL, para as análises de DNA e proteínas relacionadas ao sistema imunológico. Qualquer dúvida ou perguntas podem ser realizadas a qualquer momento do estudo ou durante a coleta para proporcionarmos melhor compreensão. Gostaríamos de esclarecer que a sua participação ou de seu(sua) filho(a) é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo a sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Este material coletado será suficiente para a realização desta pesquisa, portanto não restará material coletado.

Em relação a benefícios, espera-se no final do projeto, identificarmos alguns marcadores que indiquem se um determinado indivíduo tem maior ou menor risco para obesidade. O

presente estudo não resultará em nenhum dano físico, a exceção de algum desconforto relativo a coleta de sangue que, para ser minimizado, será realizada por profissional experiente. Além disso, todas as avaliações e medidas corporais serão feitas em local reservado e os dados mantidos em sigilo absoluto.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar Flávia Luísa Dias (Telefone: 43 99813000; e-mail: flaviald.nutricao@gmail.com) ou Flávia Troncon Rosa (Telefone: 43 96990769; e-mail: flaviatrosa@yahoo.com.br), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

Pesquisador Responsável

Flávia Troncon Rosa

; RG: 33.803.358-0

<p>_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.</p> <p>Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____</p> <p>Assinatura do responsável (pai ou mãe): _____</p> <p>Data: _____</p>

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

ANEXO

ANEXO A
Formulário Anamnese – Projeto Obesidade

FORMULÁRIO ANAMNESE – PROJETO OBESIDADE

Nº _____

Nome: _____ Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: F() M() Telefone: (____) _____ Endereço: _____
--

Dados Antropométricos

Peso: _____ Altura/comprimento: _____ IMC: _____
 Circunferência Abdominal: _____

Bioimpedância

%Gordura: _____ %Água: _____

| *Uso de prótese de metal ou marca-passo ()

Diagnóstico Nutricional segundo os seguintes parâmetros antropométricos

*Crianças <10 anos

Peso/Idade: _____ Diagnóstico nutricional: _____

Peso/Altura: _____

Altura/Idade: _____

IMC/Idade: _____ Diagnóstico nutricional: _____

| * Adolescentes

IMC/Idade: _____ Diagnóstico nutricional: _____

*Adultos/Idosos

IMC: _____

CA: _____

%Gordura: _____

Histórico Familiar

Hipertensão () grau parentesco: _____ obs: _____

Diabetes tipo I () grau parentesco: _____ obs: _____

Diabetes tipo II () grau parentesco: _____ obs: _____

Nefropatia () grau parentesco: _____ obs: _____

Cardiopatia () grau parentesco: _____ obs: _____

Câncer () grau parentesco: _____ obs: _____

| Outras: _____

Dados Doenças Crônicas

Hipertensão ()

Diabetes tipo I ()

Diabetes tipo II ()

Nefropatia ()

Cardiopatia ()

Hepatite ()

Hipotireoidismo ()

Outras: _____

Medicamentos de uso contínuo:

Hábitos de vida

Fumante: _____ Etilista: _____ Atividade Física: _____

Hábitos Alimentares

Hábitos	Frequência semanal				
	7x	6-5x	4-3x	2-1x	Raramente
Consumo de frituras					
Consumo de refrigerantes					
Consumo de carne vermelha					
Consumo de doces					
Consumo de legumes					
Consumo de frutas					
Consumo de integrais					

Consumo de água/dia: _____

Uso de suplementos: _____

Observações:

Nome do entrevistador: _____ Data da coleta: __/__/__