

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

FELÍCIA BIGHETTI SARRASSINI

Identificação de polimorfismos de genes candidatos nos transtornos  
alimentares

Ribeirão Preto  
2012

FELÍCIA BIGHETTI SARRASSINI

Identificação de polimorfismos de genes candidatos nos transtornos  
alimentares

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem em Saúde Pública.

Linha de Pesquisa: Processo Saúde-Doença e Epidemiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosane Pilot Pessa Ribeiro.

Ribeirão Preto  
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sarrassini, Felícia Bighetti  
Identificação de polimorfismos de genes candidatos nos transtornos alimentares. Ribeirão Preto, 2012.  
102 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Processo Saúde-Doença e Epidemiologia.

Orientadora: Ribeiro, Rosane Pilot Pessa.

1. Transtornos da alimentação. 2. Polimorfismo genético. 3. Genes. 4. Anorexia nervosa. 5. Bulimia nervosa.

SARRASSINI, Felícia Bighetti

Identificação de polimorfismos de genes candidatos nos transtornos alimentares

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem em Saúde Pública.

Aprovado em: ..../..../.....

Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese ao meu marido, Diogo, pela cumplicidade, amor e amizade. Obrigada por seu eterno incentivo, compreensão e admiração pelo meu trabalho e por estar ao meu lado nos momentos difíceis e alegres!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS, minha fortaleza e alimento de minha fé!

Aos meus pais, Sandra e Lelo, que possibilitaram a mim a oportunidade do conhecimento, transmissão de sabedoria. Obrigada pelos zelos, preocupações, carinho e eterno incentivo!

Aos meus irmãos, Lê, Pedro e Paulo, meus cunhados, Melissa, Rodolfo, João Marcelo e Marcela e aos meus queridos sogros, Sarrassini e Evanira, sempre cuidadosos e carinhosos comigo!

À minha querida orientadora e amiga, Prof<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. Rosane Pilot Pessa Ribeiro, obrigada pela confiança e também pela coragem ao encarar um desafio como este! Obrigada pelo acolhimento e generosidade! Você é uma inspiração para minha vida profissional!

Ao querido Prof. Dr. José Ernesto dos Santos, pelo convite que me fez para desenvolver esta pesquisa, por acreditar na minha capacidade, proporcionando-me tantas experiências e sabedorias!

Às minhas amigas e companheiras de todas as horas, Tatiana e Marina, meu amor e carinho por vocês estarem presentes na minha vida e me mostrarem o verdadeiro valor de uma amizade! Amo vocês!

À minha coordenadora, Cláudia Haddad Caleiro Pereira, meu eterno agradecimento por estar sempre disponível para me ajudar, incentivando-me a continuar nas minhas conquistas! Você é muito especial!

À Universidade de Franca – UNIFRAN, pelo apoio e incentivo.

À Andreia de Oliveira Cecchi, pela valiosa ajuda! Você foi um diferencial, ajudando-me a aprofundar meus conhecimentos durante esta pesquisa. Obrigada pela generosidade e paciência ao transmitir conhecimentos!

Ao Sérgio Arthur Oliveira Campos, meu carinho e agradecimento, por estar sempre disponível para me ajudar com as dúvidas de estatística. Serginho, você é um exemplo de amor pela profissão!

Á querida Luíza Ferreira Araújo, agradeço a Deus por ter encontrado você no meu caminho! Pessoa generosa, amável e sempre aberta para minhas dificuldades! Você fez toda diferença na conclusão desta tese!

Á Júlia Keiko Sakamoto Hotta que, prontamente, desenvolveu as análises dos meus dados. Muito obrigada!

Á Sandra Luíza Nunes Caseiro, minha terapeuta, que me possibilitou desenvolver espaços e acolhimentos internos. Pela capacidade de escuta e por me ajudar nos vários momentos de angústia, durante esse percurso, sempre me mostrando o lado bom e a possibilidade de aprendizado por meio dessas experiências!

Ás amigas queridas, Carol Coelho e Andreia Anelli, pelo carinho e acolhimento!

Ás pacientes e ex-pacientes do GRATA-HC-FMRP-USP. Sem vocês essa conquista não aconteceria! Obrigada pela compreensão, carinho e por acreditar que a pesquisa pode trazer novas frentes de tratamento para os transtornos alimentares!

Ao grupo controle, em especial à Luciana Martins, Andrea Carla Celotto e Ana Cláudia Silva Reis que gentilmente, me ajudaram a aumentar a amostra. Meu muito obrigada a vocês!

Ao Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública por me proporcionar aprendizado.

Á secretária do Programa, Shirley Figueiredo, por estar sempre disponível e prestativa para me ajudar.

## **MISSÃO DO CORPO**

*Carlos Drummond de Andrade*

*Claro que o corpo não é feito só para sofrer,  
mas para sofrer e gozar.  
Na inocência do sofrimento  
como na inocência do gozo,  
o corpo se realiza, vulnerável  
e solene.*

*Salve, meu corpo, minha estrutura de viver  
e de cumprir os ritos do existir!  
Amo tuas imperfeições e maravilhas,  
amo-as com gratidão, pena e raiva intercadentes.  
Em ti me sinto dividido, campo de batalha  
sem vitória para nenhum lado  
e sofro e sou feliz  
na medida do que acaso me ofereças.*

*Será mesmo acaso,  
será lei divina ou dragonária  
que me parte e reparte em pedacinhos?  
Meu corpo, minha dor,  
Meu prazer e transcendência,  
És afinal meu ser inteiro e único.*



## RESUMO

SARRASSINI, F. B. **Identificação de polimorfismos de genes candidatos nos transtornos alimentares.** 2012. 102 f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Os transtornos alimentares (TA) são quadros psiquiátricos graves, de etiologia multifatorial e a influência genética parece exercer importante papel. Três genes são candidatos em potencial para o desenvolvimento desses quadros e são investigados: o gene do receptor 5-hidroxitriptamina (5-HT<sub>2A</sub>), o do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e do receptor  $\beta$  do estrogênio (ER $\beta$ ). O objetivo deste estudo foi identificar a presença de polimorfismos (SNPs) desses genes em pacientes e ex-pacientes com TA (grupo de pacientes-GP) e em mulheres jovens saudáveis (grupo controle-GC) e foi realizado junto ao Grupo de Assistência em Transtornos Alimentares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Coletaram-se os dados: idade, peso e altura para cálculo do índice de massa corporal (IMC) e aplicou-se o *Eating Atitudes Test* (EAT-26) para excluir possível caso de doença no GC (<21 pontos). Os SNPs foram determinados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para análises estatísticas, utilizou-se o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, 20.0), nas variáveis contínuas (IMC e idade) usou-se o teste ANOVA, na variável dicotômica (presença ou não de SNPs), teste qui-quadrado e regressão logística binária ( $p^a$ ). Como resultados, foram coletados dados de 29 indivíduos do GP e 78 do GC. A idade foi de 26,37 $\pm$ 7,00 anos no GP e 28,65 $\pm$ 6,67 anos no GC ( $p=0,274$ ), o IMC foi de 20,83 $\pm$ 4,47kg/m<sup>2</sup> no GP e 21,56 $\pm$ 1,67kg/m<sup>2</sup> no GC ( $p=0,294$ ), e o EAT-26 foi de 30,34 $\pm$ 18,83 pontos no GP e 7,83 $\pm$ 4,94 pontos no GC ( $p=0,000$ ). Calcularam-se as frequências alélicas e genóticas dos genes e foi feita análise que unia genótipos que possuíam alelos de risco para cada gene. No gene 5HT<sub>2A</sub> 75,8% do GP e 38,4% do GC apresentaram-se os genótipos com o alelo de risco (GA e AA) ( $pX^2=0,253$ ; OR=1,964; IC95%=0,748–5,156 e  $p^a=0,552$ ). No do BDNF, encontraram-se frequências de 96,5% no GP e 96,1% no GC com os genótipos com alelo de risco, MM e MV ( $pX^2=1,00$ ; OR=1,120; IC95%=0,112–11,221 e  $p^a=0,362$ ). No gene do ER $\beta$ , para o SNP presente no éxon 5 (1082 G $\rightarrow$ A), as frequências dos genótipos de risco GA e AA foram de 6,8% no GP e 8,9% no GC ( $pX^2=1,00$ ; OR=0,751; IC95%=0,147–3,841 e  $p^a=0,883$ ), e o SNP situado no éxon 8 (1730 A $\rightarrow$ G), as frequências dos genótipos de risco AG e AA foram de 65,5% no GP e 83,3% no GC ( $pX^2=0,064$ ; OR=0,380; IC95%=0,144–1,002 e  $p^a=0,399$ ). Todas as análises não apresentaram diferença estatística significativa para a presença dos alelos de risco que podem contribuir para o desenvolvimento de TA. Concluiu-se que a heterogeneidade da população brasileira, a baixa incidência da doença e a amostra limitada do GP podem ter influenciado para as semelhanças entre os grupos. Futuros estudos, utilizando marcadores genéticos de etnias e amostras maiores, devem prosseguir na linha promissora da investigação etiológica.

**Palavras-chave:** Transtornos da alimentação. Polimorfismo genético. Genes. Anorexia nervosa. Bulimia nervosa.

## ABSTRACT

SARRASSINI, F. B. **Identification of polymorphisms of candidate genes in eating disorders.** 2012. 102 f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Eating disorders (ED) are serious psychiatric conditions with multifactorial etiology, it seems genetic influence has an important role. Three genes were investigated: the receptor 5-hydroxytryptamine (5-HT<sub>2A</sub>), the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and the Estrogen Receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ). This study aims at identifying the presence of polymorphisms (SNPs) in patients or in ex-patients with ED (Group of patients – GP) and in wealthy women (Control Group – CG). The study was conducted with the Eating Disorders Assistance Group at *Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP*. To calculate the Body Mass Index (BMI), we collected data referring to age, weight and height, we applied the Eating Attitudes Test (EAT-26) to exclude a possible occurrence of disease in the CG (<21 points). The polymerase chain reaction (PCR) was used to determine SNPs. For the statistical analysis we used the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 20.0): for the continuous variables (BMI and age), the ANOVA and for the dichotomous variable (presence or not of SNPs), Chi-square test and Binary logistic regression ( $p^a$ ). There were 29 individuals of the GP and 78 of the CG. The age was  $26,37\pm 7,00$  in the GP and  $28,65\pm 6,67$  in the CG ( $p=0,274$ ), the BMI was  $20,83\pm 4,47\text{Kg/m}^2$  in the GP and  $21,56\pm 1,67\text{Kg/m}^2$  in the CG ( $p=0,294$ ), and the EAT-26 was  $30,34\pm 18,83$  points in the GP e  $7,83\pm 4,94$  points in the CG ( $p=0,000$ ). We calculated the allelic and genotypic frequencies in the genes of the studied groups and afterwards we did an analysis that joined genotypes with risk alleles for each gene. The genes 5HT<sub>2A</sub> 75,8% of GP and 38,4% of the CG presented the genotype with risk allele (GA and AA) ( $pX^2=0,253$ ; OR=1,964; IC95%=0,748–5,156 e  $p^a=0,552$ ). In the BDNF we found frequencies of 96,5% in the GP and 96,1% in the CG with genotypes with risk allele, MM and MV ( $pX^2=1,00$ ); OR=1,120; IC95%=0,112–11,221 e  $p^a=0,362$ ). Regarding the gene ER $\beta$ , for the SNP present in the exon 5 (1082 G→A), the frequency of risk genotypes GA and AA were of 6,8% in the GP and of 8,9% in the CG ( $pX^2=1,00$ ; OR=0,751; IC95%=0,147–3,841 and  $p^a=0,883$ ), and for the SNP located in the exon 8 (1730 A→G), the frequency of risk genotypes AG and AA were of 65,5% in the GP and 83,3% in the CG ( $pX^2=0,064$ ; OR=0,380; IC95%=0,144–1,002 e  $p^a=0,399$ ). There were no significant differences between the studied groups for the presence of risk alleles that may contribute to the development of ED. We concluded that heterogeneity of Brazilian population, the low incidence of the disease in it and the limited sample of GP may have influenced the similarities between the groups. Future studies using genetic markers of ethnicity and a wider sampling may contribute to the promising trend of etiologic investigation.

**Keywords:** Eating disorders. Genetic polymorphisms. Genes. Anorexia nervosa. Bulimia nervosa.

## RESUMEN

SARRASSINI, F. B. **Identificación de polimorfismos de genes candidatos en los trastornos alimentarios.** 2012. 102 f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Los trastornos alimentarios (TA) son cuadros psiquiátricos graves, de etiología multifactorial y en el cual la influencia genética parece jugar un papel importante. Tres genes son candidatos potenciales para el desarrollo de estos cuadros y son investigados: el gen del receptor 5-hidroxitriptamina (5-HT<sub>2A</sub>), el del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) y del receptor  $\beta$  de estrógeno (ER $\beta$ ). El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de polimorfismos (SNPs) de estos genes en pacientes y ex-pacientes con TA (Grupo de Pacientes-GP) y en mujeres jóvenes sanas (Grupo Control-GC), en el Grupo de Atención en Trastornos Alimentarios del Hospital das Clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Los datos recolectados fueron edad, peso y estatura, para cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) y se aplicó el Eating Attitudes Test (EAT-26) para excluir posibles casos de enfermedad en el GC (<21 puntos). Se determinaron los SNPs por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para análisis estadísticos, se utilizó el Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 20.0): en las variables continuas (IMC y edad) se utilizó el test ANOVA, en la variable dicotómica (presencia o ausencia de SNPs) test chi-cuadrado y regresión logística binaria ( $p^a$ ). Como resultados, fueron recolectados datos de 29 individuos del GP y 78 del GC. La edad fue de  $26,37 \pm 7,00$  años en el GP y  $28,65 \pm 6,67$  años en el GC ( $p=0,274$ ), el IMC fue de  $20,83 \pm 4,47 \text{Kg/m}^2$  en el GP y  $21,56 \pm 1,67 \text{Kg/m}^2$  en el GC ( $p=0,294$ ), y el EAT-26 fue de  $30,34 \pm 18,83$  puntos en el GP y  $7,83 \pm 4,94$  puntos en el GC ( $p=0,000$ ). Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes y se llevó a cabo el análisis que unía los genotipos que tenían alelos de riesgo para cada gen. En el gen 5HT<sub>2A</sub> el 75,8% del GP y el 38,4% del GC presentaron los genotipos con el alelo de riesgo (GA y AA) ( $pX^2=0,253$ ; OR=1,964; IC95%=0,748-5,156 y  $p^a=0,552$ ). En el BDNF, se encontraron frecuencias del 96,5% en el GP y del 96,1% en el GC con los genotipos con alelo de riesgo, MM y MV ( $pX^2=1,00$ ; OR=1,120; IC95%=0,112-11,221 y  $p^a=0,362$ ). En el gen ER $\beta$ , para el SNP presente en el exón 5 (1082 G $\rightarrow$ A), las frecuencias de los genotipos de riesgo GA y AA fueron del 6,8% en el GP y del 8,9% en el GC ( $pX^2=1,00$ ; OR=0,751; IC95%=0,147-3,841 y  $p^a=0,883$ ), y el SNP localizado en el exón 8 (1730 A $\rightarrow$ G), las frecuencias de los genotipos de riesgo AG y AA fueron del 65,5% en el GP y del 83,3% en el GC ( $pX^2=0,064$ ; OR=0,380; IC95%=0,144–1,002 y  $p^a=0,399$ ). Los análisis no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa para la presencia de los alelos de riesgo que pueden contribuir al desarrollo de TA. Se concluyó que la heterogeneidad de la población brasileña, la baja incidencia de la enfermedad y la muestra limitada del GP pueden haber influido en las similitudes entre los grupos. Futuros estudios con marcadores genéticos de grupos étnicos y muestras más grandes deben persistir en la línea promisoras de investigación etiológica.

**Palabras clave:** Trastornos de la conducta alimentaria. Polimorfismo genético. Genes. Anorexia nerviosa. Bulimia nerviosa.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Modelo de <i>primer</i> utilizado éxon do 5-HT <sub>2A</sub> .....	49
Quadro 2 - <i>Primer</i> utilizado para amplificação de cada éxon do gene do BDNF e a sequência de intros.....	50
Quadro 3 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação de cada éxon do ER $\beta$ .....	51
Quadro 4 - Classificação do estado nutricional, segundo o índice de massa corporal.....	51
Quadro 5 - Classificação de estado nutricional para adolescentes, segundo percentis.....	52

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1 - Eletroforese dos genes: codificador do receptor da 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT<sub>2A</sub>); do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e do receptor beta do estrogênio (ER $\beta$ ), situados no éxon 5 e éxon 8..... 52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Epidemiologia do estudo: idade, estado nutricional (IMC), EAT-26 e diagnóstico dos grupos de pacientes e ex-pacientes (GP) e controle (GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	56
Tabela 2 - Frequência alélica para cada locus nos grupos estudados (Grupo de Pacientes = GP n= 29 e Grupo Controle = GC n = 78). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	57
Tabela 3 - Distribuição genotípica do gene 5HT2A nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	57
Tabela 4 - Distribuição genotípica do gene BDNF nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	58
Tabela 5 - Distribuição genotípica do gene ER $\beta$ éxon 5 1082 G→A nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	59
Tabela 6 - Distribuição genotípica do gene ER $\beta$ éxon 8 1730 A→G nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	59
Tabela 7 - Análise dos genótipos que possuem alelos de risco nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	60
Tabela 8 - Distribuição de todos os genótipos homozigotos não dominantes nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	61
Tabela 9 - Distribuição de todos os genótipos e os alelos de risco para a doença nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012.....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GRATA-HC-FMRP - Grupo de Assistência em Transtornos Alimentares do Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

DSM-IV-TR - Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, revisado

CID-10 - Código Internacional de Doenças

TA - transtorno alimentar

AN - anorexia nervosa

AN-R - anorexia nervosa do subtipo restritivo

AN-B - anorexia nervosa do subtipo purgativo

BN - bulimia nervosa

TCAP - transtorno do comer alimentar periódico

DNA - ácido desoxirribonucleico

A - adenina

G - guanina

C - citosina

T - timina

Val - valina

Met - metionina

5-HT - serotonina

5-HT<sub>1A</sub> - receptor de serotonina do tipo 1A

5-HT<sub>2A</sub> - receptor de serotonina do tipo 2A

-1438G/A - polimorfismo do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, onde, na posição 1438 da região promotora, pode estar uma guanina ou uma adenina

5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético

CSF - líquido cefalorraquidiano ou cérebro-espinhal

BDNF - Brain Derived Neurotrophic Factor - fator neurotrófico derivado do cérebro

Met66 - metionina na posição 66

Val66Met - substituição de uma valina por uma metionina na posição 66

-196G/A - polimorfismo do gene do BDNF, onde, na posição 196 da região promotora, pode estar uma guanina ou adenina

ERS - receptores de estrogênio

ER $\beta$  - receptor beta do estrogênio

ER $\alpha$  - receptor alfa do estrogênio

ERI - receptor do estrogênio I

-1082G/A - polimorfismo do gene do receptor beta do estrogênio, onde, na posição 1082 da região promotora, pode estar uma guanina ou adenina

-1730G/A - polimorfismo do gene do receptor beta do estrogênio, onde, na posição 1730 da região promotora, pode estar uma guanina ou adenina

OMS - Organização Mundial de Saúde

WHO - Organization Health World

IMC (kg/m<sup>2</sup>) - índice de massa corporal em quilograma por metro quadrado

EAT-26 - teste de atitudes alimentares (*Eating Attitudes Test*)

GC - grupo controle

GP - grupo de pacientes

SNPs - polimorfismo de nucleotídeo simples (*Single Nucleotide Polymorphism*)

PCR - reação em cadeia de polimerase

PB - pares de bases

ANOVA - análise de variância

SPSS - *Statistical Package for Social Sciences*



## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>3.1 Os transtornos alimentares</b> .....	24
<b>3.2 A Genética nos transtornos alimentares</b> .....	25
3.2.1 O gene do receptor 5HT <sub>2A</sub> .....	27
3.2.2 O gene do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF).....	32
3.2.3 O gene do receptor $\beta$ do estrogênio (ER $\beta$ ).....	37
<b>3.3 Contribuições da genética para os estudos nos TAs</b> .....	39
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	42
<b>4.1 Geral</b> .....	43
<b>4.2 Específicos</b> .....	43
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	44
<b>5.1 Tipo e local do estudo</b> .....	45
<b>5.2 Sujeitos e casuística</b> .....	45
5.2.1 Grupo de pacientes e ex-pacientes portadoras de TA (GP).....	45
5.2.2 Grupo controle (GC).....	46
<b>5.3 Critérios de exclusão</b> .....	47
<b>5.4 Procedimentos</b> .....	47
<b>5.5 Questões éticas</b> .....	48
<b>5.6 Determinação dos genótipos</b> .....	49
<b>5.7 Análise de dados</b> .....	51
5.7.1 Avaliação do estado nutricional.....	51
5.7.2 Presença de SNPs.....	52
5.7.3 Análise estatística.....	52
<b>6 RESULTADOS</b> .....	54
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	62

<b>8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>98</b>

## APRESENTAÇÃO

## 1 APRESENTAÇÃO

Desde o ano 2000, tenho participado do Grupo de Assistência em Transtornos Alimentares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (GRATA-HC-FMRP-USP). Como nutricionista de área clínica, desenvolvi várias atividades que me enriqueceram enquanto profissional e me estimularam a continuar estudando esse tema. Além disso, interessei-me em fazer pesquisas sobre essas doenças que, para nós, profissionais de saúde, são muito desafiadoras.

Sendo assim, durante esses anos, concluí a dissertação de mestrado, traduzindo para a língua portuguesa e validando para o Brasil um instrumento de triagem, para identificar possíveis casos de doença, o EAT-26 (teste de atitudes alimentares - *Eating Attitudes Test*), finalizando-o em 2003. Ainda, na parte assistencial, realizei atendimentos individuais dos pacientes com transtornos alimentares e coordenei o grupo destinado aos pais e/ou cuidadores, juntamente com um médico residente em nutrologia e um psiquiatra. Esse grupo de apoio aos familiares existe desde 2001, com finalidade informativa e educativa, possibilitando a atuação no serviço com visão mais profunda e ampliada sobre o funcionamento da dinâmica familiar, contribuindo, assim, para melhor acolhimento aos familiares no tratamento.

No ano 2009, tive participação ativa no planejamento e implementação de um grupo de orientação nutricional para esses pacientes, com frequência semanal e duração de uma hora, com o objetivo de discutir temas sobre nutrição.

Pelo exposto, fica claro que essa temática tem sido o foco principal da minha trajetória profissional. Levando-se em conta o desejo de realizar o projeto de doutorado e por serem essas doenças de difícil tratamento e prognóstico, motivei-me a pesquisar possíveis fatores etiológicos associados a esses quadros, possibilitando o aprimoramento de estratégias terapêuticas para os transtornos alimentares. O desenvolvimento desta pesquisa, apesar dos desafios que apresenta, acredito que contribuirá para maior compreensão desses quadros clínicos.

**JUSTIFICATIVA**

## 2 JUSTIFICATIVA

A literatura tem apontado estudos desenvolvidos com gêmeos idênticos que fornecem evidências que os transtornos alimentares (TA) podem ser herdados, especialmente a anorexia nervosa (AN) (GORWOOD; KIPMAN; FOLON, 2003; KIPMAN et al., 1999).

Em metanálise de investigação realizada com essa população, foram encontrados 55 estudos que observaram que em cerca de 90 pares de gêmeos, havia concordância de 44% em gêmeos homozigóticos e de 12,5% em dizigóticos (KIPMAN et al., 1999). Diante desses resultados, a contribuição de fatores genéticos na etiologia dos TAs é amplamente aceita (COLLIER et al., 1997; RIBASÉS et al., 2004; ROSMOND; BOUCHARD; BJORNTORP, 2002).

Esses resultados, no entanto, nos fazem refletir que, longe de um pré-determinismo genético para explicar a etiologia dos TAs, o modelo mais aceito envolve a relação gene/meio ambiente, no qual as influências socioculturais levam ao desenvolvimento da doença em indivíduos geneticamente suscetíveis.

Os genes envolvidos no comportamento alimentar, na regulação ponderal, na saciedade e no metabolismo energético, assim como outros que controlam a secreção e o metabolismo hormonal, são candidatos para o desenvolvimento da anorexia nervosa (AN) e da bulimia nervosa (BN).

Entre os genes estudados, três têm sido investigados com justificativa convincente. O primeiro é o gene codificador do receptor da 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT<sub>2A</sub>). Os fatos que justificam essas investigações são principalmente os seguintes: a) existem indicações de disfunção no sistema serotoninérgico em pacientes com AN; b) a serotonina tem função importante na regulação do apetite, no comportamento sexual e social; c) modelos animais de AN envolvem mecanismos serotoninérgicos e d) muitos comportamentos ligados à serotonina mostram dimorfismo sexual, o que pode fornecer explicação para a grande diferença entre homens e mulheres em relação à incidência da doença (96% em mulheres) (COLLIER et al., 1997; KAYE; GENDALL; STROBER, 1998; KAYE et al., 1998; RIBASÉS et al., 2004; TREASURE; OWEN, 1997). Outro ponto a se considerar é a maior presença de TA em mulheres. A maioria dos estudos feitos na Europa e nos EUA sugere que a prevalência em mulheres é de 9:1, indicando possível influência

de hormônios sexuais como sinal para o desenvolvimento da doença (KIPMAN et al., 2002).

O segundo gene é o codificador do fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* - BDNF). Trata-se de um fator essencial para a sobrevivência, diferenciação e também está envolvido na eficiência sináptica e plasticidade neuronal (HINNEY et al., 1997).

O terceiro gene candidato refere-se ao estrogênio, que tem implicações no comportamento alimentar, e é descrito seu papel na inibição da alimentação em animais experimentais. Existem demonstrações de que esse hormônio atua aumentando a atividade da colecistocinina, um sinalizador do processo de saciedade. O receptor  $\beta$  do estrogênio (ER  $\beta$ ) é expresso em muitas áreas envolvidas na regulação do apetite do hipotálamo e esses receptores são reguladores da ação anorexígena do estrogênio (KLUMP et al., 2001). Nilsson et al. (2004) exploraram a associação entre polimorfismos desse gene em pacientes com BN e observaram que polimorfismos no éxon 5 (1082 G/A) e no éxon 8 (1730 G/A) associam-se ao desenvolvimento dessa doença.

Diante dessas considerações e compreendendo a etiologia multifatorial dos transtornos alimentares, a biologia genética tem se mostrado campo fértil para a busca de possíveis respostas que poderão auxiliar no planejamento de estratégias terapêuticas mais eficazes.





### 3 INTRODUÇÃO

#### 3.1 Os transtornos alimentares

Os TAs mais conhecidos são a anorexia nervosa (AN) e a bulimia nervosa (BN), considerados transtornos psiquiátricos graves. Afetam principalmente adolescentes e adultos jovens do sexo feminino, podendo ocasionar grandes prejuízos biológicos e psicológicos e aumento de morbidade e mortalidade. Na primeira situação, ocorre o medo mórbido de engordar com redução voluntária e drástica da ingestão alimentar, levando à progressiva e desejada perda de peso, caquexia, inanição e, não raro, à morte. Apresenta, como manifestações físicas, a amenorréia, a hiperatividade, bradicardia, vômitos e lanugo. Já a BN caracteriza-se por surtos de ingestão maciça e compulsiva de alimentos, seguida de vômitos e abuso de laxantes e/ou diuréticos (CORDÁS; SALZANO, 2011; NUNES, 2006).

Os critérios diagnósticos estão estabelecidos tanto pelo DSM-IV-TR quanto pela CID-10. A AN é caracterizada por ser psicopatologia específica por meio da qual o pavor de engordar persiste como uma ideia intrusiva e sobrevalorizada. Ocorre, secundariamente, transtorno endócrino generalizado que é manifestado em mulheres pela amenorreia e nos homens pela perda de interesse e potência sexual. Na BN, encontra-se a preocupação persistente com o comer e o desejo irresistível por comida; o paciente sucumbe a episódios de hiperfagia e essas grandes quantidades de alimentos são consumidas em curtos períodos de tempo. Para neutralizar os efeitos hipercalóricos dos alimentos, um ou mais mecanismos compensatórios são praticados: vômitos autoinduzidos, abuso de laxantes, períodos alternados de jejum, uso de drogas como anorexígenos e diuréticos. Há, frequentemente, mas não sempre, história de episódio prévio de AN, variando de poucos meses a vários anos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA), 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 1993).

Em revisão de literatura sobre a incidência dos TAs, Hoek e van Hoeken (2003) encontraram que a incidência da AN é de, pelo menos, 8/100 mil indivíduos da população por ano, e que, entre as décadas de 1950 e 1980, parece ter aumentado essa incidência entre mulheres jovens, particularmente de 15 a 25 anos de idade, mas também entre aquelas de 10 e 14 anos. A partir de 1980, a incidência

da AN tornou-se estável. Já para BN, há poucos estudos, provavelmente porque o transtorno só foi reconhecido como categoria diagnóstica em 1979. Os trabalhos existentes indicam taxa de incidência de 12/100 mil indivíduos da população e registram também, na década de 1980, aumento substancial de incidência em mulheres. A partir dessa época, a incidência atingiu taxa estável, de 30/100 mil mulheres por ano. Hudson et al. (2007) observaram que a prevalência da AN está entre 0,5 e 1% e para BN varia de 1 a 3%, principalmente em adolescentes do sexo feminino, no início da fase adulta.

Segundo Jacobi et al. (2004), existem várias causas para o aparecimento dos TAs, dentre elas um modelo multifatorial envolvendo aspectos biológicos, psicológicos, socioculturais e familiares.

### **3.2 A Genética dos transtornos alimentares**

A natureza multifatorial da etiologia dos TAs já é amplamente reconhecida, envolvendo fatores como vulnerabilidades biológicas, psicopatologia parental, experiências adversas e pressões socioculturais (MORGAN; CLAUDINO, 2005).

Por serem consideradas doenças complexas, acredita-se que há, também, importante influência genética, resultado da integração de múltiplos genes com o meio ambiente, diferentemente do padrão mendeliano, em que a doença é causada por um único gene.

Para Klump e Gobrogge (2005), é evidente que os genes desempenham papel importante na etiologia da AN. Estimativas de importantíssimos estudos de familiares e de casais sugerem que mais de 50% da etiologia na AN pode ser explicada pelos efeitos genéticos. No entanto, a pesquisa genética molecular da AN está ainda em curso.

O conceito de vulnerabilidade genética encontra sua aplicação prática na compreensão da fisiopatologia da doença, podendo ser útil no desenvolvimento de novas formas de tratamento. A busca por genes candidatos no estudo dos TAs não tem como objetivo substituir ou diminuir a importância das intervenções psicológicas e de outra natureza. Possivelmente, a compreensão dos fatores genéticos poderá apontar quais estratégias psicoterápicas e/ou farmacológicas serão mais eficientes

para determinados subgrupos de pacientes (GALVÃO; PINHEIRO; SOMENZI, 2006).

Segundo Faraone, Tsuang e Tsuang (1999), os estudos de associação e os de ligação são as formas de se estudar genes de suscetibilidade para o desenvolvimento de quadros patológicos em humanos. Os estudos de associação são aqueles em que há amostra de pacientes com AN e amostra de grupo controle, ou seja, os indivíduos que se apresentam saudáveis para essa doença e os indivíduos doentes são comparados uns com os outros, além da frequência de alelos (diversas formas de um gene) ou genótipos nos grupos. Portanto, a maior ou menor frequência de um alelo ou genótipo em pacientes com AN sugere que o gene pode estar associado ao TA. Esses estudos são indicados para os casos conhecidos de fisiopatologia de doenças, ou seja, quando se sugere certo número de genes candidatos, levando em consideração que eles são conduzidos para identificar os genes específicos da região cromossômica que contribuem para a doença.

Já os estudos de ligação são essencialmente técnicas de descobertas que podem ser usadas quando há número menor de hipóteses sobre os tipos de genes que podem contribuir para o transtorno. Esses estudos utilizam famílias com mais de um indivíduo afetado para examinar um número de marcadores genéticos pelo genoma e, em seguida, verificar se alguns desses marcadores são ligados à AN. Essa abordagem essencialmente verifica se os parentes que têm os marcadores dos alelos para o transtorno compartilham, em maior nível, de determinados marcadores nos cromossomos. Usando essa abordagem, os genes específicos não são identificados e, sim, as regiões cromossômicas.

Diante disso, os estudos de associação são conduzidos para identificar os genes específicos da região cromossômica que contribuem para o transtorno. Até o momento, eles têm sido mais realizados do que os de ligação. Essa discrepância tem ocorrido provavelmente devido ao custo e à dificuldade de se adquirir amostras suficientes para estudos de ligação, que exigem famílias que apresentam mais de um indivíduo com a presença da doença. No entanto, tanto os estudos de associação quanto os de ligação têm mostrado resultados significativos e promissores para esse campo de investigação.

Os estudos com gêmeos que apresentam TA demonstraram que considerável parcela do padrão de transmissão familiar observado é devido a efeitos genéticos aditivos. Tais estudos estimam que a herdabilidade da AN esteja entre 33

e 84%, ao passo que a da BN situa-se entre 28 e 83%. O restante da variância genética dos dois transtornos pode ser atribuído aos fatores ambientais específicos e individuais e a pequena influência dos fatores ambientais compartilhados (BULIK et al., 2000).

Muitos traços e sintomas de TA também apresentam um componente de herdabilidade como, por exemplo, episódios de compulsão alimentar (*binge eating*), vômitos autoinduzidos, impulso para a magreza, restrição alimentar e desinibição (SCHIMIDT, 2003).

As pesquisas genéticas e as modernas técnicas de neuroimagem representam avanço importante no esclarecimento das bases biológicas dos fatores que estão envolvidos na etiologia dos TAs – fatores biológicos e distúrbios. Os esforços de pesquisas devem buscar, a partir de agora, maior integração psicossocial como, por exemplo, pesquisas que investiguem a interação entre os genes e o meio ambiente. Vários fatores de risco são comuns na AN e BN e muitas perguntas ainda não foram respondidas. As respostas para várias questões poderão auxiliar na busca por técnicas de tratamento mais eficazes e espera-se que estejam disponíveis nos próximos 10 a 15 anos (GALVÃO; PINHEIRO; SOMENZI, 2006).

Em revisão realizada por Kipman et al. (1999), observou-se que, embora a AN seja um distúrbio complexo envolvendo vários fatores de vulnerabilidade, os fatores genéticos estão significativamente envolvidos no risco individual para essa doença. Diferentes estudos familiares e com gêmeos têm mostrado que, de 0,5 a 0,8 da variância, é em decorrência da influência de fatores genéticos. Nessa revisão, concluiu-se que, em todos os estudos familiares publicados fornecem estimativa da herdabilidade em 0,72 e que todos os estudos publicados com gêmeos, a estimativa da herdabilidade é de 0,71.

### 3.2.1 O gene do receptor 5HT<sub>2A</sub>

A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é um neurotransmissor que contribui para a regulação fisiológica de muitos processos tais como o sono, o apetite e a secreção hormonal (DINAN, 1996; LEMOINE; ALLAIN, 1996). Além disso, ela é um mediador-chave no controle da ingestão alimentar, reduz a ingestão de alimentos e provavelmente está envolvida na etiologia da AN e no controle de

peso (LEIBOWITZ, 1990). Para Steiger, (2004), a 5-HT tem papel bem confirmado na regulação do comportamento alimentar e para Fink e Summer (1996), o papel dela está no controle do apetite, no comportamento sexual, na resposta ao estresse, além de mostrar interação entre o estrogênio e o gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub>. O gene da 5-HT é constituído por quatro éxons separados por três íntrons ao longo de mais de 62 pares de base (CHEN et al., 1992) e está localizado no cromossomo 13q14-q21 (SPARKES et al., 1991). O gene que codifica esse receptor é um forte candidato para a etiologia da AN (GORWOOD et al., 1998). Em estudos de associação de caso-controle, o alelo A do polomorfismo -1438G/A do gene HTR<sub>2A</sub> tem se apresentado como um alelo vulnerável para a AN (COLLIER et al., 1997; NACMIAS et al., 1999).

Vários estudos têm demonstrado que pacientes com AN apresentam redução da atividade central da 5-HT (KAYE et al., 1988; WALSH; DEVLIN, 1998; WOLFE; METZGER; JIMERSON, 1997). Um deles foi realizado com 16 mulheres que haviam se recuperado de anorexia nervosa do subtipo restritivo (AN-R) e com 23 mulheres saudáveis, ou seja, sem nenhum quadro de doenças psiquiátricas, amenorreia e parestesias com o grupo de pacientes. O objetivo foi verificar, nos indivíduos recuperados do quadro clínico de AN-R, se havia redução da ligação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> no cérebro e a possível contribuição no desenvolvimento dos distúrbios do apetite e a AN. Todos foram submetidos, nos 10 primeiros dias da fase folicular, à ressonância magnética e, depois, à tomografia computadorizada. Os dados confirmaram que havia manutenção da alteração da função neuronal de 5-HT no cérebro após a recuperação da AN. Uma possível explicação para esses achados é que a redução da ligação do receptor do 5-HT<sub>2A</sub> é uma resposta compensatória para o aumento do nível extracelular de 5-HT. Ao verificar os valores de índice de massa corporal (IMC) e a classificação do estado nutricional da amostra, observou-se que todos apresentavam variações normais de peso, apesar de as mulheres que apresentaram o diagnóstico de AN-R terem valores de IMC menores em comparação com o grupo controle. Notaram, também, que nenhum estudo anterior demonstrou relação de IMC e a ligação ao receptor 5-HT<sub>2A</sub> no cérebro. Em conclusão, esse estudo corrobora os achados anteriores de alterada transmissão de 5-HT neuronal, após a recuperação da AN. Estudar as mulheres, após longo período de recuperação, pode ser a melhor maneira de identificar fatores que possam estar envolvidos no desenvolvimento de AN. Reforçando esses achados, observa-se que,

após a recuperação da doença, alguns sintomas permanecem, inclusive a redução da ligação ao receptor 5-HT<sub>2A</sub> na AN, podendo ser uma indicação de característica relacionada à alteração de 5-HT (FRANK et al., 2002).

Alterações na atividade da 5-HT estão envolvidas também no distúrbio do humor e no controle dos impulsos (HIGLEY; LINNOILA, 1997; KAYE, 1997; LUCKI, 1998; MANN, 1999). Steiger (2004) evidencia que essas alterações na atividade da 5-HT levam à expectativa de que a AN, na sua forma restritiva, deve coincidir com o aumento do nível de 5-HT, enquanto os quadros caracterizados por compulsão alimentar (como anorexia nervosa do subtipo bulímico – AN-B ou BN) devem corresponder à atividade reduzida desse neurotransmissor.

Kaye et al. (1984), no entanto, documentaram que a secreção do 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético) no fluido cérebro-espinhal na AN-B é mais baixa do que no subtipo restritivo, ou seja, constatou-se que a associação da sintomatologia bulímica mostrou esperada redução do nível de 5-HT.

Esse mesmo grupo de pesquisadores notou também que pacientes totalmente recuperados da AN, submetidos à tomografia computadorizada, apresentaram elevada secreção do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no fluido cérebro-espinhal e elevada ligação com o receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Esses achados sugerem que, no início do quadro de AN, deve haver aumento do nível de 5-HT, que é mascarado durante o curso da doença devido à consequente desnutrição, que leva à redução da atividade de 5-HT. Os autores concluíram que, durante o desenvolvimento da doença, há distorção da presença de traços hiperserotoninérgicos na fisiopatologia da AN (KAYE; FRANK, 2002; KAYE et al., 1991). Já em pacientes com BN, há redução do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no fluido cérebro-espinhal, principalmente quando ocorrem episódios de compulsão alimentar (JIMERSON et al., 1992).

Reforçando esses achados, em indivíduos com desnutrição que sofrem de AN, há redução do principal metabólito da 5-HT, o ácido-5-hidroxi (5-HIAA) no líquido cefalorraquidiano (CSF), que permanecem elevados em indivíduos que se recuperaram da AN. É importante notar que o sistema de 5-HT envolve 14 ou mais receptores e interage com muitos outros neurotransmissores e moléculas. Apenas alguns desses componentes podem atualmente ser medidos *in vivo* em seres humanos. Mesmo assim, estudos de imagem da atividade funcional de 5-HT são úteis, embora a complexidade dos ciclos de 5-HT não possa ser totalmente

elucidada em humanos. Estudos de tais imagens podem caracterizar diferenças de potencial de doença e traços entre indivíduos com AN e grupo controle, e serem apresentados para relacionar o modelo de atividade de 5-HT ao comportamento, fornecendo novas estratégias mais eficazes como alvos de tratamento (KAYE; FUDGE; PAULUS, 2009).

Estudos de imagem do cérebro mostram que indivíduos que estão em tratamento de algum TA e indivíduos que já apresentaram a doença comparados com indivíduos saudáveis, têm significativo aumento na ligação de receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub> e diminuição na ligação de receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>2A</sub> (AUDENAERT et al., 2003; BAILER et al., 2005; FRANK et al., 2002; TIIHONEN et al., 2004).

Comportamentos observados após a recuperação da AN e BN, como obsessão com a imagem corporal e perfeccionismo, geralmente não aparecem no comportamento de pessoas com baixos níveis de 5-HIAA. Esses dados suportam a hipótese de que o aumento da concentração de 5-HIAA no CSF pode estar associado à exagerada preocupação com consequências negativas (exemplo: evitar danos), ao passo que a ausência de tais preocupações pode explicar impulsos e atos agressivos que estão associadas ao baixo nível dessa substância (KAYE et al., 2000).

Número considerável de estudos em animais e humanos sugere que a alteração da atividade da 5-HT no sistema nervoso central pode contribuir para alterações do comportamento e do apetite, encontradas em pacientes com diagnóstico de AN. Por exemplo, o aumento intrassináptico da 5-HT, ou ação direta dos receptores de 5-HT, tende a reduzir o consumo alimentar (BLUNDELL, 1984; LEIBOWITZ; SHOR-POSNER, 1986).

Em estudo realizado por Kaye, Gendall e Strober (1998), foram investigadas 30 mulheres que haviam se recuperado plenamente da BN por mais de um ano, sem atitudes purgativas, com o peso normal e o ciclo menstrual regular, além de um grupo controle com 31 mulheres saudáveis. Foi mensurado o nível do 5-HIAA no fluido cérebro-espinhal, observando-se anormal elevação desse fluido, ou seja, aumento no metabolismo da 5-HT no grupo de ex-bulímicas em comparação com o grupo de mulheres saudáveis. O persistente aumento do nível da 5-HT e anormalidade no comportamento em pacientes após a recuperação da BN traz a

possibilidade de que essas alterações comportamentais podem ser um traço relacionado à doença, contribuindo para a patogênese da BN.

Curiosamente, estudos de Cowen et al. (1996) demonstraram que a dieta está associada a alterações significativas na atividade pró-sináptica de 5-HT, mais em mulheres do que em homens. Esse achado não apenas associa a dieta ao metabolismo da 5-HT como, também, pode ser uma das causas para o desenvolvimento de TA. Também, sugere que a prevalência desproporcional de desreguladores endócrinos em indivíduos do sexo feminino pode ser parcialmente atribuída ao gênero ligado à sensibilidade serotoninérgica.

A influência da desnutrição ou da prática de dietas restritivas é conhecida por promover redução na disponibilidade de triptofano. Dessa forma, a característica nutricional da dieta pode resultar em redução da síntese de 5-HT no cérebro (GOODWIN et al., 1987). Estudos em animais mostraram que dieta alimentar restritiva, a longo prazo, reduz a atividade central de recaptação do transportador da 5-HT (HUETHER et al., 1997).

Kaye e Weltzin (1991) argumentaram que a compulsão alimentar também pode afetar o equilíbrio de 5-HT, pois a excessiva ingestão de carboidratos, durante episódios de compulsão alimentar pode aumentar a disponibilidade de triptofano no cérebro, acelerando a liberação cerebral de 5-HT e, finalmente, mobilizando a baixa regulação compensatória de receptores pós-sinápticos de 5-HT.

Por outro lado, resultados obtidos em amostras de indivíduos que não apresentaram desregularidades endócrinas também apresentaram baixos níveis de ansiedade ou de compulsão com o aumento do nível de 5-HT (SWEDO et al., 1992).

Estudo experimental, realizado em ratos, com a finalidade de identificar a 5-HT e os receptores de dopamina, demonstrou que há padrão uniforme da distribuição desses dentro de cada lóbulo da glândula pituitária. Os resultados forneceram a primeira identificação de receptores de 5-HT na glândula pituitária e confirmaram a distribuição heterogênea de receptores de dopamina no interior dessa glândula em ratos. Esses dados forneceram evidências adicionais para a importância da dopamina na regulação da função pituitária, sugerindo papel fisiológico para a 5-HT na regulação da secreção hormonal pituitária. Além disso, os ratos que estavam sob estresse prolongado, apresentaram alterações nas taxas da síntese de 5-HT e sensibilidade decorrente de vários receptores de 5-HT (SOUZA, 1986).



Steiger et al. (2001) exploraram as implicações de traumas da infância (abuso físico e sexual graves) para atividade da serotonina em mulheres com e sem BN. Os resultados desse estudo, associados a "ser bulímica" ou "ter sido abusada", foram consistentes com a ideia de que o abuso infantil pode estar associado a um estado hiposserotonérgico, também visto em muitas mulheres com BN. Assim sendo, é possível que o abuso infantil contribua para a sensibilidade constante do sistema de 5-HT e, se assim for, tais efeitos podem aumentar a suscetibilidade, em indivíduos sensibilizados, a uma desregulação serotonérgica, como o comportamento alimentar ou outros fatores, como estresse ou quadro depressivo, que podem influenciar nesse sistema (STEIGER, 2004).

Aubert et al. (2000) estudaram o receptor do polimorfismo do gene do 5-HT (5-HT<sub>2A</sub>; 1438G/A), mostrando que esse polimorfismo pode influenciar na ingestão de alimentos e de álcool em uma população adulta com sobrepeso, pois o alelo A estava associado à redução significativa de energia e de álcool, com tendência à menor ingestão de proteínas, gorduras e carboidratos.

Steiger (2004) em sistemático trabalho de revisão da literatura, salientou, que na melhor das hipóteses, os métodos e achados disponíveis de 5-HT prestam-se a interpretações ambíguas dos resultados que refletem as diferenças relacionadas com a mensuração, fases da doença, as regiões cerebrais e outros fatores. No entanto, em geral, parece que as evidências resumem-se em: AN e BN resultam em alterações gerais na função cerebral de 5-HT e há evidências de desregulação serotonérgica sem alguma tendência única, ou seja, para redução ou elevação da 5-HT, na qual é emergente em qualquer desordem. Ainda, o autor concluiu que em pacientes com AN-R, há demonstração de propensão para o aumento do nível serotonérgico da 5-HT.

### 3.2.2 O gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* – BDNF)

Segundo Leibrock et al. (1989), o BDNF é uma proteína pertencente à família da neurotrofina que está envolvido nos neurônios de diferenciação, proliferação e sobrevivência do sistema nervoso. É conhecido não só por promover o crescimento neuronal e a conexão sináptica na diferenciação e reparação neuronal,

mas, também, por modular o comportamento alimentar (LEWIN; BARDE, 1996; LINDSAY et al., 1994; SNIDER; JOHNSON, 1989; THOENEN, 1995).

Nos últimos anos, houve grande interesse pelas funções do gene do BDNF exercidas no cérebro e que estão envolvidas com o comportamento, a homeostase energética e o controle de peso. Além disso, o BDNF fornece suporte trófico para liberação de noradrenérgicos, neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos, entre outros, cujos neurotransmissores são alterados em muitas doenças mentais (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004).

Há estudos sugerindo que as neurotrofinas estão envolvidas em doenças mentais, devido à alteração sináptica em que o gene do BDNF desempenha papel fundamental (BERSANI et al., 2000; LANG; JOCKERS-SCHERUBL; HELLWEG, 2004). Essa alteração sináptica possivelmente acontece devido ao polimorfismo Val66Met (196G/A) do gene do BDNF (MIM 113505), o qual altera a regulação adequada da secreção do gene do BDNF (CHEN et al., 2004; EGAN et al., 2003).

Vários estudos experimentais demonstraram que o efeito do BDNF e do seu receptor tirosina-quinase são expressos em vários núcleos hipotalâmicos relacionados à regulação da ingestão alimentar e, tanto a administração central quanto a administração periférica do BDNF, proporcionam a diminuição da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, o qual melhora o quadro hiperinsulínico e hiperglicêmico em ratos diabéticos (KERNIE; LIEBL; PARADA, 2000; NAGAKAWA et al., 2000; NONOMURA et al., 2001; TSUCHIDA et al., 2001).

Em outro estudo com ratos heterozigóticos, um grupo de animais apresentava um alelo funcional do gene do BDNF e um outro grupo, o gene do BDNF, foi suprimido dos neurônios cerebrais excitatórios. Demonstrou-se que, nesse segundo grupo, os ratos exibiram ingestão maciça de alimentos que se aproximava do comportamento alimentar compulsivo em humanos, levando a significativo ganho de peso corporal até se tornarem ratos obesos. Coletivamente, esses resultados sugerem que a sinalização presente nas regiões do sistema nervoso central do gene do BDNF, sob a influência de seu receptor da tirosina-quinase (TrKB) e expressos no hipotálamo, regulam a atividade da saciedade. Acredita-se que ela está provavelmente envolvida na regulação da homeostase energética, demonstrando alterações em sua função ou padrão de expressão. Sendo assim, seria um fator de maior predisposição ao desenvolvimento de TA, especialmente envolvendo a compulsão alimentar (KERNIE; LIEBL; PARADA, 2000).

Há evidências substanciais de que os fatores genéticos contribuem para a vulnerabilidade biológica para os TAs. Portanto, variantes funcionais do gene do BDNF poderiam desempenhar papel na suscetibilidade genética para BN ou podem predispor indivíduos afetados para alguns aspectos fenotípicos dos distúrbios alimentares (GRICE, 2004).

O polimorfismo de nucleotídeo simples ou *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) do gene do BDNF foi primeiro descrito por Egan et al. (2003), demonstrando que uma valina (G196) foi substituída por uma metionina (A196) na região 5' da proteína do gene humano do BDNF, na posição 66. Essa mudança afeta o tráfico intracelular e a atividade dependente da secreção do gene do BDNF. Esse SNP (banco de dados rs6265) está localizado no cromossomo 11p13-11p14, que codifica o peptídeo precursor (ProBDNF) do gene do BDNF (HANSON; SEAWRIGHT; VAN HEYNINGEN, 1992).

Monteleone et al. (2006) realizaram primoroso estudo com o gene do BDNF, cujo objetivo foi explorar as frequências do SNP 196G/A do gene do BDNF em mulheres com BN e controles saudáveis para investigar se o SNP 196G/A do gene BDNF estava associado a características fenotípicas da BN e transtorno da compulsão alimentar periódica (TCAP). Eles observaram que esse SNP demonstrou-se significativamente associado ao comportamento de compulsão alimentar em indivíduos diagnosticados com esses quadros, ou seja, pacientes com o genótipo AA exibiram frequência semanal de compulsão alimentar significativamente mais elevada em comparação com os grupos de genótipos diferentes. No entanto, sugere-se que o SNP 196G/A do gene não parece representar fator de maior vulnerabilidade para BN, mas pode predispor à compulsão alimentar mais intensa no comportamento alimentar.

Estudos experimentais realizados em ratos sugerem que a hiperfagia pode afetar a relação entre o nível de BDNF e a regulação da ingestão alimentar por agir como um fator anorexígeno. Estudos genéticos em seres humanos demonstraram que as mutações nos genes do BDNF, ou de seu receptor (TrkB), podem ser responsáveis por certas formas de obesidade ou outras formas de distúrbios alimentares. Uma vez que os níveis circulantes de BDNF se correlacionam ao TA em seres humanos e os tratamentos periféricos com BDNF reduzem a hiperfagia e a hiperglicemia em roedores diabéticos e obesos, um papel endócrino do BDNF parece possível e requer investigação mais aprofundada. A ação central

anorexígeno do BDNF também foi documentada, com foco primário sobre o hipotálamo e destaque mais recente sobre o tronco cerebral integrador da homeostase energética, o complexo vagal dorsal. Acredita-se que essas evidências experimentais apontam o BDNF como um componente de sinalização de regulação da ingestão de alimentos, com ênfase especial sobre a localização da ação central anorexígeno do BDNF (BARIOHAY et al., 2005; LEBRUN et al., 2006).

Arija et al. (2010) realizaram estudo com pré-adolescentes com amostra inicial de 1.336 crianças caucasianas (idade média=11,37 anos), havendo um grupo de risco para TA (n=141) e um grupo controle (n=117), os quais foram selecionados pelo teste infantil de atitudes alimentares. Dois anos mais tarde, eles foram reclassificados em grupo de risco para TA (n=41) e controle grupo (n=159), usando o teste de atitudes alimentares (EAT). O diagnóstico de indivíduos com risco para o desenvolvimento de TA foi confirmado por meio de uma entrevista diagnóstica para crianças e adolescentes. Também foram coletados dados de IMC, consumo de energia e o SNP Val66Met (196G/A) do gene BDNF, em todos os grupos. Os objetivos foram determinar a relação entre a frequência do SNP Val66Met (196G/A) do gene do BDNF e o risco para o desenvolvimento de TA, estabelecer a associação entre alterações genéticas e o risco para o desenvolvimento dessas doenças, observar os efeitos das alterações genéticas no IMC e avaliar a ingestão calórica e a evolução do risco para o desenvolvimento de TA. Eles verificaram que alta porcentagem da população geral apresentava o SNP Val66Met (196G/A) do gene do BDNF (33,7%), mas não houve nenhuma relação direta entre a presença desse SNP e o risco do desenvolvimento de TA. Observou-se a presença do SNP em indivíduos com maior restrição de ingestão de energia (507Kcal/dia). Nenhuma relação direta foi encontrada entre o IMC e a presença do SNP. Os autores sugerem outros estudos com maiores amostras, monitoramento, a longo prazo, e a presença de quadros clínicos de TA para compreender melhor esse fenômeno.

Estudos realizados sobre a fisiologia em modelos animais têm demonstrado que o BDNF induz a supressão do apetite e promove a redução do peso corporal, por um mecanismo central, que pode envolver o sistema neurotransmissor serotoninérgico. Esse mecanismo fortalece a hipótese de que alterações nesse sistema neurotrófico e o efeito de mediadores centrais podem determinar alterações no comportamento alimentar predispondo o desenvolvimento de AN e BN (PELLEYMOUNTER; CULLEN; WELLMAN, 1995; RIOS et al., 2001).

Várias linhas de evidência indicam o papel dessa neurotrofina (BDNF) no comportamento alimentar e sugerem que alterações na sua função, ou padrão de expressão poderiam ser consideradas fatores de suscetibilidade para o desenvolvimento de TA. Portanto, a caracterização do gene BDNF humano poderá auxiliar nessa hipótese (NAKAYAMA et al., 1994; OHARA et al., 1992).

Ribasés et al. (2004), com o objetivo de ampliar essa investigação, realizaram grande estudo caso-controle com 1.142 pacientes caucasianos com TA, onde avaliaram seis grupos independentes em cinco países europeus (França, Alemanha, Itália, Espanha e Reino Unido), participantes de um projeto que pesquisava "Alimentação Saudável". Eles analisaram a variante Val66Met e outro SNP, localizado na região promotora do gene BDNF (-270 C→T), em pacientes diagnosticadas com AN-R, AN-B (compulsivo/purgativo) e BN, além de alguns fenótipos relacionados aos TAs, tais como IMC e à época de início da perda de peso corporal. A análise revelou que, devido à variabilidade interpopulacional, houve significativo resultado estatístico no alelo Met66 associado aos quadros alimentares. Quando foram analisados os resultados por centros, também encontrou-se associação positiva entre o gene do BDNF e TA. Esses dados forneceram forte evidência da associação entre pacientes diagnosticadas com AN e BN e o gene BDNF.

Maisonpierre et al. (1991), como estudo referência, detectaram um SNP do gene do BDNF da variante Val66Met, o 196G/A, codificado no éxon desse gene, aparecendo em 44% dos pacientes com TA. Ainda nesses achados, observaram significativa associação entre o alelo Met66 da variante Val66Met do gene do BDNF em casos de AN-R e baixo IMC, ou seja, em quadros de desnutrição. Entretanto, o principal resultado desse estudo foi a forte associação entre AN-R e baixo IMC com o alelo de risco do gene do BDNF.

Ribasés et al. (2003), realizaram análise por reação em cadeia de polimerase (PCR) em 95 pacientes espanholas com TA, com a finalidade de identificar variações na sequência desse gene, o BDNF. Por meio do sequenciamento dos produtos de PCR, observaram alterações importantes onde quatro variações de nucleotídeos foram identificadas. Uma delas apresentou um SNP que foi detectado por Kunugi et al., em 2001, que consiste em uma transição do C→T no éxon 2, localizado com 270pb na região codificada do BDNF. Esse SNP apareceu em 8% dos pacientes com TA.

Esses resultados suportam a hipótese inicial sobre a contribuição do BDNF nas alterações do comportamento alimentar e na regulação do peso corporal. Ainda, sugerem que a variante Met66 do gene do BDNF pode estar envolvida na suscetibilidade dos quadros de TA e que a sua participação é altamente significativa na AN-R e em indivíduos com baixo IMC. No entanto, maiores estudos em outras populações e famílias são necessários para evitar estratificações populacionais que levem a associações de resultados falso-positivos (MAISONPIERRE et al., 1991).

### 3.2.3 O gene do receptor $\beta$ do estrogênio (ER $\beta$ )

O estrogênio é conhecido por regular a diferenciação do crescimento celular, de tecidos reprodutores e em não reprodutores. Os efeitos do estrogênio são mediados por receptores de estrogênio (ERS), sendo que dois diferentes subtipos foram identificados, nomeados como receptores do estrogênio alfa (ERS $\alpha$ ) e receptores do estrogênio beta (ERS $\beta$ ) (GREEN et al., 1986; GREENE et al., 1986; KUIPER et al., 1996). Segundo Herynk e Fuqua (2004), o estrogênio também está envolvido na regulação do desenvolvimento, crescimento e função de diversos sistemas, sendo alguns deles os órgãos reprodutivos humanos, glândulas mamárias, sistemas esquelético e nervoso. As alterações estrogênicas podem estar associadas a vários tipos de doenças, como as de mama, do endométrio, mama e ovário, osteoporose, distúrbios alimentares e depressão.

Embora os ERs estejam presentes em diferentes tecidos, individualmente há importante diferença na função desses dois subtipos. O ER $\alpha$  está presente predominantemente nos clássicos tecidos-alvo dos estrogênios, tais como glândulas mamárias e do endométrio. Em contrapartida, o ER $\beta$  está principalmente presente em tecidos que foram identificados recentemente como alvos, sendo eles, cólon, próstata e tecidos epiteliais (CAMPBELL-THOMPSON; LYNCH; BHARDWAJ, 2001).

O envolvimento da via estrogênica na AN vem sendo sustentado por várias vertentes. Uma delas é a do predomínio do sexo feminino, resultando numa proporção de 9 mulheres para cada 1 a 3 homens (HUDSON et al., 2007; RAMOZ; VERSINI; GORWOOD, 2007). Outra hipótese é a de que o início da puberdade está correlacionado com a presença de picos de estrogênio. Uma outra possibilidade,

porém pouco investigada, mas que está em destaque em alguns estudos atuais, é a de que os hormônios sexuais exercem papel de risco no desenvolvimento de TA (BAKER et al., 2009; CULBERT et al., 2008).

Em recente estudo, realizado por Versini et al. (2010), com o objetivo de identificar possível associação entre o receptor de estrogênio na AN, houve redução do nível de estradiol de forma mais importante no subtipo restritivo do que no subtipo purgativo. Os autores concluíram que há evidências de variações comuns do gene do receptor de estrogênio I (ESRI) associadas aos TAs, mais especificamente na AN-R, mostrando o possível envolvimento na via hormonal estrogênica.

Em pesquisa experimental, realizada por Laflamme et al. (1998), observou-se, em ratos, que o ER $\beta$  está presente em muitas áreas do sistema nervoso central, por exemplo, no hipotálamo, área do cérebro conhecida por estar envolvida na regulação do apetite e da saciedade, sendo que tanto o ER $\alpha$  quanto o ER $\beta$  estão presentes nessa área. Mais tarde, Liang et al. (2002), também utilizando ratos, detectaram que o ER $\beta$  estava envolvido na regulação da ação anorexígena do cérebro.

A partir desses achados, as pesquisas foram estimuladas a buscar a influência genética desse receptor associado aos TAs. Nesse caminho, Rosenkraz et al. (1998), em estudo sistemático de mutação gênica do ER $\beta$ , identificaram cinco diferentes variações genéticas. Apenas duas dessas variações apresentaram frequência alélica de mais de 1% para o alelo menos comum. Os SNPs 1082 G $\rightarrow$ A e 1730 A $\rightarrow$ G não apresentaram associação com os fenótipos em estudo. Esses SNPs foram posteriormente analisados para verificar a associação entre disfunções ovulatórias e ER $\beta$ , incluindo a síndrome do ovário policístico, podendo estar associados às alterações ovulatórias em pacientes com doenças de causas desconhecidas.

Estudo realizado por Nilsson et al. (2004), cujo objetivo foi descrever a associação entre o gene do SNP ER $\beta$  em pacientes com BN, observou que esses pacientes e indivíduos com transtorno alimentar não especificado (TANE) não mostraram associação com o gene do SNP ER $\beta$ . Já a irregularidade menstrual está dependentemente associada a esses SNPs. Portanto, as observações clínicas não mostram distinção do alelo de risco para a doença entre mulheres bulímicas em comparação àquelas que não apresentaram a doença. Curiosamente, o ER $\beta$  está

localizado no cromossomo 14q numa região recentemente identificada para atender a um critério de possível ligação gênica com a BN.

Há hipótese de que a redução da função do ER $\beta$  pode contribuir para a doença, baseando-se no papel potencial do hormônio sexual feminino, sinalizando para o desenvolvimento da compulsão alimentar juntamente com o fato de que mulheres com bulimia frequentemente apresentam irregularidades menstruais (NILSSON et al., 2004).

Diante desses estudos, os importantes achados adivindos dos mesmos podem abrir novas abordagens terapêuticas para esses transtornos do comportamento alimentar (BAKER et al., 2009; CULBERT et al., 2008).

### **3.3 Contribuições da genética para os estudos nos TAs**

A maior e mais importante contribuição para os estudos genéticos foi a implementação do sequenciamento de DNA em larga escala, a qual permitiu a realização de um dos feitos científicos mais importantes da humanidade: o sequenciamento do genoma humano. Esse procedimento representa um passo essencial no entendimento da biologia humana e no planejamento racional de pesquisas biomédicas. A finalização do sequenciamento do material genético entusiasmou as buscas de novas abordagens para se determinar o risco associado a uma determinada doença e, também, o desenvolvimento de terapias individualizadas. A informação genética deve ser usada como mapeamento, a partir do qual oferece possibilidade para compreender a base das doenças e da variação genética pela análise da complexidade e do comportamento das regiões reguladoras, genes e proteínas, funções gênicas e sistemas celulares. É crucial associar as informações genéticas com dados clínicos, étnicos e informações ambientais, a fim de se obter visão ampla da doença. Com a informação genética disponível, pode-se, por exemplo, criar bancos de dados de variações genéticas, buscando terapia personalizada baseada no perfil genético dos pacientes (OJOPI et al., 2004).

Segundo Lander e Weinberg (2000), a identificação do DNA entre duas pessoas pode revelar muitas semelhanças. Embora os genomas sejam aproximadamente 99,9% idênticos, ainda há muitas diferenças entre os milhares de



pares de bases de nucleotídeos que compõem o genoma (estima-se 3,2 bilhões de pares de bases no genoma humano). Isso é válido para qualquer etnia e aniquila o conceito de raça.

Devido a esse fato, há a suscetibilidade para determinadas doenças e as diferentes respostas a medicamentos para cada indivíduo. Essas variações, no entanto, podem aparecer como substituições de um único nucleotídeo, os SNPs. A alta frequência de variações, na maioria dos genes humanos ou de todos eles, é que provavelmente constitui a base da predisposição genética a doenças. A combinação dos SNPs é que formam os genótipos, os quais são únicos para cada indivíduo, e essa mesma combinação genética nunca mais se repete (OJOPI et al., 2004).

Segundo o International SNP Map Working Group (2001), a maioria (90%) de todas as variações são SNPs; sendo assim, mais de 1,42 milhões de SNPs já foram identificados e esse número tende a aumentar cada vez mais, possibilitando novas estratégias de pesquisas e possíveis tratamentos.

Um elemento-chave no quebra-cabeça das doenças genéticas é a compreensão da variação genética no genoma. O lado favorável dos SNPs, especialmente nas doenças neuropsiquiátricas, consiste no seu baixo custo e relativa facilidade de estudo. Cada célula nucleada do corpo possui o mesmo conteúdo de DNA. Esse DNA é estável, independentemente da idade, uso de drogas, presença ou ausência de crises. No entanto, a simples coleta de um pequeno volume de sangue ou esfregaço bucal já permite a avaliação de centenas de SNPs (OJOPI et al., 2004).

Para Cardon e Bell (2001), os estudos de associação são vulneráveis à estratificação da população que resulta em etnia (e potencialmente diferenças genéticas) entre grupos de pacientes e grupos-controle, ou seja, entre aqueles que apresentam a doença e aqueles que são saudáveis para tal (KLUMP; GOBROGGE, 2005).

Apesar de bastante promissora e estimulante, a pesquisa genética de TAs no Brasil enfrenta muitos desafios. O primeiro refere-se ao elevado custo para esse tipo de pesquisa e pelo tempo de trabalho, que não deixa de ser um processo demorado. Exige, também, a cooperação de vários centros especializados em atendimento de TA para garantir amostras significativas. Nos últimos 15 anos, o conceito sobre a etiologia dos TAs passou por grande revolução. O campo é agora compelido a integrar o conhecimento do papel da genética juntamente com fatores

sociais, psicológicos e familiares para compreender o risco desses transtornos. É também significativo que, até agora, a pesquisa genética dos TAs é avançada em grandes centros internacionais como os da Europa e América do Norte.

O desenvolvimento de projetos de pesquisa genética em países em desenvolvimento é essencial e integrará uma nova perspectiva na etiologia biológica dos TAs. Os esforços de colaboração são de extrema importância, como financiamentos realizados por instituições governamentais ou privadas, e coordenadores capacitados para tal. No entanto, vários fatores precisam ser levados em consideração, desde a colaboração de profissionais ou acadêmicos treinados e que têm experiência na assistência dos TAs, a fim de avaliar as atitudes alimentares e o comportamento desses pacientes, até a elaboração de *sites* com importante número de registros de pessoas que são grupo de risco ou que apresentam o diagnóstico de TA. Esses precedimentos são essenciais e facilitarão o contato desses indivíduos de outros centros que estão ou já foram tratados com esses transtornos e que possivelmente contribuirão para a evolução de estudos científicos (PINHEIRO et al., 2006).

## OBJETIVOS

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Identificar a presença de SNPs de genes candidatos nos TAs e em jovens saudáveis do sexo feminino.

### 4.2 Específicos

- 1) Avaliar e comparar o estado nutricional das participantes do estudo;
- 2) Determinar e comparar a frequência de SNPs dos seguintes genes: o 5 hidroxitriptamina (5-HT<sub>2A</sub>) - 1438G/A; o receptor beta do estrogênio – 1082 G/A (éxon 5) e 1730 A/G (éxon 8) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) - 196 G/A, entre os sujeitos;
- 3) Investigar a associação entre os SNPs genéticos e a presença de TA.



## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Tipo e local do estudo**

Trata-se de estudo clínico, transversal e comparativo, de natureza quantitativa, realizado junto ao Grupo de Assistência em Transtornos Alimentares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (GRATA-HCFMRP – USP).

O atendimento a pacientes com TA, realizado pela Divisão de Nutrologia do Departamento de Clínica Médica, iniciou a partir de 1980, timidamente, formado por um nutrólogo, uma nutricionista e um psiquiatra. Mais tarde, com a presença de um psicólogo, a equipe se expandiu juntamente com a presença de nutricionistas e estagiários de nutrição, médicos nutrólogos e residentes de nutrologia, médicos psiquiatras e residentes de psiquiatria, psicólogos e estagiários de psicologia, dentre outros (SANTOS, 2006).

Até agora, mais de 200 pacientes com esses quadros foram assistidos pela equipe do GRATA.

### **5.2 Sujeitos e casuística**

Foram formados dois grupos de jovens do sexo feminino, mostrados a seguir.

#### **5.2.1 Grupo de pacientes e ex-pacientes portadoras de TA (GP)**

Esse grupo foi formado por pacientes portadoras de AN que estavam em tratamento no GRATA-HC-FMRP-USP, no ano 2010, e por ex-pacientes que foram atendidas pelo serviço (aquelas que perderam o seguimento e aquelas que receberam alta). Independentemente da idade e do estado nutricional que elas apresentaram, essa amostra foi definida por conveniência, ou seja, de acordo com a

população em seguimento, na época da coleta de dados e aquelas que já tiveram seguimento no serviço e que foi possível o contato.

### 5.2.2 Grupo Controle (GC)

Esse grupo foi formado por jovens consideradas saudáveis, com idade semelhante ao GP, obedecendo aos seguintes critérios de inclusão: a) IMC normal para a idade; b) sem parentesco com os sujeitos do GP; c) ausência de sintomas alimentares característicos dos TAs. Para esse último critério, foi aplicado o *Eating Attitudes Test* (EAT-26) (Anexo A), um instrumento autoaplicável desenvolvido por Garner e Garfinkel (1979), e validado para a população brasileira por Bighetti et al. (2004). Esse questionário é um dos mais utilizados atualmente por ser um teste psicométrico, com o objetivo de medir sintomas característicos desses quadros de maneira mais fácil e rápida. Favorece, assim, o rastreamento de TA e, conseqüentemente, a precocidade do diagnóstico e tratamento. O resultado do EAT-26 é obtido pela somatória dos pontos conferidos a cada uma das 26 questões, tipo Likert, tendo como ponto de corte 21 pontos. Acima desse valor, o teste é considerado positivo e pode indicar possíveis casos de doença.

O método *snowball* foi utilizado para recrutamento e seleção desse grupo, ou seja, um grupo de mulheres jovens de mesma faixa etária que não apresentaram sinais ou sintomas dessas doenças (identificados pelo EAT-26). Essa técnica de amostragem utiliza relações interpessoais e conexões entre as pessoas, tanto para incluir quanto para excluir os indivíduos. Devido à utilização dessa rede social e relações interpessoais, essa amostragem indica formas de como o indivíduo age e interage em grupos, conseqüentemente, o método *snowball* não só oferece os resultados do recrutamento de amostras como também auxilia a ampliação do tamanho da amostra, ou seja, dos participantes para a investigação (PATTON, 1990).

O tamanho amostral desse grupo foi definido após a realização do estudo piloto, que envolveu 14 jovens de cada grupo.

### 5.3 Critérios de exclusão

Para os dois grupos (GP e GC), foram excluídas mulheres nas condições de gestação e portadoras de necessidades especiais.

### 5.4 Procedimentos

Primeiramente foi feito o convite para as mulheres participarem da pesquisa e comparecerem ao Laboratório de Nutrição do Hospital das Clínicas-FMRP-USP para assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A) e, após o aceite, realizar a coleta dos dados em uma data de sua preferência.

Diante da aceitação de cada sujeito em participar da pesquisa, as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido tanto pelas participantes com idade inferior a 18 anos e seus pais ou responsáveis quanto pelas participantes acima de 18 anos de idade (Apêndice A).

Após essa etapa, os sujeitos foram submetidos à avaliação do estado nutricional e determinação dos SNPs. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Nutrição do HC-FMRP-USP, conforme mostrado a seguir.

a) Para avaliação do estado nutricional: foi aferido o peso (em kg), por meio de uma balança de plataforma digital da marca Filizola®, modelo Personal Line, de cor preta, com peso mínimo de 2,5kg e máximo de 150kg com intervalos de 0,1kg. Em seguida, a estatura dos pacientes foi aferida em um estadiômetro de madeira com plataforma e altura máxima de 2 metros. O indivíduo manteve-se em cima da balança, sem calçados e com roupas leves, posicionando-se no centro da plataforma da balança com os braços estendidos ao longo do corpo. Para aferição do peso, os sujeitos foram orientados a retirar objetos tais como chaves, cintos, óculos, telefones celulares e quaisquer outros que poderiam interferir no peso total. Para medir a estatura, o indivíduo permaneceu descalço, com os pés formando um ângulo de 45° e com os calcanhares encostados na barra da escala de medida, permanecendo em pé, ereto, olhando para frente, sem fletir ou estender a cabeça e sem adornos (chapéus, arcos, prendedores etc.). A barra horizontal foi abaixada até



repousar no topo da cabeça. A leitura foi feita o mais próximo de 0,5cm (BRASIL, 2004).

Com esses dados, foi realizado o cálculo do IMC, cuja fórmula é o peso (em kg) dividido pela altura (em metros) ao quadrado (BLACKBURN; THORNTON, 1979).

b) Para a determinação dos SNPs: colheu-se 10mL de sangue de todos os sujeitos dos dois grupos por um profissional técnico do Laboratório de Nutrição do HC-FMRP-USP, capacitado para esse processo, e os sujeitos não necessitaram estar em jejum para essa coleta.

Com essa amostra de sangue foi realizada, no mesmo laboratório, a determinação dos SNPs citados. Esses foram determinados pelo DNA extraído de leucócitos circulantes pela PCR, seguida de digestão por enzimas de restrição específicas. As condições da PCR foram as seguintes: uma denaturação inicial de 94°C por três minutos, seguidos de 35 ciclos de denaturação a 94°C por 15 segundos, em sequência de 55°C por 30 segundos, com extensão final de 10 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados são mostrados abaixo. As amostras de DNA foram estocadas para utilização tanto nesse estudo como em estudos subsequentes, seguindo os mesmos princípios éticos.

## 5.5 Questões éticas

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob protocolo nº 476/2010 (Anexo B).

Para possibilitar futuras análises dessas amostras sanguíneas, foi criado um banco para estoque de materiais genéticos com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Protocolo nº 1832/2010; Anexo C) e todos os participantes assinaram um termo de consentimento para a guarda desse material biológico (Apêndice B).

## 5.6 Determinação dos genótipos

### \* Polimorfismo do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub>

A genotipagem do SNP -1438G/A do gene do 5-HT<sub>2A</sub> foi realizada pela PCR. O DNA genômico foi extraído de leucócitos (100ng em um volume final de 10µL) e amplificado por PCR.

As condições de PCR foram: primeiro passo de desnaturação inicial a 94°C, durante três minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C, durante 15 segundos, de aquecimento, a 55°C durante 15 segundos, e extensão a 72°C durante 30 segundos, com extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto da PCR foi digerido a 37°C por uma noite com 5U da enzima de restrição *MspI*, descrita por Collier et al. (1997), (New England Biolabs, Beverly, MA).

O alelo -1438G foi cortado em fragmentos com 244 pares de bases (pb) e 224 pb, enquanto que o alelo -1438A não foi digerido.

Os *primers* amplificaram um produto de 468 pares de bases. Os fragmentos foram separados em um gel de agarose a 2%. Para a leitura e interpretação desses resultados, seguiu-se o modelo do *primer* que está representado no Quadro 1.

Quadro 1 – Modelo de *primer* utilizado exon do 5-HT<sub>2A</sub>

Exon	Frente <i>primers</i> , 5'-3'	Reverso <i>primers</i> , 5'-3'
5	AAGCTGCAAGGTAGCAACAGC	AACCAACTTATTTTCCTACCAC

Fonte: (COLLIER et al., 1997)

### \* Polimorfismo do gene BDNF

Os fragmentos foram amplificados a partir de amostras de DNA pela reação de PCR.

As condições de amplificação inicialmente consistiram de quatro minutos de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos à temperatura de anelamento de acordo com a temperatura de fusão de cada *primer* e 30 segundos a 72°C, seguida por uma extensão final de 10 minutos a 74°C. Em seguida, três µl do correspondente do produto de PCR foram digeridos durante a

noite a 37C°, em um volume total de 10µl com 5U de enzima de restrição *NlaIII* (Biolabs) para Val66Met e envolvidas em gel de poliacrilamida a 10%.

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição *NlaIII*, produzindo quatro fragmentos com 160, 59, 58 e 15pb para o alelo normal e cinco fragmentos com 83, 77, 59, 58 e 15pb para o alelo 196G/A (Val66Met). Os *primers* amplificaram um produto de 292 pares de bases. Para a leitura e interpretação desses resultados, seguiu-se o modelo do *primer* que está representado no Quadro 2.

Quadro 2 – *Primer* utilizado para amplificação de cada éxon do gene do BDNF e a sequência de íntros

Éxon	Frente <i>primers</i> , 5'-3'	Reverso <i>primers</i> , 5'-3'
8	AGGTGAGAAGAGTGATGACC	CTGGACGTGTACAAGTCTGC

Fonte: (RIBASÉS et al., 2003)

#### \* Polimorfismo do gene ERβ

Todas as amplificações das PCR foram amplificadas. Todos os *primers* foram desenhados no íntron-éxon do gene ERβ (NILSSON et al., 2004).

*Dois genes de SNPs do ERβ foram estudados:*

- O G→A com mudança na posição 1082 no éxon 5, criando um local de reconhecimento com a enzima ***Rsal***
- O A→G com mudança na posição 1730 no éxon 8, criando um local de reconhecimento com a enzima ***AluI***.

O produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição *Rsal* e *AluI*. O SNP 1082 G/A do éxon 5 cria um ponto de digestão para a enzima *Rsal*; o SNP 1730 A/G do éxon 8 cria um ponto de digestão pela enzima *AluI*. Para a leitura e interpretação desses resultados, seguiu-se o modelo dos *primers* que está representado no Quadro 3.

Quadro 3 – *Primers* utilizados para amplificação de cada éxon do ERβ

Éxon	Frente <i>primers</i> , 5'-3'	Reverso <i>primers</i> , 5'-3'
5	GTTGCGCAGCTTAACTTCAAAGTTTTCTTC	GAAGGAGCTGATGATGCTCTGATC
8	GGTTTAGGGGTGGGGTAGACTG	CCAAGCCTGCCATCACCAAATGAG

Fonte: (NILSSON et al., 2004)

## 5.7 Análise de dados

### 5.7.1 Avaliação do estado nutricional

O estado nutricional dos sujeitos do GP e GC foram avaliados pelo IMC, considerando-se a classificação preconizada pela World Health Organization (WHO, 1998), descrita abaixo.

Quadro 4 – Classificação do estado nutricional, segundo o índice de massa corporal

Estado nutricional	*IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
Desnutrição grave	< 16,0
Desnutrição moderada	
Desnutrição leve	16,0 – 16,9
	17,0 – 18,4
Eutrofia	18,5 - 24,9
Sobrepeso	25,0 - 29,9
Obesidade leve	30,0 – 34,9
Obesidade moderada	
Obesidade grave	35,0 – 39,9
	≥ 40,0

\*IMC – índice de massa corporal

Fonte: Modificado de WHO (1998)

A classificação do estado nutricional de pacientes adolescentes, entre 10 e 20 anos, seguiu a estratificação, segundo percentis obtidos por meio de curva de IMC para idade e preconizado pela Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2009).

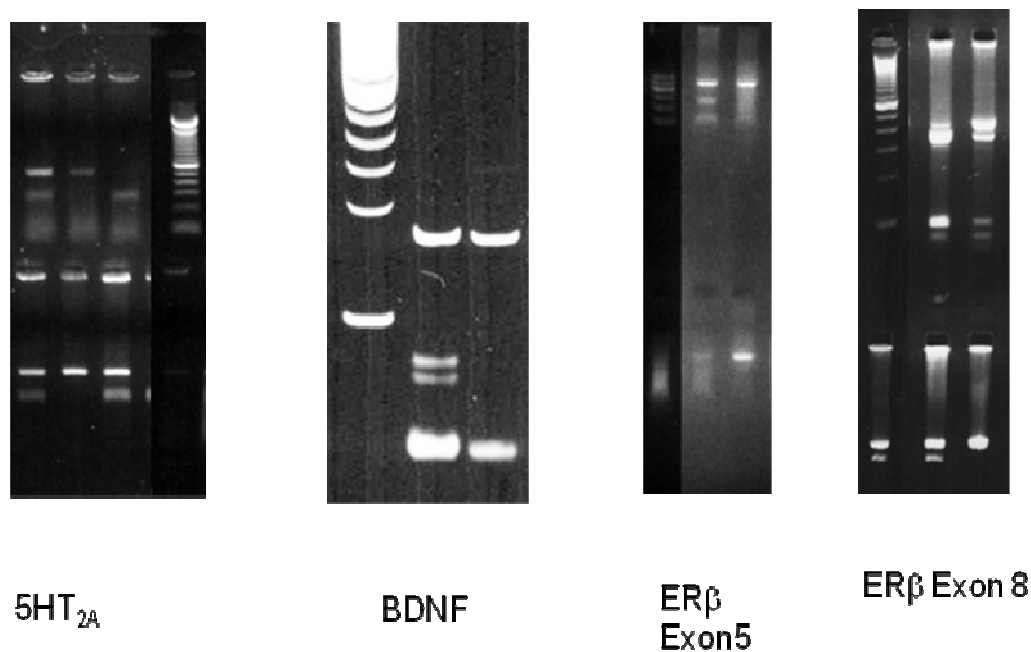
Quadro 5 – Classificação de estado nutricional para adolescentes, segundo percentis

Valores críticos	Classificação
< percentil 3	Baixo IMC para idade
≥ percentil 3 e < percentil 85	Eutrofia
≥ percentil 85 e < percentil 97	Sobrepeso
≥ percentil 97	Obesidade

### 5.7.2 Presença de SNPs

Os SNPs dos genes candidatos foram analisados de maneira descritiva, de acordo com a frequência com que apareceram nas amostras coletadas.

Figura 1 – Eletroforese dos genes: codificador do receptor da 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT<sub>2A</sub>); do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do receptor beta do estrogênio (ER $\beta$ ), situados no éxon 5 e éxon 8



Fonte: autoria própria

### 5.7.3 Análise estatística

Um banco de dados foi elaborado utilizando-se a técnica da dupla digitação para minimizar erros na transcrição. O *software* utilizado foi o *Statistical*

*Package for Social Sciences* (SPSS), *software* SPSS, versão 20.0. Em relação às variáveis contínuas (IMC e idade), foi usado o teste ANOVA e, para a variável dicotômica (presença ou não de polimorfismo), o teste qui-quadrado e regressão logística binária (INTERNATIONAL BUSINESS MACHINES (IBM), 2011).

A normalidade da distribuição das variáveis foi testada por meio do teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov (SHESKIN, 2004; SHIBASAKI; SIEGEL, 1975).

O nível de significância considerado foi de  $\alpha=0,05$  e o poder dos testes igual a 80%.

A análise dos genes foi realizada pelo teste de Genepop (*on line*).

Para averiguar se a população estudada apresentava-se em equilíbrio, foi aplicado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (STRACHAN; READ, 1999).

Os métodos para ajustar comparações múltiplas foram evitados, um exemplo disso é a correção de Bonferroni, pois esse método assume independência estatística entre as comparações e tende a ser demasiadamente conservador, impedindo resultados exploratórios que são biologicamente plausíveis (PERNEGER, 1998).

## RESULTADOS

## 6 RESULTADOS

Para avaliar os procedimentos da análise dos genes polimórficos, foi realizado um estudo piloto com 14 participantes, sendo que nove delas eram pacientes em tratamento no GRATA e cinco já haviam recebido atendimento (ex-pacientes). Todas apresentaram ou apresentam diagnóstico clínico de TA. Um grupo controle (GC) foi formado com 14 participantes saudáveis, segundo os critérios de inclusão adotados para esse estudo. Após realização e confirmação dos procedimentos para as análises, esses resultados parciais foram incluídos nos resultados totais do estudo.

A Tabela 1 mostra os valores de idade, do IMC, do EAT-26 e o diagnóstico clínico dos sujeitos dos grupos de pacientes (GP) e controle (GC). As médias de idade para o GP foram de  $26,37 \pm 7,00$  anos e no GC,  $28,65 \pm 6,67$  anos ( $p=0,274$ ); o IMC no GP foi de  $20,83 \pm 4,47 \text{kg/m}^2$  e no GC,  $21,56 \pm 1,67 \text{kg/m}^2$  ( $p=0,294$ ). O questionário EAT-26 foi aplicado no GP, a fim de reforçar a presença dos sintomas da doença, cujo valor médio foi  $30,34 \pm 18,83$  pontos. Já no GC, esse questionário foi aplicado a fim de verificar se os indivíduos não tinham TA, encontrando-se o valor de  $7,83 \pm 4,94$  pontos. Os resultados não revelaram diferença estatística significativa entre os grupos, com exceção do EAT-26, o que já era esperado, pois esse teste contribui para triar possíveis casos de TA e foi considerado critério de inclusão para selecionar os indivíduos do GC. Considerando o ponto de corte de 21 pontos, ele é considerado positivo para possíveis casos de TA. Ele foi aplicado no GC com a finalidade de que todos os resultados dos participantes fossem negativos, ou seja, aquele indivíduo que não apresentasse o EAT-26 negativo seria excluído da amostra. Já para o GP, esperava-se que a maioria das pacientes apresentassem o EAT-26 positivo, mas alguns pacientes e/ou ex-pacientes ( $n=11$ ) estáveis, no momento, quanto aos sintomas da doença, apresentaram resultado negativo para o teste.

Diante dessa diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ), acreditou-se que o EAT-26 poderia ter exercido influência sobre as análises genéticas. Sendo assim, surgiu a necessidade de aplicar, além do teste de qui-quadrado, o teste de regressão logística binária ( $p^a$ ), em todas as análises genéticas, a fim de desmascarar a influência dessa variável.



No GP, foram avaliados 29 pacientes com diagnóstico de TA que estiveram ou estão em atendimento no GRATA-HC-FMRP-USP. Desses, dez (34,5%) apresentaram diagnóstico de AN-R, doze (41,5%) apresentaram diagnóstico de AN-B e sete (24%) apresentaram diagnóstico de BN. No GC, foram analisados 78 indivíduos saudáveis, seguindo os critérios de inclusão estabelecidos para a pesquisa.

Tabela 1 – Epidemiologia do estudo: idade, estado nutricional (IMC), EAT-26 e diagnóstico dos grupos de pacientes e ex-pacientes (GP) e controle (GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

	GP (n=29)	GC (n=78)	p X <sup>2</sup>
<b>Idade (anos)</b>			0,274
15 – 19	5	2	
20 – 29	16	45	
30 – 40	6	26	
41 – 51	2	5	
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) adultos</b>			0,294
Desnutrição grave < 16,0	3	-	
Desnutrição leve 17,0 – 18,4	4	-	
Eutrofia 18,5 – 24,9	15	76	
Sobrepeso 25 – 29,9	1	-	
Obesidade moderada 35 – 39,9	1	-	
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) Crianças/adolescentes</b>			
Eutrofia ≥ p 3 e < p 85	4	2	
Sobrepeso ≥ p 85 e < p 97	1	-	
<b>EAT-26</b>			0,000*
Positivo (> 21 pontos)	18	-	
Negativo (< 21 pontos)	11	78	
<b>Diagnóstico</b>			
AN-R	10	-	
AN-B	12	-	
BN	7	-	

A Tabela 2 mostra as frequências alélicas dos genes estudados nos grupos (GC e GP). Todos os genes estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, as frequências alélicas em estudo apresentam-se em equilíbrio entre os grupos.

Tabela 2 – Frequência alélica para cada locus nos grupos estudados (GP n=29 e GC n=78). Ribeirão Preto – SP, 2012

Locus	Grupos	Alelos	
		G	A
5HT <sub>2A</sub>	GC	0,603	0,397
	GP	0,534	0,466
BDNF	GC	0,199	0,801
	GP	0,172	0,828
ERβ Éxon 5	GC	0,955	0,045
	GP	0,966	0,034
ERβ Éxon 8	GC	0,423	0,577
	GP	0,603	0,397

Foram também analisadas as distribuições genotípicas para cada gene individualmente. No gene 5HT<sub>2A</sub>, o genótipo AA possui os dois alelos que contribuem para o risco no desenvolvimento de TA; o genótipo AG apresentou um alelo de risco (A) e o GG não possuía nenhum alelo de risco, não contribuindo para o desenvolvimento de possíveis casos de TA. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para maior ou menor risco da influência desse gene nesses quadros clínicos (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição genotípica do gene 5HT<sub>2A</sub> nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

Genótipos 5HT <sub>2A</sub>	Grupo de pacientes (GP) n = 29 (%)	Grupo controle (GC) n = 78 (%)	p X <sup>2</sup>	OR (IC95%) <sup>a</sup>	p <sup>a</sup>
AA	5 (17,2)	14 (17,9)	1,00	0,952 (0,310-2,930)	0,927
AG	17 (58,6)	34 (43,5)	0,195	1,833 (0,773-4,350)	0,655
GG	7 (24,1)	30 (38,4)	0,253	0,509 (0,194-1,336)	0,552

p X<sup>2</sup> = teste de qui-quadrado simples

p<sup>a</sup> = Teste de regressão logística binária

OR = Odds Ratio

IC = intervalo de confiança

No gene BDNF, o genótipo MM é dominante para o alelo de risco, o genótipo MV apresenta um alelo de risco (M) e o VV não possui nenhum alelo de risco para o desenvolvimento de possíveis casos de TA. Nas análises desse gene, também não houve diferença estatística significativa entre os grupos para maior ou menor risco da influência desse gene nesses quadros clínicos (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição genotípica do gene BDNF nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

Genótipos BDNF	Grupo de pacientes (GP) n = 29 (%)	Grupo controle (GC) n = 78 (%)	p X <sup>2</sup>	OR (IC95%) <sup>a</sup>	p <sup>a</sup>
MM	19 (65,5)	50 (64,1)	1,00	1,064 (0,435-2,603)	0,592
MV	10 (34,4)	25 (32)	0,820	1,116 (0,453-2,748)	0,708
VV	-	3 (3,8)	0,561	0,962 (0,920-1,005)	0,999

p X<sup>2</sup> = teste de qui-quadrado simples

p<sup>a</sup> = Teste de regressão logística binária

OR = *Odds Ratio*

IC = intervalo de confiança

No gene ERβ éxon 5, o genótipo GG possui os dois alelos de risco para o possível desenvolvimento de casos de doença, o AG apresenta um alelo de risco (G) e o AA não possui nenhum alelo de risco. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para maior ou menor risco da influência desse gene nesses quadros clínicos (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição genotípica do gene ERβ éxon 5 1082 G→A nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

Genótipos ERβ Éxon 5	Grupo de pacientes (GP) n = 29 (%)	Grupo controle (GC) n = 78 (%)	p X <sup>2</sup>	OR (IC95%) <sup>a</sup>	p <sup>a</sup>
GG	27 (93,1)	71 (91)	1,000	1,331 (0,260- 6,812)	0,883
GA	2 (6,8)	7 (8,9)	1,000	0,751 (0,147- 3,845)	0,883
AA	-	-	--	-----	----

p X<sup>2</sup> = teste de qui-quadrado simples

p<sup>a</sup> = Teste de regressão logística binária

OR = *Odds Ratio*

IC = intervalo de confiança

No gene ERβ éxon 8, o genótipo AA possui os dois alelos de risco para o possível desenvolvimento de casos de doença, o AG apresenta um alelo de risco (A) e o GG não possui nenhum alelo de risco. Na análise, também não houve diferença estatística significativa entre os grupos para maior ou menor risco da influência desse gene nesses quadros clínicos (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição genotípica do gene ERβ éxon 8 1730 A→G nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

Genótipos ERβ Éxon 8	Grupo de pacientes (GP) n = 29 (%)	Grupo controle (GC) n = 78 (%)	p X <sup>2</sup>	OR (IC95%) <sup>a</sup>	p <sup>a</sup>
AA	4 (13,7)	25 (32)	0,086	0,339 (0,107- 1,079)	0,202
AG	15 (51,7)	40 (51,2)	1,000	1,018 (0,434- 2,389)	0,614
GG	10 (34,4)	13 (16,6)	0,064	2,632 (0,998- 6,942)	0,399

p X<sup>2</sup> = teste de qui-quadrado simples

p<sup>a</sup> = Teste de regressão logística binária

OR = *Odds Ratio*

IC = intervalo de confiança

Posteriormente, foi feita a análise de cada gene unindo os genótipos que possuem os alelos de risco, podendo contribuir para o desenvolvimento de TA nos GP e GC. Tanto no teste de qui-quadrado quanto na regressão logística não houve diferença estatística significativa desses alelos entre os pacientes e indivíduos saudáveis (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise dos genótipos que possuem alelos de risco nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

<b>Genótipos</b>	<b>Grupo de pacientes (GP)</b>	<b>Grupo controle (GC)</b>	<b>p X<sup>2</sup></b>	<b>OR (IC95%)<sup>a</sup></b>	<b>p<sup>a</sup></b>
	<b>n = 29 (%)</b>	<b>n = 78 (%)</b>			
<b>5HT<sub>2A</sub> GA+AA</b>	22 (75,8)	30 (38,4)	0,253	1,964 (0,748- 5,156)	0,552
<b>BDNF MM+MV</b>	28 (96,5)	75 (96,1)	1,00	1,120 (0,112- 11,221)	0,362
<b>ER β Éxon 5 GA+AA</b>	2 (6,8)	7 (8,9)	1,00	0,751 (0,147- 3,845)	0,883
<b>ER β Éxon 8 GA+AA</b>	19 (65,5)	65 (83,3)	0,064	0,380 (0,144- 1,002)	0,399

**p X<sup>2</sup>** = teste de qui-quadrado simples

**p<sup>a</sup>** = Teste de regressão logística binária

**OR** = *Odds Ratio*

**IC** = intervalo de confiança

Uma análise posterior foi realizada a fim de verificar a possível relação entre os indivíduos que eram homozigotos para os alelos de risco em pelo menos dois ou três dos genes em estudo, ou seja, aqueles que possuíam o genótipo sem nenhum alelo de risco e que, teoricamente, estariam protegidos das doenças. Os resultados obtidos indicaram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos que pudesse mostrar possível relação desses genes para esses quadros clínicos (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição de todos os genótipos homocigotos não dominantes nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

<b>Genótipos todos</b>	<b>Grupo de pacientes (GP)</b>	<b>Grupo controle (GC)</b>	<b>p X<sup>2</sup></b>	<b>OR (IC95%)<sup>a</sup></b>	<b>p<sup>a</sup></b>
	<b>n = 29 (%)</b>	<b>n = 78 (%)</b>			
<b>Homo para 3 genes</b>	-	4 (5,1)	0,572	----	0,999
<b>Homo para 2 genes</b>	7 (24,1)	23 (29,4)	0,637	0,761 (0,286- 2,027)	0,993

**p X<sup>2</sup>** = teste de qui-quadrado simples

**p<sup>a</sup>** = Teste de regressão logística binária

**OR** = *Odds Ratio*

**IC** = intervalo de confiança

Uma última análise uniu os indivíduos que possuíam pelo menos um alelo de risco (homocigoto ou heterocigoto) para pelo menos dois dos genes em estudo. Na Tabela 9, são mostradas as análises separadas dos indivíduos que apresentaram alelos de risco de todos os genes estudados (quatro genes); alelos de risco de três genes e alelos de risco de dois genes, ou seja, alelos que poderiam contribuir para o desenvolvimento desses transtornos nos indivíduos analisados. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os genes e os alelos de risco que poderiam influenciar no desenvolvimento desses quadros clínicos.

Tabela 9 – Distribuição de todos os genótipos e os alelos de risco para a doença nos grupos estudados (GP e GC). Ribeirão Preto – SP, 2012

<b>Genótipos todos</b>	<b>Grupo de pacientes (GP)</b>	<b>Grupo controle (GC)</b>	<b>p X<sup>2</sup></b>	<b>OR (IC95%)<sup>a</sup></b>	<b>p<sup>a</sup></b>
	<b>n = 29 (%)</b>	<b>n = 78 (%)</b>			
<b>Alelo risco 4 genes</b>	-	3 (3,8)	0,561	---	0,999
<b>Alelo de risco 3 genes</b>	16 (55,1)	42 (53,8)	1,000	1,055 (0,448- 2,485)	0,843
<b>Alelo de risco 2 genes</b>	26 (89,6)	72 (92,3)	0,701	0,722 (0,168- 3,099)	0,691

**p X<sup>2</sup>** = teste de qui-quadrado simples

**p<sup>a</sup>** = Teste de regressão logística binária

**OR** = *Odds Ratio*

**IC** = intervalo de confiança



## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados 29 pacientes e ex-pacientes com TA (grupo de pacientes – GP) do sexo feminino (10 pacientes com AN-R, 12 pacientes com AN-B e sete pacientes com BN) e 78 mulheres saudáveis que formaram o grupo controle (GC). As médias de idade e estado nutricional foram semelhantes nos dois grupos. O questionário EAT-26 foi aplicado nos dois grupos, principalmente para verificar a ausência de TA nos indivíduos do GC. Além disso, foram avaliados três genes e seus alelos polimórficos (o gene do receptor 5HT<sub>2A</sub>, o BDNF e o ER β) candidatos a contribuir para o desenvolvimento de TA.

Toda a população amostral encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, que contribuiu para garantir a confiabilidade desses resultados. Ao se analisar as frequências dos alelos e genótipos e a presença dos alelos de risco nos grupos, não foi observada diferença estatística significativa, quando 75,8% dos pacientes e 38,4% das mulheres saudáveis apresentaram, para os alelos de risco (GA e AA) do gene 5HT<sub>2A</sub>, os seguintes resultados: ( $pX^2=0,253$ ; OR=1,964; IC 95%=0,748–5,156 e regressão logística  $p^a=0,552$ ). No gene do BDNF, esses valores não foram diferentes do anterior: 96,5% dos pacientes e 96,1% do GC apresentaram os alelos de risco (MM e MV) do gene do BDNF ( $pX^2=1,00$ ; OR=1,120; IC 95%=0,112–11,221 e regressão logística  $p^a=0,362$ ). Quanto aos SNPs do gene do ERβ, para o presente no éxon 5, o 1082 G→A, os alelos de risco (GA e AA) também não apresentaram resultados estatísticos significativos, sendo que no GP 6,8% e 8,9% do GC obtiveram resultados semelhantes ( $pX^2=1,00$ ; OR=0,751; IC 95%=0,147–3,841 e regressão logística  $p^a=0,883$ ). Para o SNP situado no éxon 8, o 1730 A→G, os alelos de risco (AG e AA) não mostraram resultados diferentes em 65,5% dos pacientes e 83,3% do GC ( $pX^2=0,064$ ; OR=0,380; IC 95%=0,144–1,002 e regressão logística  $p^a=0,399$ ). O cálculo de regressão logística binária foi realizado a fim de retirar a diferença da variável que se apresentou estatisticamente diferente ( $p<0,05$ ) entre as populações, o EAT-26.

Em ampla revisão de estudos relacionados ao envolvimento de fatores genéticos nos TAs, Ross (2006) analisou e criticou afirmações repetidas na literatura sobre a existência da contribuição genética nos TAs. Quando um gêmeo idêntico tem BN, o outro gêmeo não tem mais que 75% de chance, o mesmo ocorrendo para



AN. Para esse autor, é impossível que a causa genética do desenvolvimento de TA seja em torno de 50 a 80%, tal como indicado por alguns pesquisadores analisados neste estudo. Os dados existentes suportam claramente a conclusão de que a contribuição genética nos TAs é menor, com a maior parte da causalidade proveniente do ambiente. Não ocorrem, assim, explicações genéticas para os índices observados de concordância para bulimia e anorexia nervosa em gêmeos monozigóticos que não sejam predominantemente de etiologia ambiental. Também, não há comprovação alguma de mecanismo genético postular ou que invoque declarações de que os TAs são substancialmente de origem genética.

Em importante revisão de estudos de associação que examinaram a base genética dos TAs, foram investigados os achados que sugerem o significativo envolvimento de alguns genes polimórficos que podem contribuir para o desenvolvimento dessas doenças. Entre os mais importantes está o 5HT<sub>2A</sub>, o BDNF e o ERβ. Envolvidos na regulação da ingestão de alimentos e do humor, 16 estudos sobre o gene 5HT<sub>2A</sub> foram concluídos, onde sete deles obtiveram resultado significativo para AN ( $p < 0,05$ ). Já para a BN, existem oito estudos, onde dois deles apresentaram diferença significativa. Em relação ao gene do BDNF, de seis estudos publicados, quatro deles tiveram resultados significativos para AN ( $p < 0,05$ ); para BN, quatro estudos são conhecidos e apenas um deles revelou resultado significativo. Para o gene do ERβ, de dois estudos existentes, um apresentou resultado significativo para AN; para BN, de dois, um mostrou resultado significativo. Novamente, o significado funcional específico da maioria desses genes é desconhecido, embora muitos estejam dentro de sistemas biológicos que influenciam a ingestão de alimentos, o metabolismo e/ou o humor (KLUMP; CULBERT, 2007).

Landt et al. (2008) investigaram pacientes com TA com o propósito de identificar a presença de genes e suas influências genéticas no IMC desses indivíduos, sendo 474 gêmeos monozigóticos (194 do sexo masculino e 280 do sexo feminino), 310 gêmeos dizigóticos (140 do sexo masculino e 170 do sexo feminino), 45 gêmeos, onde apenas um dos irmãos participou da coleta (22 do sexo masculino e 23 do sexo feminino) e 184 irmãos (69 do sexo masculino e 115 do sexo feminino). Eles verificaram que, apesar da relação lógica entre o IMC e os TAs, a influência genética dessa doença apresenta-se independente do IMC, tanto em mulheres quanto em homens. A análise bivariada mostrou que a presença dos TAs

apresentam traços altamente hereditários em mulheres ( $a^2=0,65$ ) e em homens, esses traços aparecem de forma moderada ( $a^2=0,39$ ). Já os dados estatísticos para o IMC mostraram significativo envolvimento hereditário em mulheres ( $a^2=0,80$ ) e em homens ( $a^2=0,76$ ). Além disso, os fatores genéticos aditivos (contribuições ambientais fenotípicas compartilhadas e não compartilhadas) foram responsáveis pela influência dessas características (IMC e TA) e os valores de correlação genética em mulheres e homens foram de 0,43 e 0,51, respectivamente. O estudo, porém, associa-se a componentes genéticos que exercem certa influência no IMC e nos TAs. Foi observado também que a maioria dos efeitos genéticos que influenciam os TAs é independente dos efeitos genéticos que influenciam o IMC. O poder da análise estatística revelou que o tamanho da amostra foi suficiente para detectar os efeitos do compartilhamento genético e ambiental sobre o IMC e os TAs em homens e mulheres. O tamanho da amostra do sexo feminino também foi suficiente para estimar a correlação genética entre o IMC e os TAs corretamente, porém, nos homens, havia limitado poder estatístico para estimar essa correlação.

Em recente estudo desenvolvido com 1.085 indivíduos com diagnóstico clínico de TA e 677 indivíduos saudáveis (grupo controle), testou-se 5.151 SNPs, ou seja, prováveis candidatos de variações genéticas que conferem suscetibilidade à AN. As análises de associação separadas por diagnóstico também foram feitas, onde havia 687 indivíduos com AN-B com comportamento compulsivo sem purgação e 421 indivíduos com AN-R. Os resultados não apresentaram valores de associação estatisticamente significativos para qualquer indivíduo ou SNPs nos alelos com qualquer definição de doença. Esses achados ressaltam a importância de grandes amostras para produzir reforços adequados nas diferenças genotípicas em indivíduos com AN (PINHEIRO et al., 2010).

No presente estudo, uma limitação importante foi o pequeno tamanho amostral, tanto para o GP como para o GC, corroborando os achados do estudo acima, referindo-se à necessidade de maiores amostras para se obter resultados estatísticos significativos. Essas declarações também vão ao encontro ao que dizem Scherag, Hebebrand e Hinney (2010) em sistemática revisão de literatura, de que variações no gene do receptor  $5HT_{2A}$ , bem como no gene do BDNF representam as mais consistentes descobertas genéticas para os TAs. O impacto da influência genética na etiologia desses quadros foi solidamente mostrado em estudos anteriores. Esses genes são presumivelmente os melhores candidatos para

investigar as interações com os fatores ambientais. Variações no gene do receptor 5HT<sub>2A</sub>, bem como a variante do SNP do gene do BDNF (Val66Met), podem representar as primeiras exceções na regra de que, em amostras menores, os resultados não são significativos. Porém, as razões mais comuns e evidentes para resultados contraditórios ainda estão ao redor do tamanho amostral desses estudos, ou seja, amostras insuficientes relativas ao número de participantes.

Corroborando essas ideias, Root et al. (2011) pesquisaram 1.762 indivíduos do sexo feminino com os diagnósticos de AN-R, AN-B e BN, cuja idade era de 27±8,8 anos e um grupo controle com 677 indivíduos, com idade de 26±8,3 anos (p=0,051). Investigaram genes polimórficos candidatos a contribuírem para possível desenvolvimento de TA, sendo eles; INS (p=0,755471), HCRTR1(p=0,755471), GRK5 (p=0,755471), KCNN3 (p=0,755471), GRM5 (p=0,730628), TACR1 (p=0,737012) DRD3 (p=0,755471), DRD3 (p=0,755471), esses dois últimos SNPs estavam no mesmo cromossomo, porém, em posições diferentes. Após a realização de múltiplas comparações, não houve resultados estatisticamente significativos entre os grupos.

Ainda sobre as dificuldades em pesquisas genéticas e nos TAs, em extensa e recente revisão de literatura discutiram-se diferentes campos de investigação, tanto em seres humanos quanto em animais, que podem contribuir para a compreensão desses quadros. Dentre os tópicos analisados estão os estudos de genes candidatos a aumentar o risco genético para o desenvolvimento de AN envolvidos no controle hipotalâmico do apetite e da regulação da energia. Entre várias linhas de investigação, encontram-se os estudos de associação do guia de associação gênica, considerado um dos mais recentes avanços nessa área. Esses estudos permitem que milhões de SNPs sejam genotipados simultaneamente pelo genoma sem hipóteses diretas em relação ao envolvimento biológico na doença. Essa abordagem permite que os pesquisadores identifiquem novos alvos genéticos que possam revelar previamente desconhecidos aspectos biológicos da AN. No entanto, devido ao grande número de SNPs analisados, sugere-se que se considere maior nível de significância estatística ( $p \leq 10^{-8}$ ) nesse tipo de pesquisa, pois há maior probabilidade de um erro do tipo falso positivo acontecer (CLARKE; WEISS; BERRETTINI, 2012).

No presente estudo, quando analisados separadamente, em homocigoto e heterocigoto, os genótipos do gene 5HT<sub>2A</sub>, também não foram encontradas

diferenças estatísticas significativas. Para o genótipo AA, o qual é dominante para contribuir no risco para desenvolver a doença, observou-se que 17,2% dos pacientes e 17,9% dos controles apresentavam esse alelo ( $pX^2=1,00$ ;  $OR=0,952$ ;  $IC\ 95\%=0,310-2,930$  e regressão logística de 0,927); para o genótipo AG, 58,6% dos pacientes e 43,5% dos controles tinham a sua presença ( $pX^2=0,195$ ;  $OR=1,833$ ;  $IC\ 95\%=0,773-4,350$  e regressão logística de 0,655) e, por fim, para o genótipo GG, o qual é homozigoto para contribuir em não desenvolver possíveis casos de TA, 24,1% dos pacientes e 38,4% dos controles o apresentaram ( $px^2=0,253$ ;  $OR=0,509$ ;  $IC\ 95\%=0,194-1,336$  e regressão logística de 0,552). Acredita-se que esses valores não foram significativos devido ao pequeno número amostral e à heterogeneidade étnica da população estudada.

Esses resultados corroboram os achados de Martásková et al. (2009) em importante pesquisa que investigou a associação de influências polimórficas na AN, em 75 pacientes do sexo feminino (idade= $25,39\pm 6,18$  anos;  $IMC=14,65\pm 1,38\text{kg/m}^2$ ) e um grupo controle com 65 mulheres caucasianas saudáveis (idade= $25,76\pm 5,12$  anos;  $IMC=20,69\pm 1,85\text{kg/m}^2$ ) da população checa. Entre os SNPs investigados, o do receptor  $5HT_{2A}$  (-1438A/G) mostrou tendência para a associação do alelo de risco para AN. Para tal, a heterogeneidade étnica populacional e o possível efeito de estratificação dentro dessa população deve ser levado em consideração. Ao analisar a associação quantitativa do SNP do gene do  $5HT_{2A}$  com o IMC, o resultado com associação apresentou-se limítrofe ( $p=0,055$ ). O alelo 1438A em pacientes com AN apareceu em 47% dos casos e em casos-controle esse valor foi de 42%, oposto a todos os outros estudos publicados. A atual análise estatística mostrou-se com baixa significância ( $p=0,3992$ ,  $OR=1,2255$ ) e aumento no intervalo de confiança de 95% de  $0,7636-1,9668$ . No entanto, os resultados apoiam relatos anteriores de um papel significativo do alelo A (-1438A/G do receptor  $5HT_{2A}$ ) como um fator de risco para AN, necessitando-se maiores investigações nessa direção.

Em contrapartida a esses resultados, na pesquisa realizada por Nishiguchi et al. (2001), os autores examinaram a prevalência do SNP do gene  $5HT_{2A}$  (-1438 G/A) entre 182 pacientes japoneses com TA (172 do sexo feminino e 10 do sexo masculino), com idade de  $25,3\pm 6,2$  anos (36 pacientes apresentavam AN-R, 26 AN-B; 95 BN-com purgação e 15 pacientes apresentavam BN-sem purgação) e um grupo controle composto por 374 indivíduos (sendo 354 do sexo

feminino), com idade de  $25,7 \pm 10,6$  anos. Esse estudo demonstrou associação do SNP -1438G/A do gene do receptor  $5HT_{2A}$  com os TAs, especificamente em BN com compulsão alimentar e/ou purgação. A frequência do alelo G do locus  $5HT_{2A}$  foi significativamente maior no total de pacientes com TA do que no grupo controle, onde a diferença na frequência do alelo G entre os dois grupos foi de 0,09 (0,55-0,46), com poder estatístico de 80%. Ao analisar separadamente os pacientes com BN, a frequência do alelo G foi significativamente mais elevada do que no grupo controle (0,10; 0,56-0,46), com poder estatístico de 74%, mas essa diferença não foi observada em pacientes com AN. Pode-se dizer que esse SNP difere pelo comportamento alimentar e os subtipos clínicos dos TAs. Essas descobertas sugerem fortemente que, se há diferença entre o padrão de ligação desse gene e esse SNP, poderá também haver diferenças entre os grupos raciais, o que poderia explicar a incoerência entre esses resultados e outros estudos anteriores. Apesar da amostra japonesa, uma população em que a heterogeneidade racial é mínima, o número de pacientes será insuficiente para observar fielmente as interações de associações entre o gene  $5HT_{2A}$  e os TAs (subtipos e as características clínicas). Isso torna especialmente verdadeiro para pacientes com AN, pois a potência estatística foi relativamente baixa (54%), comparando-se esses pacientes e o grupo controle.

No presente estudo, para o gene do BDNF, quando separados seus genótipos em homozigoto e heterozigoto, observou-se que, para o genótipo dominante MM (que pode contribuir no desenvolvimento de casos de doença), 65,5% dos pacientes e 64,1% do GC apresentavam esse alelo ( $pX^2=1,00$ ; OR=1,064; IC 95%=0,435–2,603 e regressão logística de 0,592). Em relação ao genótipo heterozigoto MV, 34,4% dos pacientes e 32% do controle apresentavam esse alelo ( $pX^2=0,820$ ; OR=1,116; IC 95%=0,453–2,748 com regressão logística de 0,708) e para o homozigoto VV (que não contribui para o desenvolvimento da doença), esse se manteve em apenas 3,8% dos controles ( $pX^2=0,561$ ; OR=0,962; IC 95%=0,920–1,005 com regressão logística de 0,999). Esse último valor mostra-se interessante, onde nenhum paciente apresentou esse fator de proteção para a doença. No entanto, não se pode confirmar essa hipótese devido ao baixo número da amostra. Para todos os resultados, os valores estatísticos não foram significativos.

Diferentemente desses achados, na investigação desenvolvida por Mercader et al. (2007) com caucasianos de origem espanhola, diagnosticados com TA, foram avaliados 110 pacientes do sexo feminino, 49 deles com AN (25 eram do subtipo restritivo e 24 eram do subtipo bulímico) e 61 com BN. O IMC dos pacientes com AN foi de  $15,3 \pm 1,37 \text{ kg/m}^2$  e daqueles com BN foi de  $19,2 \pm 2,8 \text{ kg/m}^2$ . A idade foi de  $24,5 \pm 6,0$  anos e  $25,8 \pm 5,0$  anos para AN e BN, respectivamente. O grupo controle foi estruturado com 50 irmãos e irmãs saudáveis, com idade semelhante ( $23,8$  anos; IC 95%= $23,2-28,4$ ). Os pacientes com BN apresentaram maior transmissão de alelos com níveis significativamente mais altos do BDNF, explicando 10,7% da variabilidade genética ( $p=0,016$ ). Os valores de  $p$  foram considerados estatisticamente significativos ao se avaliar a AN e a BN ( $p<0,025$ ). Embora na amostra em geral nenhum desses resultados permanecesse significativo após a correção de Bonferroni ( $p<0,002$ ), ao dividir por subtipos de AN e BN (AN-B, AN-R, BN), a significância estatística para a associação do SNP permaneceu significativa para o grupo AN-R e BN ( $p=0,008$ ), respectivamente. Em suma, esses resultados confirmam a variabilidade e o papel do gene do BDNF nos TAs e futuras pesquisas deverão elucidar o que essas variáveis podem causar e revelar se o BDNF for um marcador biológico da doença.

Já o estudo francês realizado por Dardenes et al. (2007), corrobora os achados da presente pesquisa, onde avaliaram, entre outros dados, a idade de início do TA, o IMC, os escores do EAT-26, o gene do SNP do BDNF (Val66Met) e a influência dessas informações em relação ao desenvolvimento de casos clínicos de TA (AN-R e AN-B). Foram investigados 114 pacientes com AN e ambos os pais, recrutados em dois centros especializados. Os resultados encontrados não forneceram evidências de transmissão preferencial do alelo 66Met do BDNF, se suscetível à AN (OR= $0,84$ ; IC 95%= $0,43-1,62$ ). Assim como o presente estudo, esses dados são obviamente limitados pelo número relativamente pequeno de famílias.

Em extensa revisão de literatura realizada por Gratacòs et al. (2007), que investigaram vários estudos de casos e controles em metanálise de distúrbios psiquiátricos, dentre eles três sobre TA e a associação do BDNF (Val66Met), as análises forneceram informações para determinar a associação entre Val66Met e esses quadros clínicos. O tamanho da amostra nos grupos de pacientes com TA e grupo controle foi de 1.733 e 1.811, respectivamente. A média de idade nos grupos

de pacientes variou de 20 a 26 anos e quase 100% dos sujeitos era do sexo feminino. Todas as amostras estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apenas um estudo foi realizado em asiáticos. Observou-se heterogeneidade étnica nos estudos um ( $\chi^2=9,05$ ,  $p=0,0598$ ) e três ( $\chi^2=7,83$ ,  $p=0,0982$ ). A hipótese de homogeneidade étnica para o estudo dois ( $p=0,3948$ ) não pôde ser rejeitada. O fator raça foi avaliado como forte potencial de heterogeneidade. No entanto, após a exclusão do único estudo asiático, ainda havia heterogeneidade étnica nos estudos um e três. Assim, a análise combinada foi realizada por meio de regressão logística, com modelo de efeitos aleatórios. O teste de razão de probabilidade indicou que o efeito global do gene foi estatisticamente significativo ( $p<0,001$ ). A estimativa dos estudos um, dois e três foram de 1,30 (95% IC:1,03-1,65), 1,50 (95% IC:1,08-2,09) e 1,13 (95% IC:0,69-1,86), respectivamente. Esses resultados sugerem efeito de risco dominante do alelo Met e, por conseguinte, Val/Met e Met/Met foram combinados e comparados com Val/Val. Depois de combinar, a homogeneidade não foi rejeitada ( $\chi^2=7,30$ ,  $p=0,1209$ ). Esses resultados também podem explicar como pessoas com a presença dos genótipos Val/Met e Met/Met têm risco maior, de 36%, para desenvolver TA do que aqueles com o genótipo Val/Val. Análise, utilizando a abordagem de modelo livre de genética, revelou resultados muito semelhantes nos estudos um: 1,30 (IC 95%: 1,01-1,70), e dois: 1,38 (IC 95%: 1,01-1,98). O IC de 95% indicou que ainda há alguma incerteza sobre o verdadeiro modo de herança.

Ehrlich et al. (2009) chamaram a atenção para seus achados, quando foram estudados 33 pacientes do sexo feminino com baixo peso, diagnosticados com AN-B, idade entre 14 e 29 anos e IMC  $14,9\pm 1,4\text{kg/m}^2$ . Eles foram comparados a 20 pacientes com AN-R com recuperação ponderal a longo prazo, idade entre 15 e 29 anos e IMC  $20,5\pm 1,3\text{kg/m}^2$ . Ainda, um grupo controle foi constituído por 33 indivíduos saudáveis, com idade entre 15 e 16 anos e IMC  $21,4\pm 2,1\text{kg/m}^2$  buscando investigar a influência do gene polimórfico do BDNF e suas associações com indicadores periféricos do sistema de 5HT. Os níveis médios séricos de BDNF apresentaram-se significativamente aumentados no grupo AN-R quando comparado com o grupo AN-B ( $p=0,001$ ). Não houve associações significativas entre BDNF e o conteúdo ou a absorção de 5HT nas plaquetas. Entre os pacientes com AN, encontraram-se relações lineares positivas e importantes entre o BDNF e o IMC ( $r=0,312$ ,  $p=0,023$ ). Concluiu-se que os níveis de BDNF sérico em pacientes com AN

dependem do estado da doença, principalmente com relação a recuperação de peso. Isso poderia ser parte de um processo regenerativo, após prolongadas lesões bioquímicas e moleculares neuronais, devido à má nutrição. O estudo recomenda que associações entre o BDNF e o sistema de 5HT nos seres humanos devem ser investigadas em outras pesquisas.

Reforçando os resultados encontrados no presente estudo, Arija et al. (2010) verificaram, por período de dois anos, 258 alunos espanhóis de origem caucasiana, de ambos os sexos, com idade entre 10 e 13 anos ( $11,37 \pm 0,62$  anos). Os participantes foram selecionados a partir de 17 escolas primárias da província de Tarragona, escolhidas aleatoriamente para que o grupo apresentasse diversas origens culturais e sociais. Essa amostra foi estudada em duas fases. Na primeira, aplicou-se o Teste de Atitudes Alimentares Infantil, para excluir possíveis casos de TA. Dos 258 alunos, 141 foram incluídos no grupo de risco para TA e 117 foram incluídos no grupo controle; a idade das crianças variou de 11 a 13 anos ( $11,31 \pm 0,59$  anos). Dois anos mais tarde, na adolescência, iniciou-se a segunda fase do estudo, cuja idade era de 13 a 15 anos ( $13,79 \pm 0,72$  anos). Desses indivíduos, o total de 113 apresentaram riscos para TA e 87 estavam no grupo controle. Os participantes responderam a outro questionário que também tria possíveis casos de TA, o teste de atitudes alimentares (EAT-26), sendo que 41 foram classificados como risco para TA e 159 foram selecionados como grupo controle. Além dessas classificações, investigou-se a presença do SNP do gene do BDNF (Val66Met) e a frequência desses genótipos, independente da gravidade do risco de TA nesses sujeitos. Os valores estatísticos nos adolescentes do sexo feminino foram de  $\chi^2=2,96$ ;  $df=4$ ,  $p=0,562$  e nos adolescentes do sexo masculino, de  $\chi^2=6,25$ ,  $df=4$ ,  $p=0,181$ . Também, verificou-se a distribuição dos genótipos do SNP de acordo com a evolução do risco e diagnóstico de TA em ambos os sexos, sendo encontradas diferenças entre os grupos para a evolução de risco para TA ( $\chi^2=6,44$ ,  $df=6$ ,  $p=0,381$ ) ou os valores de indivíduos já com o diagnóstico de TA ( $\chi^2=3,097$ ;  $df=6$ ,  $p=0,797$ ). A distribuição de genótipos de acordo com a gravidade nos TAs não diferiu significativamente como esperado, a partir do equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle ( $\chi^2=0,06$ ;  $df=2$ ,  $p=0,970$ ) ( $\chi^2=5,37-3$ ;  $df=2$ ,  $p=0,977$ ), no grupo de risco ( $\chi^2=3,48-3$ ;  $df=2$ ,  $p=0,998$ ) ( $\chi^2=0,04$ ;  $df=2$ ,  $p=0,981$ ) ou no grupo com diagnóstico de TA ( $\chi^2=0,04$ ,  $df=2$ ,  $p=0,980$ ) ( $\chi^2=0,45$ ,  $df=2$ ,  $p=0,798$ ) em



adolescentes do sexo feminino ou masculino, respectivamente. Os resultados não revelaram qualquer associação entre o SNP (Val66Met, G196A) do gene do BDNF e os diferentes níveis de gravidade ou evolução de risco para TA. Também não se observaram percentuais mais elevados do alelo Met nos indivíduos com níveis mais altos de risco e gravidade para os TAs. Embora não houvesse diferença significativa, uma percentagem mais elevada do alelo Met foi encontrada entre aquelas crianças que evoluíram a partir de “nenhum risco” para “algum risco”. Alta porcentagem da população geral estudada apresentou presença do SNP Val66Met (G196A) do gene do BDNF (33,7%, IC 95%:27,1-40,2). Para tal, nenhuma relação direta foi observada entre a presença do SNP e o risco para os TAs.

Recentemente, os resultados de Ando et al. (2012) também apresentaram dados semelhantes aos do presente estudo, em pesquisa onde foi analisado o alelo Met66 do SNP Val66Met do gene do BDNF e sua associação na AN. Para o desenvolvimento da pesquisa, foram avaliadas 689 pacientes japonesas do sexo feminino com quadro clínico de AN e BN e um grupo controle com 573 mulheres saudáveis. Não houve diferença significativa na frequência do genótipo ou frequência do alelo do SNP Val66Met entre as mulheres com AN e o grupo controle, até mesmo para análises de associação separadas, ou seja, a partir dos subtipos de classificações de AN e BN. A frequência alélica do Met66 no grupo controle foi de 0,421 e  $\alpha=0,0125$ . Embora estudos anteriores sugiram que a associação com o alelo Met66 é mais evidente na AN-R, aqui não se observou essa tendência. Estudos de caso-controle são propensos à influência da estratificação da população, mas a amostra desse estudo foi composta por mulheres japonesas. As interações gene/ambiente e gene/gene podem provavelmente dificultar o efeito observado nos resultados do Val66Met para evitar danos na AN.

No presente estudo, na análise do SNP do gene ER $\beta$ , localizado no éxon 5 (1082 G→A), também separou-se em homozigoto e heterozigoto, onde o GG é o genótipo dominante para contribuir para o aumento do risco para desenvolver TA. Os valores foram de 93,1% nos pacientes e 91% nos controles apresentando esse alelo ( $pX^2=1,000$ ; OR=1,331; IC 95%=0,260–6,812 e regressão logística de 0,883). Para o genótipo heterozigoto AG, 6,8% dos pacientes e 8,9% dos controles apresentaram esse alelo ( $pX^2=1,000$ ; OR=0,751; IC 95%=0,147–3,845 e regressão logística de 0,883) e para o homozigoto AA, o qual contribui para o não

desenvolvimento da doença, surpreendentemente nenhum dos indivíduos dos grupos analisados apresentou sua presença. Para o SNP do gene ER $\beta$ , situado no éxon 8 (1730 A $\rightarrow$ G), o genótipo AA é dominante para o risco para desenvolver a doença, e ele esteve presente em 13,7% dos pacientes e 32% dos controles ( $pX^2=0,086$ ; OR=0,339; IC 95%=0,107–1,079 e regressão logística de 0,202). Para o genótipo AG, os valores foram de 51,7% nos pacientes e 51,2% nos controles ( $pX^2=1,000$ ; OR=1,018; IC 95%=0,434–2,389 e regressão logística de 0,614) e, para o genótipo GG, observou-se sua presença em 34,4% dos pacientes e 16,6% dos controles ( $pX^2=0,064$ ; OR=2,632; IC 95%=0,998–6,942 com regressão logística de 0,399). Todas as análises não apresentaram valores estatísticos significativos, chamando a atenção para os resultados do SNP 1730A $\rightarrow$ G no genótipo AA com valor de  $pX^2=0,086$ , ou seja, com tendência para um resultado significativo do genótipo polimórfico dominante para a doença nos dois grupos. No genótipo GG, o valor de  $pX^2=0,064$  mostra, também, possível tendência de fator de proteção para a doença. No entanto, não se pode afirmar essa hipótese, pois esses valores apenas se aproximam de um valor estatístico significativo.

Reforçando os resultados acima, o estudo de coorte de Eastwood et al. (2002), com 170 pacientes caucasianas do sexo feminino com diagnóstico clínico de AN e um grupo controle com 152 mulheres saudáveis, analisou os SNPs ESR1 (éxon 2) e ESR2 (éxons 5 e 8). A análise estatística não mostra qualquer diferença significativa na distribuição dos alelos entre a população de AN e o grupo controle ( $x^2=8,04$ ,  $p>0,2$ ). Ao serem avaliados os alelos divididos em dois grupos, mesmo assim, não ocorreu qualquer associação com AN ( $x^2=2,60$ ,  $p>0,2$ ). Quanto à frequência alélica entre o GC e GP, também não houve diferença estatística significativa. No éxon 5 G1082A no GC encontrou-se: GG com frequência alélica de 0,941, AG=0,053 e AA=0,007; no GP: GG com frequência alélica de 0,837, AG=0,129 e AA=0,034. Para o éxon 8 A1730G, no GC: AA com frequência alélica de 0,142, AG=0,473 e GG=0,385 e no GP: AA com frequência alélica de 0,199, AG=0,455 e GG=0,347. No entanto, ao analisar o SNP em ESR2, observou-se sobre-representação significativa do genótipo heterozigótico de G1082A na população com AN ( $x^2=8,65$ ,  $p=0,003$ ,  $pc=0,006$ ), mas não nos outros indivíduos estudados, não havendo implicação óbvia funcional desse SNP. Portanto, a análise dos SNPs e seus alelos nos ESR1 e ESR2 não mostrou nenhuma evidência

significativa de associação com AN ( $p>0,2$ ), sugerindo que a variabilidade na ESR2, por si só, pode contribuir para a susceptibilidade genética na AN. Acredita-se que o SNP G1082A pode estar em desequilíbrio de ligação por uma mutação funcionalmente importante no gene ESR2, ainda não identificada. Embora o papel do gene ESR2 não possa ser excluído da susceptibilidade à AN sem quaisquer provas, a explicação mais provável de significativa associação, observada neste estudo, é que há um falso positivo. Para verificar essa hipótese, há necessidade de mais estudos.

Nilsson et al. (2004) confirmam os achados do presente trabalho com os resultados de pesquisa, onde foram avaliados 76 pacientes suecos do sexo feminino, diagnosticados com BN ( $n=48$ ) ou TANE ( $n=28$ ), e 60 indivíduos saudáveis do mesmo sexo. O estado menstrual, o IMC e a idade também foram coletados. O estado menstrual foi classificado como períodos mensais regulares, amenorreia (sem sangramento nos últimos três meses) ou oligomenorreia (períodos em um intervalo superior a seis semanas). Entre as pacientes bulímicas, 27 (36%) apresentavam alterações menstruais (amenorreia ou oligomenorreia), enquanto que apenas duas (3%) das participantes do grupo controle tinham oligomenorreia. As médias de idade e IMC das pacientes foram classificadas como as que apresentavam menstruação irregular (26 anos e  $22,4\text{kg/m}^2$ ) e aquelas que apresentavam regularidade menstrual (28 anos e  $22,2\text{kg/m}^2$ ). As médias de idade das participantes do grupo controle com ou sem irregularidades menstruais foram de 31 e 29 anos, respectivamente, e as médias dos valores de IMC foram  $22,3$  e  $22,9\text{kg/m}^2$ , respectivamente. Esse estudo, além de outras investigações, teve como objetivo associar a influência dos SNPs do gene ER $\beta$  (1730 A $\rightarrow$ G e 1082 G $\rightarrow$ A) em mulheres com BN. As frequências alélicas e genóticas foram apresentadas no SNP 1082 G $\rightarrow$ A ( $\chi^2=1,81$ ;  $p>0,05$  e OR=2,85) e no SNP 1730 A $\rightarrow$ G ( $\chi^2=9,04$ ;  $p=0,0026$  e OR=2,20). As frequências genóticas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os casos e controles. Ao se analisar o SNP 1730 A $\rightarrow$ G, em relação aos riscos relativos para a doença, no genótipo GG não houve valores estatísticos significativos em ambos os grupos; para o genótipo AG, o risco relativo foi de 1,6 em ambos os grupos e, para o AA, o risco relativo foi de 2,5 em ambos os grupos. Essa análise suporta o fato de que os SNPs estudados do gene do ER $\beta$  estão, independentemente, associados a risco aumentado de doença. Observou-se

possível papel do gene do ER $\beta$  ou genes vizinhos na etiologia da doença em pacientes bulímicas. Entretanto, deve haver estudos com amostras maiores para que se possam obter informações sobre a real função desse gene, ou seja, se seu papel deriva de suas funções periféricas e/ou dos sistemas centrais. É contínua a possibilidade de que esses SNPs, por si só, contribuam para a função do gene do ER $\beta$  na etiologia da doença. Portanto, maiores estudos para definir a função do ER $\beta$  nos TAs devem ser desenvolvidos.

Versini et al. (2010) também reforçam os resultados encontrados no presente trabalho, ao analisarem 348 sujeitos do sexo feminino de origem francesa, diagnosticadas com AN, subdivididas em AN-R (n=153) e AN-B (n=154). Em um segundo momento, a amostra foi composta por 41 sujeitos do sexo feminino com AN-R, de origem alemã. Também avaliaram 613 pais. O grupo controle foi composto por 567 mulheres saudáveis. Os questionários EAT-26 e o Inventário para Transtornos Alimentares (EDI-2) foram aplicados para medir as dimensões comportamentais e os sintomas para AN. Além disso, avaliou-se genes polimórficos candidatos ao desenvolvimento de TA. Um deles foi o ESR1, que apresentou diferença significativa em pacientes com AN-R mas, em contrapartida, o mesmo comportamento não ocorreu com pacientes com AN-B. Nenhuma associação significativa foi encontrada para as combinações dos SNPs e a AN. Essa relação ao grupo de pacientes alemãs, embora não houvesse nenhum alelo polimórfico presente de maneira significativa nesse grupo, encontrou-se maior transmissão paterna desse alelo associado nessa amostra (p=0,025) e tendência significativa (p=0,059), conferindo maior risco para AN-R (OR=3,0, IC 95%=1,1-8,3 e OR=2,6, IC 95%=0,9-7,3). Nessa amostra, encontrou-se associação entre o gene ESR1 e AN, principalmente no subtipo restritivo. O tamanho pequeno da amostra alemã em relação à amostra francesa pode ser uma das explicações para resultados negativos de associação. Portanto, esse estudo sugere evidências de que variações genéticas comuns entre o gene ESR1 estão associadas com TA, e mais especificamente com AN-R, com destaque para o possível envolvimento da via hormonal estrogênica.

Diante dos estudos mencionados, prevalecem justificativas plausíveis para suportar a continuidade de pesquisas nessa área, a fim de proporcionar resultados mais fidedignos e satisfatórios.

Algumas dificuldades são encontradas na área de pesquisa genética nos TAs, a fim de atingir o nível de significância estatística necessária para associação

genética ser considerada positiva. Essas desvantagens somam-se ao tamanho das amostras que deveriam ser maiores, a fim de realizar estudos de mega e metanálise, utilizando-se todos os dados possíveis, a baixa idade dos participantes, a baixa prevalência da doença na população e também o seu acometimento, principalmente no sexo feminino. A estratificação por etnia e sexo traz probabilidade de resultado falso positivo e normalmente não acontece a replicação dos dados. Portanto, futuros estudos, usando amostras maiores e bem definidas, serão necessários para melhores resultados (ARIJA et al., 2010; CLARKE; WEISS; BERRETTINI, 2012; KLUMP; CULBERT, 2007; NISHIGUCHI et al., 2001; ROOT et al., 2011; VERSINI et al., 2010).

Além disso, análises simultâneas de variantes genéticas desses determinantes biológicos, do metabolismo energético e do comportamento alimentar, em grandes populações, devem contribuir para a explicação do índice de hereditariedade dos TAs, para a descrição de padrões fisiopatológicos e possível alteração na expressão gênica, podendo aumentar ainda mais o risco de AN. Acredita-se que os TAs são de etiologia poligênica e para somar essas várias frentes de pesquisa, os estudos epigenéticos em AN, focando endofenótipos mais bem definidos, poderão proporcionar importantes conhecimentos de dietas e nutrição alteradas e subsidiar mais pesquisas e novas estratégias de tratamento para determinar se essas mudanças são apenas resultado da subnutrição ou se a extensão da epigenética mudará em resposta à dieta, não sendo apenas um fator de risco em si (CLARKE; WEISS; BERRETTINI, 2012; DARDENES et al., 2007; SCHERAG; HEBEBRAND; HINNEY, 2010).

Ainda, deve-se motivar abordagens complementares que envolvam estudos com associação do guia genômico com a finalidade de identificar genes que estão envolvidos no fenótipo desses quadros. Nesse contexto, cópias analisadas de variações em números, sequenciamentos baseados em ensaios de descobertas raras e modelos de análise habilitados pelo alto rendimento de genotipagem e sequenciamento do exame do genoma inteiro devem ser incluídos e alguns passos lógicos como, por exemplo: realização de pesquisas sobre um refinamento no fenótipo, a fim de otimizar a detecção de variantes genéticas que conferem risco para AN; examinar os fenótipos alternativos bem como usando outros fenótipos refinados, baseados em análises de classificação e modelos de estudos experimentais em amostras maiores, poderiam ser utilizadas a fim de compensar as

deficiências dos métodos tradicionais de genes candidatos para a AN (LANDT et al., 2008; PINHEIRO et al., 2010; ROOT et al., 2011).

Pesquisas adicionais estão sendo aguardadas para auxiliar a conclusão de alguns desses desafiadores resultados. Em última análise, a integração de todos esses campos em pesquisa genética promoverá conhecimentos sobre essa doença e auxiliará o desenvolvimento de novas terapêuticas e regimes de tratamento (CLARKE; WEISS; BERRETTINI, 2012; KLUMP; CULBERT, 2007).

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da composição de um grupo de pacientes e ex-pacientes portadores de TA (GP=29) e um grupo controle formado por mulheres saudáveis (GC=78) com o objetivo de investigar a influência genética nessas doenças, as seguintes conclusões podem ser apontadas:

- a idade e o IMC dos grupos foram semelhantes, sendo que a aplicação do EAT-26 foi útil como critério de seleção do GC;

- foi possível identificar SNPs dos genes (5HT<sub>2A</sub>, BDNF e ER $\beta$ ) e comparar a frequência entre os grupos, não se encontrando diferença significativa da presença deles e o risco de TA.

Esses resultados corroboram outros estudos da literatura que também não encontraram diferenças na frequência de SNPs em grupos semelhantes. Um dos fatores que dificulta a confirmação dessa hipótese é a baixa incidência de TA na população.

Sendo assim, futuros estudos são necessários, envolvendo tamanho amostral maior, assim como investigações que analisem a influência da heterogeneidade étnica assim como a identificação mais detalhada de genes candidatos para tais quadros clínicos. Estudos multicêntricos e a organização de bancos de dados que armazenem material genético possibilitarão a obtenção de resultados mais promissores nessa área de conhecimento.

Como pesquisa pioneira e inédita no Brasil, este estudo abre fronteiras para a comunidade científica no desenvolvimento de novas abordagens que elucidem a influência da genética na etiologia dos TAs. Estes resultados irão contribuir para a aquisição de novas estratégias de tratamento e proporcionar respostas mais eficazes nesses quadros tão desafiadores.



## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and statistic manual of mental disorders**: text revision: DSM-IV-TR. 4th ed. Washington, 2000.

ANDO, T.; ISHIKAWA, T.; HOTTA, M.; NARUO, T.; OKABE, K.; NAKAHARA, T.; TAKII, M.; KAWAI, K.; MERA, T.; NAKAMOTO, C.; TAKEI, M.; YAMAGUCHI, C.; NAGATA, T.; OKAMOTO, Y.; OOKUMA, K.; KOIDE, M.; YAMANAKA, T.; MURATA, S.; TAMURA, N.; KIRIIKE, N.; ICHIMARU, Y.; KOMAKI, G. No association of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with anorexia nervosa in Japanese. **Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatr. Genet. Part B**, Hoboken, 159B, n. 1, p. 48-52, 2012.

ARIJA, V.; FERRER-BARCALA, M.; ARANDA, N.; CANALS, J. BDNF Val66Met polymorphism, energy intake and BMI: a follow-up study in schoolchildren at risk of eating disorders. **BMC Public Health**, London, v. 10, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/10/363>>. Acesso em: 3 jul. 2012.

AUBERT, R.; BETOULLE, D.; HERBETH, B.; SIEST, G.; FUMERON, F. 5'-HT2A receptor gene polymorphism is associated with food and alcohol intake in obese people. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, Hampshire, v. 24, n. 7, p. 920-924, 2000.

AUDENAERT, K.; VAN LAERE, K.; DUMONT, F.; VERVAET, M.; GOETHALS, I.; SLEGGERS, G.; MERTENS, J.; VAN HEERINGEN, C.; DIERCKX, R.A. Decreased 5-HT2A receptor binding in patients with anorexia nervosa. **J. Nucl. Med.**, Chicago, v. 44, n. 2, p. 163-169, 2003.

BAILER, U.F.; FRANK, G.K.; HENRY, S.E.; PRICE, J.C.; MELTZER, C.C.; WEISSFELD, L.; MATHIS, C.A.; DREVETS, W.C.; WAGNER, A.; HOGE, J.; ZIOLKO, S.K.; MCCONAHA, C.W.; KAYE, W.H. Altered brain serotonin 5-HT1A receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [Carbonyl] 11 WAY-100635. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 62, n. 9, p. 1032-1041, 2005.

BAKER, J.H.; MAES, H.H.; LISSNER, L.; AGGEN, S.H.; LICHTENSTEIN, P.; KENDLER, K.S. Genetic risk factors for disordered eating in adolescent males and females. **J. Abnorm. Psychol.**, Washington, v. 118, n. 3, p. 576-586, 2009.

BARIOHAY, B.; LEBRUN, B.; MOYSE, E.; JEAN, A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. **Endocrinology**, Springfield, v. 146, n. 12, p. 5612-5620, 2005.

BERSANI, G.; IANNITELLI, A.; FIORE, M.; ANGELUCCI, F.; ALOE, L. Data and hypotheses on the role of nerve growth factor and other neurotrophins in psychiatric disorders. **Med. Hypotheses**, Penrith, v. 55, n. 3, p. 199-207, 2000.

BIGHETTI, F.; SANTOS, C.B.; SANTOS, J.E.; SANTOS, J.E.; RIBEIRO, R.P.P. Tradução e validação do Eating Attitudes Test em adolescentes do sexo feminino de Ribeirão Preto, São Paulo. **J. Bras. Psiquiatr.**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 6, p. 339-346, 2004.

BLACKBURN, G.L.; THORNTON, P.A. Nutritional assessment of the hospitalized patients. **Med. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 63, n. 5, p. 11103-11115, 1979.

BLUNDELL, J.E. Serotonin and appetite. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 23, n. 12B, p. 1537-1551, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. **Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN: orientações básicas para a coleta, o processamento, a análise de dados e a informação em serviços de saúde.** Brasília, DF, 2004. (Série A. Normas e manuais técnicos).

\_\_\_\_\_. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. Incorporação das curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde de 2006 e 2007 no SISVAN. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <[http://nutricao.saude.gov.br/documentos/sisvan\\_norma\\_tecnica\\_crianças.pdf](http://nutricao.saude.gov.br/documentos/sisvan_norma_tecnica_crianças.pdf)>. Acesso em: 17 mar. 2010.

BULIK, C.M.; SULLIVAN, P.F.; WADE, T.D.; KENDLER, K.S. Twin studies of eating disorders: a review. **Int. J. Eat. Disorder.**, Hoboken, v. 27, n. 1, p. 1-20, 2000.

CAMPBELL-THOMPSON, M., LYNCH, I.J.; BHARDWAJ, B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER $\beta$  isoforms in colon cancer. **Cancer Research.**, Chicago, v. 61, n. 2, p. 632-640, 2001.

CARDON, L.R.; BELL, J.I. Association study designs for complex diseases. **Nat. Rev. Genet.**, London, v. 2, n. 2, p. 91-99, 1991.

CHEN, K.; YANG, W.; GRIMSBY, J.; SHIH, J.C. The human 5-HT<sub>2</sub> receptor is encoded by a multiple intron-exon gene. **Brain Res. Mol. Brain Rev.**, Amsterdam, v. 14, n. 1/2, p. 20-26, 1992.

CHEN, Z.Y.; PATEL, P.D.; SANT, G.; MENG, C.X.; TENG, K.K.; HEMPSTEAD, B.L. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 24, n. 18, p. 4401-4411, 2004.

CLARKE, T.K.; WEISS, A.R.D.; BERRETTINI, W.H. The genetics of anorexia nervosa. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 91, n. 2, p. 181-188, 2012.

COLLIER, D.A.; JARAZ, M.J.; LI, T.; MUPITA, D.; BROWN, N.; TREASURE, J. Association between 5-HT<sub>2A</sub> gene polymorphism and anorexia nervosa. **Lancet**, London, v. 350, n. 9075, p. 412, 1997.

- CORDÁS, T.A.; SALZANO, F.T. Aspectos gerais dos transtornos alimentares: características, critérios, diagnósticos, epidemiologia e etiologia. In: ALVARENGA, M.; SCAGLIUSI, F.B.; PHILIPPI, S.T. **Nutrição e transtornos alimentares: avaliação e tratamento**. São Paulo: Manole, 2011. p. 5-15.
- COWEN, P.J.; CLIFFORD, E.M.; WALSH, A.E.S.; WILLIAMS, C.; FAIRBURN, C.G. Moderate dieting causes 5-HT<sub>2C</sub> receptor supersensitivity. **Psychol. Med.**, London, v. 26, n. 6, p. 1155-1159, 1996.
- CULBERT, K.M.; BREEDLOVE, S.M.; BURT, S.A.; KLUMP, K.L. Prenatal hormone exposure and risk for eating disorders: a comparison of opposite-sex and same-sex twins. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 65, n. 3, p. 329-336, 2008.
- DARDENNES, R.M.; ZIZZARI, P.; TOLLE, V.; FOULON, C.; KIPMAN, A.; ROMO, L.; IANCU-GONTARD, D.; BONI, C.; SINET, P.M.; THÉRÈSE, B.M.; ESTOUR, B.; MOUREN, M.C.; GUELFY, J.D.; ROUILLON, F.; GORWOOD, P.; EPELBAUM, J. Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: Association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 106-113, 2007.
- DINAN, T.G. Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. **Life Sci.**, Oxford, v. 58, n. 20, p. 1683-1694, 1996.
- EASTWOOD, H.; BROWN, K.M.O.; MARKOVIC, D.; PIERI, L.F. Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. **Mol. Psychiatry**, Houndmills, v. 7, n. 1, p. 86-89, 2002.
- EGAN, M.F.; KOJIMA, M.; CALLICOTT, J.H.; GOLDBERG, T.E.; KOLACHANA, B.S.; BERTOLINO, A. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, n. 112, p. 257-269, 2003.
- EHRlich, S.; SALBACH-ANDRAE, H.; ECKART, S.; MERLE, J.V.; BURGHARDT, R.; PFEIFFER, E.; FRANKE, L.; UEBELHACK, R.; LEHMKUHL, U.; HELLWEG, R. Serum brain-derived neurotrophic factor and peripheral indicators of the serotonin system in underweight and weight-recovered adolescent girls and women with anorexia nervosa. **J. Psychiatry Neurosci.**, Ottawa, v. 34, n. 4, p. 323-329, 2009.
- FARAONE, S.V.; TSUANG, M.T.; TSUANG, D.W. **Genetics of mental disorders: a guide for students, clinicians, and researchers**. New York: Guilford Press, 1999.
- FINK, G.; SUMMER, B. Oestrogen and mental state. **Nature**, London, v. 383, n. 6598. p. 306, 1996.
- FRANK, G.K.; KAYE, W.H.; MELTZER, C.C.; PRICE, J.C.; GREER, P.; McCONAHA, C.; SKOVIRA, K. Reduced 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding after recovery from anorexia nervosa. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 52, n. 9, p. 896-906, 2002.

GALVÃO, A.L.; PINHEIRO, A.P.; SOMENZI, L. Etiologia dos transtornos alimentares. In: NUNES, M.A.A.; APOLINÁRIO, J.C.; GALVÃO, A.L. **Transtornos alimentares e obesidade**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 59-71.

GARNER, D.M.; GARFINKEL, P.E. The eating attitudes test: an index of the symptom of anorexia nervosa. **Psychol. Med.**, London, v. 9, n. 2, p. 273-279, 1979.

GOODWIN, G.M.; FRASER, S.; STUMP, K.; FAIRBURN, C.G.; ELLIOT, J.M.; COWEN, P.J. Dieting and weight loss in volunteers increases the number of alpha-2-adenoreceptors and 5-HT receptors on blood platelets without effect on [3H]-imipramine binding. **J. Affect. Disord.**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 267-274, 1987.

GORWOOD, P.; BOUVARD, M.; MOUREN-SIMÉONI, M.C.; KIPMAN, A.; ADÈS, J. Genetics and anorexia nervosa: a review of candidate genes. **Psychiatr. Genet.**, London, v. 8, n. 1, p. 1-12, 1998.

GORWOOD, P.; KIPMAN, A.; FOULON, C. The human genetics of anorexia nervosa. **Eur. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 480, n. 1/3, p. 163-480, 2003.

GRATACÒS, M.; GONZÁLEZ, J.R.; MERCADER, J.M.; CID, R.; URRETAVIZCAYA, M.; ESTIVILL, X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 61, n. 7, p. 911-922, 2007.

GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNETT, J.M.; ARGOS, P.; CHAMBON, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. **Nature**, London, v. 320, n. 6058, p. 134-139, 1986.

GREENE, G.L.; GILNA, P.; WATERFIELD, M.; BAKER, A.; HORT, Y.; SHINE, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. **Science**, New York, v. 231, n. 4742, p. 1150-1154, 1986.

GRICE, D. Molecular biology of anorexia nervosa, bulimia nervosa, binge eating disorder, and obesity. In: BREWERTON, T.D. (Ed.). **Clinical handbook of eating disorders: an integrated approach**. New York: Routledge, 2004. p. 323-348.

HANSON, I.M.; SEAWRIGHT, A.; VAN HEYNINGEN, V. The human BDNF gene maps between FSHB and HVBS1 at the boundary of 11p13-p14. **Genomics**, San Diego, v. 13, n. 4, p. 1331-1333, 1992.

HERYNK, M.H.; FUQUA, S.A. Estrogen receptor mutations in human disease. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 25, n. 6, p. 869-898, 2004.

HIGLEY, J.D.; LINNOILA, M. Low central nervous system serotonergic activity is traitlike and correlates with impulsive behavior. A nonhuman primate model investigating genetic and environmental on neurotransmission. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 836, p. 39-56, 1997.

HINNEY, A.; BARTH, N.; ZIEGLER, A.; VON PRITTWITZ, S.; HAMANN, A.; HENNIGHAUSEN, K.; PIRKE, K.M.; HEILS, A.; ROSENKRANZ, K.; ROTH, H.; CONERS, H.; MAYER, H.; HERZOG, W.; SIEGFRIED, A.; LEHMKUHL, G.; POUSTKA, F.; SCHMIDT, M.H.; SCHÄFER, H.; GRZESCHIK, K.H.; LESCH, K.P.; LENTES, K.U.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: allele distributions in relationship to body weight and in anorexia nervosa. **Life Sci.**, Oxford, v. 61, n. 21, p. PL295-PL303, 1997.

HOEK, H.W.; VAN HOEKEN, D. Review of the prevalence and incidence of eating disorders. **Int. J. Eat. Disord.**, New York, v. 34, n. 4, p. 383-396, 2003.

HUDSON, J.I.; HIRIPIR, E.; POPE Jr., H.G.; KESSLER, R.C. The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 61, n. 3, p. 348-358, 2007.

HUETHER, G.; ZHOU, D.; SCHMIDT, S.; WILTFANG, J.; RÜTHER, E. Long-term food restriction down-regulates the density of serotonin transporters in the rat frontal cortex. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 41, n. 12, p. 1174-1180, 1997.

INTERNATIONAL BUSINESS MACHINES (IBM). SPSS Incorporation. **SPSS for Windows**: Statistical Package for the Social Sciences. Release 20.0. Chicago: SPSS, 2011.

INTERNATIONAL SNP MAP WORKING GROUP. A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, London, v. 409, n. 6822, p. 928-933, 2001.

JACOBI, C.; HAYWARD, C.; ZWAAN, M.; KRAEMER, H.C.; AGRAS, W.S. Coming to terms with risk factors for eating disorders: application of risk terminology and suggestions for a general taxonomy. **Psychol. Bull.**, Washington, v. 130, n. 1, p. 19-65, 2004.

JIMERSON, D.C.; LESEM, M.D.; KAYE, W.H.; BREWERTON, T.D. Low serotonin and dopamine metabolite concentrations in cerebrospinal fluid from bulimic patients with frequent binge episodes. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 49, n. 2, p. 132-138, 1992.

KAYE, W.H. Anorexia and bulimia nervosa, obsessional behavior, and serotonin. In: KAYE, W.H.; JIMERSON, D.C. (Ed.). **Eating disorders**. London: Balliere's Tindell, 1997.

KAYE, W.H.; EBERT, M.H.; GWIRTSMAN, H.E.; WEISS, S.R. Differences in brain serotonergic metabolism between bulimic and nonbulimic patients with anorexia nervosa. **Am. J. Psychiatry**, Arlington, v. 141, n. 12, p. 1598-1601, 1984.

KAYE, W.H.; FRANK, G. Gene-environment interactions: brain and behavior in anorexia nervosa [lecture]. ANNUAL MEETING OF THE EATING DISORDERS RESEARCH SOCIETY, 8., 2002, Charleston. **Proceedings...** Charleston, 2002. p. 20-23.

KAYE, W.H.; FUDGE, J.L.; PAULUS, M. New insights into symptoms and neurocircuit function of anorexia nervosa. **Nat. Rev. Neurosci.**, London, v. 10, n. 8, p. 573-584, 2009.

KAYE, W.H.; GENDALL, K.; STROBER, M. Serotonin neuronal function and selective serotonin reuptake inhibitor treatment in anorexia and bulimia nervosa. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 44, n. 9, p. 825-838, 1998.

KAYE, W.H.; GREENO, C.G.; MOSS, H.; FERNSTROM, J.; FERNSTROM, M.; LILENFELD, L.R.; WELTZIN, T.E.; MANN, J.J. Alterations in serotonin activity and psychiatric symptoms after recovery from bulimia nervosa. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 55, n. 10, p. 927-935, 1998.

KAYE, W.H.; GWIRTSMAN, H.E.; GEORGE, D.T.; EBERT, M.H. Altered serotonin activity in anorexia nervosa after long-term weight restoration. Does elevated cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid level correlate with rigid and obsessive behavior? **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 48, n. 6, p. 556-562, 1991.

KAYE, W.H.; GWIRTSMAN, H.E.; GEORGE, D.T.; JIMERSON, D.C.; EBERT, M.H. CSF 5-HIAA concentration in anorexia nervosa: reduced values in underweight subjects normalize after weight gain. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 23, n. 1, p. 102-105, 1988.

KAYE, W.H.; KLUMP, K.L.; FRANK, G.K.W.; STROBER, M. Anorexia and bulimia nervosa. **Annu. Rev. Med.**, Palo Alto, v. 51, p. 299-313, 2000.

KAYE, W.H.; WELTZIN, T.E. Neurochemistry of bulimia nervosa. **J. Clin. Psychiatry**, Memphis, v. 52, p. S21-S28, 1991. Supplement.

KERNIE, S.G.; LIEBL, D.J.; PARADA, L.F. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. **EMBO J.**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1290-1300, 2000.

KIPMAN, A.; BRUINS-SLOT, L.; BONI, C.; HANOUN, N.; ADÈS, J.; BLOT, P.; HAMON, M.; MOUREN-SIMÉONI, M.; GORWOOD, P. 5-HT(2A) gene promoter polymorphism as a modifying rather than a vulnerability factor in anorexia nervosa. **Eur. Psychiatry**, Paris, v. 17, n. 4, p. 227-229, 2002.

KIPMAN, A.; GORWOOD, P.; MOUREN-SIMÉONI, M.C.; ADÈS, J. Genetic factors in anorexia nervosa. **Eur. Psychiatry**, Paris, v. 14, n. 4, p. 189-198, 1999.

KLUMP, K.L.; CULBERT, K.M. Molecular genetic studies of eating disorders current status and future directions. **Curr. Dir. Psychol. Sci.**, New York, v. 16, n. 1, p. 37-41, 2007.

KLUMP, K.L.; GOBROGGE, K.L. A review and primer of molecular genetic studies of anorexia nervosa. **Int. J. Eat. Disord.**, Hoboken, v. 37, p. S43-S48, 2005. Supplement. Discussion S87-S89.

KLUMP, K.L.B.; MILLER, P.K.; KEEL, M.; MCGUE, I.W.G. Genetic and environmental influences on anorexia nervosa syndromes in a population-based twin sample. **Psychol. Med.**, London, v. 31, n. 4, p. 737-740, 2001.

KUIPER, G.G.J.M.; EMMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 93, n. 12, p. 5925-5930, 1996.

KUNUGI, U.A.; OTSUKA, M.; ISSE, K.; HIRASAWA, H.; KATO, N.; NABIKA, T. KOBAYASHI, S.; NANKO, S. A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. **Molec. Psychiatry**, Houndmills, v. 6, n. 1, p. 83-86, 2001.

LAFLAMME, N.; NAPPI, R.E.; DROLET, G.; LABRIE, C.; RIVEST, S. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. **J. Neurobiol.**, New York, v. 36, n. 3, p. 357-378, 1998.

LANDER, E.S.; WEINBERG, R.A. Genomics: journey to the center of biology. **Science**, New York, v. 287, n. 5459, p. 1777-1782, 2000.

LANDT, M.C.T.S.O.; BARTELS, M.; VAN FURTH, E.F.; VAN BEIJSTERVELDT, C.E.M.; MEULENBELT, I.; SLAGBOOM, P.E.; BOOMSMA, D.I. Genetic influences on disordered eating behaviour are largely independent of body mass index. **Acta Psychiatr. Scand.**, Copenhagen, v. 117, n. 5, p. 348-356, 2008.

LANG, U.E.; JOCKERS-SCHERUBL, M.C.; HELLWEG, R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: Implications and limitations. **J. Neural Transm.**, Wien, v. 111, n. 3, p. 387-411, 2004.

LEBRUN, B.; BARIOHAY, B.; MOYSE, E.; JEAN, A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview. **Auton. Neurosci.**, Amsterdam, v. 126/127, p. 30-38, 2006.

LEIBOWITZ, S.F. The role of serotonin in eating disorders. **Drugs**, New York, v. 39, p. 33-48, 1990. Supplement 3.

LEIBOWITZ, S.F.; SHOR-POSNER, G. Brain serotonin and eating behavior. **Appetite**, London, v. 7, p. 1-14, 1986. Supplement.

LEIBROCK, J.; LOTTESPEICH, F.; HOHN, A.; HOFER, M.; HENGERER, B.; MASIAKOWSKI, P. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. **Nature**, London, v. 341, n. 6238, p. 149-152, 1989.

LEMOINE, P.; ALLAIN, H. Induction of sleep. **Sleep**, New York, v. 19, n. 3, p. S1-S6, 1996. Supplement.

LEWIN, G.R.; BARDE, Y.A. Physiology of the neurotrophins. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v. 19, p. 289-317, 1996.



LIANG, Y.Q.; AKISHITA, M.; KIM, S.; AKO, J.; HASHIMOTO, M.; LIJIMA, K.; OHIKE, Y.; WATANABE, T.; SUDOH, N.; TOBA, K.; YOSHIZUMI, M.; OUCHI, Y. Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. **Int. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 26, n. 8, p. 1103-1109, 2002.

LINDSAY, R.M.; WIEGRAND, S.J.; ALTAR, C.A.; DI STEFANO, S. Neurotrophic factors: from molecule to man. **Trends Neurosci.**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 182-189, 1994.

LUCKI, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 44, n. 3, p. 151-162, 1998.

MAISONPIERRE, P.C.; LE BEAU, M.M.; ESPINOSA, III R.; IP, N.Y.; BELLUSCIO, L.; MONTE, S.M.; SQUINTO, S.; FURTH, M.E.; YANCOPOULOS, G.D. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. **Genomics**, San Diego, v. 10, n. 3, p. 558-568, 1991.

MANN, J.J. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 21, n. 2, p. 99S-105S, 1999. Supplement.

MARTASKOVA, D.; ŠLACHTOVA, L.; KEMLINK, D.; ZAHORAKOVA, D.; PAPEŽOVA, H. Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. the first study in Czech population and metaanalyses with previously performed studies. **Folia Biol. (Praha)**, Praha, v. 55, n. 5, p. 192-197, 2009.

MERCADER, J.M.; RIBASÉS, M.; GRATACÓS, M.; GONZÁLEZ, J.R.; BAYÉS, M.; CID, R.; BADÍA, A.; FERNÁNDEZ-ARANDA, F.; ESTIVILL, X. Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia. **Genes Brain Behav.**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 706-716, 2007.

MONTELEONE, P.; ZANARDINI, R.; TORTORELLA, A.; GENNARELLI, M.; CASTALDO, E.; CANESTRELLI, B.; MAJ, M. The 196G/A (val66met) polymorphism of the BDNF gene is significantly associated with binge eating behavior in women with bulimia nervosa or binge eating disorder. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 406, n. 1/2, p. 133-137, 2006.

MORGAN, C.M.; CLAUDINO, A.M. Epidemiologia e etiologia. In: CLAUDINO, A.M.; ZANELA, A.M. **Transtornos alimentares e obesidade**. São Paulo: Manole, 2005. p. 15-23. (Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar. UNIFESP).

NACMIAS, B.; RICCA, V.; TEDDE, A.; MEZZANI, B.; ROTELLA, C.M.; SORBI, S. 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene polymorphisms in anorexia nervosa and bulimia nervosa. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 277, n. 2, p. 134-136, 1999.

NAGAKAWA, T.; TSUCHIDA, A.; ITAKURA, Y.; NONOMURA, T.; ONO, M.; HIROTA, F.; INOUE, T.; NAKAYAMA, C.; TAIJI, M.; NOGUCHI, H. Brain-derived

neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. **Diabetes**, New York, v. 49, n. 3, p. 436-444, 2000.

NAKAYAMA, M.; GAHARA, Y.; KITAMURA, T.; OHARA, T. Distinctive four promoters collectively direct expression of brain-derived neurotrophic factor gene. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, Amsterdam, v. 21, n. 3/4, p. 206-218, 1994.

NILSSON, M.; NAESSÉN, S.; DAHLMAN, I.; LINDÉN HIRSCHBERG, A.; GUSTAFSSON, J.A.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Association of estrogen receptor  $\beta$  gene polymorphisms with bulimic disease in women. **Mol. Psychiatry**, Houndmills, v. 9, n. 1, p. 28-34, 2004.

NISHIGUCHI, N.; MATSUSHITA, A.; SUZUKI, K.; MURAYAMA, M.; SHIRAKAWA, O.; HIGUCHI, S. Association between 5HT<sub>2A</sub> receptor gene promoter region polymorphism and eating disorders in Japanese patients. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 50, n. 2, p. 123-128, 2001.

NONOMURA, T.; TSUCHIDA, A.; ONO-KISHINO, M.; NAKAGAWA, T.; TAIJI, M.; NOGUCHI, H. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy expenditure through the central nervous system in obese diabetic mice. **Int. J. Exp. Diabetes Rev.**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 201-209, 2001.

NUNES, M.A.A. Epidemiologia dos transtornos alimentares. In: NUNES, M.A.A.; APPOLINARIO, J.C.; GALVÃO, A.L.; COUTINHO, W. **Transtornos alimentares e obesidade**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 51-57.

OHARA, O.; GAHARA, Y.; TERAOKA, H.; KITAMURA, T. A rat brain-derived neurotrophic factor-encoding gene generates multiple transcripts through alternative use of 5' exons and polyadenylation sites. **Gene**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 383-386, 1992.

OJOPI, E.P.B.; GREGORIO, S.P.; GUIMARÃES, P.E.M.; FRIDMAN, C.; DIAS NETO, E. O genoma humano e as perspectivas para o estudo da esquizofrenia. **Rev. Psiquiatr. Clín.**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 9-18, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10**: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.

PATTON, M.Q. **Qualitative evaluation and research methods**. Newbury Park: Sage Publications, 1990.

PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; WELLMAN, C.L. Characteristics of BDNF-induced weight loss. **Exp. Neurol.**, New York, v. 131, n. 2, p. 229-238, 1995.

PERNEGER, T.Z. What's wrong with Bonferroni adjustments. **BMJ**, London, v. 316, n. 7139, p. 1236-1238, 1998.

PINHEIRO, A.P.; BULIK, C.M.; THORNTON, L.M.; SULLIVAN, P.F.; ROOT, T.L.; BLOSS, C.S.; BERRETTINI, W.H.; SCHORK, N.J.; KAYE, W.H.; BERGEN, A.W.; MAGISTRETTI, P.; BRANDT, H.; CRAWFORD, S.; CROW, S.; FICHTER, M.M.; GOLDMAN, D.; HALMI, K.A.; JOHNSON, C.; KAPLAN, A.S.; KEEL, P.K.; KLUMP, K.L.; VIA, M.L.; MITCHELL, J.E.; STROBER, M.; ROTONDO, A.; TREASURE, J.; WOODSIDE, D.B. Association study of 182 candidate genes in anorexia nervosa. **Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.**, Hoboken, v. 153B, n. 5, p. 1070-1080, 2010.

PINHEIRO, P.P.; SULLIVAN, P.F.; BACALTCHUCK, J.; PRADO-LIMA, P.A.S.; BULIK, C.M. Genetics in eating disorders: extending the boundaries of research. **Rev. Bras. Psiquiatria**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 218-225, 2006.

RAMOZ, N.; VERSINI, A.; GORWOOD, P. Eating disorders: an overview of treatment responses and the potential impact of vulnerability genes and endophenotypes. **Expert Opin. Pharmacother.**, London, v. 8, n. 13, p. 2029-2044, 2007.

RIBASÉS, M.; GRATACÒS, M.; ARMENGOL, L.; CID, R.; BADIA, A.; JIMÉMEZ, L.; SOLANO, R.; VALLEJO, J.; FERNÁNDEZ, F.; ESTIVIL, X. Met66 in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type. **Mol. Psychiatry**, Houndmills, v. 8, n. 8, p. 745-751, 2003.

RIBASÉS, M.; GRATACÒS, M.; FERNÁNDEZ-ARANDA, F.; BELLODI, L.; BONI, C.; ANDERLUH, M.; CAVALLINI, M.C.; CELLINI, E.; DI BELLA, D.; ERZEGOVESI, S.; FOULON, C.; GABROVSEK, M.; GORWOOD, P.; HEBEBRAND, J.; HINNEY, A.; HOLLIDAY, J.; HU, X.; KARWAUTZ, A.; KIPMAN, A.; KOMEL, R.; NACMIAS, B.; REMSCHMIDT, H.; RICCA, V.; SORBI, S.; WAGNER, G.; TREASURE, J.; COLLIER, D.A.; ESTIVILL, X. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1205-1212, 2004.

RIOS, M.; FAN, G.; FEKETE, C.; KELLY, J.; BATES, B.; KUEHN, R.; LECHAN, R. M.; JAENISCH, R. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. **Mol. Endocrinol.**, Baltimore, v. 15, n. 10, p. 1748-1757, 2001.

ROOT, T.L.; SZATKIEWICZ, J.P.; JONASSAINT, C.R.; THORNTON, L.M.; PINHEIRO, A.P.; STROBER, M.; BLOSS, C.; BERRETTINI, W.; SCHORK, N.J.; KAYE, W.H.; BERGEN, A.W.; MAGISTRETTI, P.; BRANDT, H.; CRAWFORD, S.; CROW, S.; FICHTER, M.M.; GOLDMAN, D.; HALMI, K.A.; JOHNSON, C.; KAPLAN, A.S.; KEEL, P.K.; KLUMP, K.L.; VIA, M.L.; MITCHELL, J.E.; ROTONDO, A.; TREASURE, J.; WOODSIDE, D.B.; BULIK, C.M. Association of candidate genes with phenotypic traits relevant to anorexia nervosa. **Eur. Eat. Disord. Rev.**, Chichester, v. 19, n. 6, p. 487-493, 2011.

ROSENKRAZ, K.; HINNEY, A.; ZIEGLER, A.; HERMANN, H.; FICHTER, M.; MAYER, H.; SIEGFRIED, W.; YOUNG, J.K.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 83, n. 12, p. 4524-4527, 1998.

ROSMOND, R.; BOUCHARD, C.; BJORNTORP, P. 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene promoter polymorphism in relation to abdominal obesity and cortisol. **Obes. Res.**, Baton Rouge, v. 10, n. 7, p. 585-589, 2002.

ROSS, C.A. Overestimates of the genetic contribution to eating disorders. **Ethical Hum. Psychol. Psychiatry**, New York, v. 8, n. 2, p. 123-131, 2006.

SANTOS, J.E. Grata: Nossa história, trabalho e desafios. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 3, p. 323-326, 2006.

SCHERAG, S.; HEBEBRAND, J.; HINNEY, A. Eating disorders: the current status of molecular genetic research. **Eur. Child Adolesc. Psychiatry**, Toronto, v. 19, n. 3, p. 211-226, 2010.

SCHIMIDT, U. Aetiology of eating disorders in the 21(st) century: new answers to old questions. **Eur. Child Adolesc. Psychiatry**, Toronto, v. 12, p. 130-137, 2003. Supplement 1.

SHEKIN, D.J. **Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures**. 3. ed. Florida: Chapman & Hall/CRC, 2004.

SHIBASAKI, T.; SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica: para as ciências do comportamento**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica: para as ciências do comportamento**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975.

SOUZA, E.B. Serotonin and dopamine receptors in the rat pituitary gland: autoradiographic identification, characterization and localization. **Endocrinology**, Springfield, n. 119, n. 4, p. 1534-1542, 1986.

SNIDER, W.D.; JOHNSON Jr., E.M. Neurotrophic molecules. **Ann. Neurol.**, Boston, v. 26, n. 4, p. 489-506, 1989.

SPARKES, R.S.; LAN, N.; KLISAK, I.; MOHANDAS, T.; DIEP, A.; KOJIS, T.; et al. Assignment of a serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor gene (HTR2) to human chromosome 13q14-q21 and mouse chromosome 14. **Genomics**, San Diego, v. 9, n. 3, p. 461-465, 1991.

STEIGER, H. Eating disorders and the serotonin connection: state, trait and development effects. **J. Psychiatry Neurosci.**, Ottawa, v. 29, n. 1, p. 20-29, 2004.

STEIGER, H.; GAUVIN, L.; ISRAËL, M.; KOERNER, N.; NG YING KIN, N.M.; PARIS, J.; YOUNG, S.N. Association of serotonin and cortisol indices with childhood abuse in bulimia nervosa. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 58, n. 9, p. 837-843, 2001.

STRACHAN, T.; READ, A.P. Genes in pedigree. In: \_\_\_\_\_. **Human molecular genetics**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1999. p. 55-70.

SWEDO, S.E.; LEONARD, H.L.; KRUSEI, M.J.P.; RETTEW, D.C.; LISTWAK, S.J.; BERRETTINI, W.; STIPETIC, M.; HAMBURGER, S.; GOLD, P.W.; POTTER, W.Z.; RAPOPORT, J.L. Cerebrospinal fluid neurochemistry in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1992.

TAPIA-ARANCIBIA, L.; RAGE, F.; GIVALOIS, L.; ARANCIBIA, S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. **Front. Neuroendocrinol.**, New York, v. 25, n. 2, p. 77-107, 2004.

THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science.**, New York, v. 270, n. 5236, p. 593-598, 1995.

TIIHONEN, J.; KESKI-RAHKONEN, A.; LÖPPÖNEN, M.; MUHONEN, M.; KAJANDER, J.; ALLONEN, T.; NÄGREN, K.; HIETALA, J.; RISSANEN, A. Brain serotonin 1A receptor binding in bulimia nervosa. **Biol. Psychiatry**, New York, v. 55, n. 8, p. 871-873, 2004.

TREASURE, J.; OWEN, J.B. Intriguing links between animal behavior and anorexia nervosa. **Int. J. Eat. Disord.**, New York, v. 21, n. 4, p. 307-311, 1997.

TSUCHIDA, A.; NONOMURA, T.; ONO-KISHINO, M.; NAKAGAWA, T.; TAIJI, M.; NOGUCHI, H. Acute effects of brain-derived neurotrophic factor on energy expenditure in obese diabetic mice. **Int. J. Obes. Rel. Metab. Disord.**, Hampshire, v. 25, n. 9, p. 1286-1293, 2001.

VERSINI, A.; RAMOZ, N.; STRAT, Y.L.; SCHERAG, S.; EHRLICH, S.; BONI, C.; HINNEY, A.; HEBEBRAND, J.; ROMO, L.; GUELFI, J.D.; GORWOOG, P. Estrogen receptor 1 gene (ERS1) is associated with restrictive anorexia nervosa. **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 35, n. 8, p. 1818-1825, 2010.

WALSH, B.T.; DEVLIN, M.J. Eating disorders: progress and problems. **Science**, New York, v. 280, p. 1387-1390, 1998.

WOLFE, B.E.; METZGER, E.D.; JIMERSON, D.C. Research update on serotonin function in bulimia nervosa and anorexia nervosa. **Psychopharmacol. Bull.**, Rockville, v. 33, n. 3, p. 345-354, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world health report 1998: life in the 21st century: a vision for all.** Geneva, 1998.





20 – Sinto que os outros me pressionam para comer.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
21 - Passo muito tempo pensando em comer.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
22 – Sinto desconforto após comer doces.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
23 - Faço regimes para emagrecer.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
24 - Gosto de sentir meu estômago vazio.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
25 - Gosto de experimentar novos alimentos ricos em calorias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
26 – Sinto vontade de vomitar após as refeições.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

EAT (R) David M. Garner & Paul E. Garfinkel (1979), David M. Garner et al., (1982)



## ANEXO B – Aprovação do Projeto no CEP-HC



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 23 de fevereiro de 2010

Ofício nº 476/2010  
CEP/MGV


**Prezadas Senhoras,**

O trabalho intitulado **“ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES CANDIDATOS E TRANSTORNOS ALIMENTARES”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 302ª Reunião Ordinária realizada em 22/02/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 7099/2009.

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

  
**DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

**FELÍCIA BIGHETTI**

**PROFª DRª ROSANE PILOT PESSA RIBEIRO (Orientadora)**

Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-USP

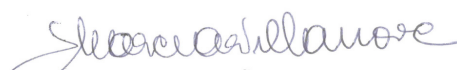
**ANEXO C – Aprovação do CEP-HC para a criação do banco de amostras dos genes**

Ribeirão Preto, 09 de junho de 2010

Ofício nº 1832/2010  
CEP/MGV**PROCESSO HCRP nº 1221/2010****Prezado Professor,**

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 309ª Reunião Ordinária realizada em 07.06.2010, recebeu a “Proposta para Criação do Banco de Amostras denominado: Estudos de Genes em Transtornos Alimentares” e a enquadrou na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para guarda de material biológico.**

Atenciosamente.



**DRª MÁRCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
**Vice-Coordenadora do Comitê de Ética**  
**em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP**

Ilustríssimo Senhor  
**PROF. DR. JOSÉ ERNESTO DOS SANTOS**  
Depto. de Clínica Médica



## **APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido**

Meu nome é Felícia Bighetti Sarrassini, sou nutricionista e aluna de pós graduação, nível doutorado, pela Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-USP. Gostaria de convidá-la para participar de uma pesquisa que estou realizando sobre Transtornos Alimentares, cujo objetivo é investigar a associação de alguns genes com esses quadros em jovens do sexo feminino, avaliar o seu estado nutricional, pelas medidas de peso e altura e determinar a freqüência dos genes de polimorfismos.

Caso você aceite, farei medidas de seu peso e altura a fim de conhecer seu estado nutricional atual, necessito que você preencha um questionário relacionado a atitudes alimentares para eu conhecer a maneira que você se relacionada com sua alimentação e com seu corpo e que você faça um exame de sangue, onde será colhido 10 mL de sangue por um técnico especializado sem necessidade de você estar em jejum. Esse procedimento será realizado no Laboratório de Nutrição do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP ou em sua casa em dia de sua preferência. Essa coleta de dados levará, no máximo, quarenta minutos, sendo que os mesmos não provocarão desconfortos significativos, pois a maioria deles (aferição de peso, altura e preenchimento do questionário) serão não métodos invasivos, apenas a coleta de 10 mL de sangue, considerado um método invasivo, poderá lhe causar algum grau de desconforto.

Saliento que a sua participação é voluntária, você tem toda a liberdade de se recusar a participar ou mesmo retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo para o atendimento/seguimento no serviço de saúde do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Não haverá recompensa financeira pela sua participação.

Garanto a você total sigilo assegurando sua privacidade quanto aos seus dados envolvidos nesta pesquisa, que a qualquer momento do estudo você poderá receber ou solicitar esclarecimentos adicionais sobre quaisquer aspectos relativos ao mesmo e que tudo o que for dito só será utilizado para esta pesquisa e você não será identificada em momento algum, podendo seu nome ser trocado para evitar identificação. É importante que você esteja ciente da possibilidade de

publicação deste trabalho ou apresentação dos resultados em congressos e outros eventos científicos.

O termo de consentimento está impresso em duas vias, sendo que uma delas ficará com você ou seu responsável, caso você tenha idade inferior a 18 anos e a outra com o pesquisador. Qualquer dúvida que você tiver a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa deverá ser esclarecida por mim.

Diante do exposto acima, eu (nós), \_\_\_\_\_, RG da participante e dos pais ou responsáveis \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, declaro (declaramos) estar (estarmos) ciente (s) das informações recebidas e concordo (concordamos) em participar voluntariamente deste estudo.

Assinatura da participante: \_\_\_\_\_.

Assinatura dos pais ou responsáveis (para sujeitos menores de 18 anos): \_\_\_\_\_.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.

Pesquisadora: \_\_\_\_\_

Felícia Bighetti Sarrassini

Rua Severiano Amaro dos Santos, 700 Bairro: Jardim Botânico – Ribeirão Preto – SP

Fone: (16) 9218-8010

Orientadora da Pesquisa: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Rosane Pilot Pessa Ribeiro

Fone: (16) 3602-4319

**APÊNDICE B** – Termo de consentimento para banco de amostras  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo  
Termo de Consentimento para guarda de material biológico

Eu, Felícia Bighetti Sarrassini, declaro ser responsável pelo banco de amostras “Estudos de genes em Transtornos Alimentares” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com o objetivo de guardar amostras de sangue e DNA para futuras pesquisas.

Este material será coletado por um exame de sangue, onde será colhido 10 mL de sangue por um técnico especializado sem necessidade de você estar em jejum. Esse procedimento será realizado no Laboratório de Nutrição do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP ou em sua casa em dia de sua preferência. Após coletado, será guardado no mesmo laboratório.

Desta forma, gostaria de convidá-la para guardar uma amostra de sangue sua para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. Você também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Eu me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confiabilidade; para isso, sua amostra de sangue será identificada por meio de um número.

Você deverá me informar de todos os dados para que eu possa encontrá-la, garantindo fornecer as informações de seu interesse. Além disso, poderá receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico.

Declaro que toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será buscado novamente seu consentimento específico, bem como será submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Agradeço a colaboração, colocando-me a disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

---

Felícia Bighetti Sarrassini – pesquisadora

Rua: Severiano Amaro dos Santos, 700. Ribeirão Preto-SP

Celular: (16) 9218-8010

### **Certificado de Consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_, RG:  
\_\_\_\_\_, morador (a) na  
Rua \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, na cidade de  
\_\_\_\_\_, telefone \_\_\_\_\_ abaixo  
assinado, tendo recebido as informações acima, aceito que minha amostra de  
material biológico seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob a  
responsabilidade do Prof. Dr. José Ernesto dos Santos, para fins de pesquisa e  
análise científica.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.

---

Assinatura do doador ou Responsável