

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ADAUTO VERSIANI RAMOS

A Contribuição dos polimorfismos (SNPs) do *FTO* e *UCP-1* com a obesidade extrema e fatores de risco cardiovascular em indivíduos Brasileiros.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção de título de Doutor.

Orientador: Luiz Armando De Marco

Belo Horizonte
2011

V221c Ramos, Aduino Versiani.
A contribuição dos polimorfismos (SNPs) do FTO e UCP-1 para
obesidade extrema e fatores de risco cardiovascular em indivíduos
brasileiros [manuscrito]. / Aduino Versiani Ramos. - - Belo Horizonte:
2011.
63f.: il.
Orientador: Luiz Armando De Marco.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.

1. Polimorfismo Genético. 2. Obesidade. 3. Fatores de Risco. 4.
Dissertações Acadêmicas. I. De Marco, Luiz Armando. II. Universidade
Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QU 500

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

Resumo

A obesidade tem se tornado uma patologia comum associada com significativa morbidade, mortalidade e efeitos adversos na qualidade de vida. Vários genes candidatos têm sido associados com a obesidade, desordens metabólicas e diabetes. Tem sido demonstrado que polimorfismos em dois dos mais proeminentes, *FTO* (Fat Mass and Obesity gene associated) e *UCP-1* (proteína desacopladora 1), estão hiperexpressos na população caucasiana obesa. A associação do polimorfismo destes genes com o fenótipo de obesidade e com uma população multi-étnica como a população Brasileira ainda não foi descrita. Com o objetivo de avaliar a associação entre o polimorfismo do gene do *FTO* e do gene da *UCP-1* com obesidade extrema e com fatores de risco cardiovascular numa população multi-étnica, nós genotipamos SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) rs9939609 no *FTO* e rs6536911, rs22705565 e rs12502572 no gene da *UCP-1* de 126 brasileiros obesos mórbidos [índice de massa corporal (IMC) $\geq 42.9 \pm 5.6 \text{ kg/m}^2$] e 113 controles não obesos pareados etnicamente (IMC $22.6 \pm 3.5 \text{ kg/m}^2$). A circunferência abdominal, a pressão arterial sanguínea, a glicose e o perfil lipídico foram também mensurados. A genotipagem foi realizada usando TaqMan® SNP Genotyping Assays. Cada amostra foi também genotipada para 40 pequenos polimorfismos de inserção/deleção bialélicos (indels) para estabelecer a ancestralidade da população estudada e para a determinação da proporção de ancestralidade biogeográfica de Europeus, Africanos e Ameríndios na população Brasileira. O polimorfismo do SNP *FTO* rs9939609 e o polimorfismo do SNP da *UCP-1* rs6536911 foram associados significativamente com o IMC ($p= 0.04$ e $p<0.0001$ respectivamente). Uma relação dependente do alelo de risco rs6536911 com o IMC foi observada nos controles. Não

houve nenhuma outra associação significativa entre os SNPs estudados e a hipertensão, dislipidemia e o diabetes após a correção para o IMC e não observamos um efeito sinérgico significativo entre os SNPs do *FTO* e do *UCP-1* com a obesidade. Os casos não apresentaram diferença estatisticamente significativa dos controles em relação à proporção de ancestralidade genômica.

Nossos dados demonstraram um papel consistente das variantes comuns do *FTO* rs9939609 e da *UCP-1* rs6536911 como possíveis contribuintes para a obesidade na população Brasileira, mas não com os fatores de risco cardiovascular. Não se demonstrou efeito sinérgico entre os polimorfismos e não houve diferença na ancestralidade genômica biogeográfica da população brasileira com obesidade extrema e nos controles.

Abstract

Obesity has become a common human disorder associated with significant morbidity, mortality and adverse effects on quality of life. Several candidate genes have reportedly been associated with obesity, related metabolic disorders and diabetes. Sequence variants in two of the prominent ones, *FTO* and *UCP-1*, have been reported to be overrepresented in obese Caucasian population. The association of these genes polymorphisms with the obesity phenotype and a multiethnic group such as the Brazilian population has not been previously reported. To assess the putative contribution of both *FTO* and *UCP-1* to body mass index (BMI) and cardiovascular risk in Brazilian individuals we genotyped SNPs rs9939609 in the *FTO* and rs6536911, rs22705565 and rs12502572 in the *UCP-1* genes from 126 morbidly obese subjects ($BMI \geq 42.9 \pm 5.6$ kg/m²) and 113 normal-weight ethnically matched control ($BMI 22.6 \pm 3.5$ kg/m²). Waist circumference, blood pressure, glucose and serum lipids were also measured. Genotyping was performed using TaqMan® SNP Genotyping Assays. Each sample was also genotyped for 40 biallelic short insertion/deletion polymorphism (indels) used for ethnic assignment and the estimation of the proportion of European, African and Amerindian biogeographical ancestry in the Brazilian population. Cases did not differ from controls in the proportions of genomics ancestry. The *FTO* SNP rs9939609 and *UCP-1* SNP rs6536911 were significantly associated with BMI ($p= 0.04$ and $p<0.0001$ respectively). An allele dose dependent tendency was observed for BMI for rs6536911 sample of controls. No other significant associations between any SNP and hypertension, hyperlipidemia and diabetes were noted after correction for BMI and no significant synergistic effect between *FTO* and *UCP-1* SNPs with obesity were noted. Our data are

consistent with *FTO* rs9939609 and *UCP-1* rs6536911 common variants as possible contributors to obesity in the Brazilian population.

Glossário

CEU: (Caucasianos Europeus) é uma das 11 populações do HapMap

Desequilíbrio de ligação (Linkage disequilibrium-LD): em populações genéticas, LD é a associação não randômica dos alelos em dois ou mais loci, não necessariamente no mesmo cromossoma. O Linkage disequilibrium descreve uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente numa população do que seria esperado pela formação aleatória de haplótipos a partir de alelos baseados nas suas frequências. Associações não aleatórias entre polimorfismos em loci diferentes são medidas pelo grau de linkage disequilibrium. Por exemplo, alelos dos SNPs que residem próximos uns dos outros no cromossomo frequentemente ocorrem em combinações não randômicas devido à infreqüente recombinação. Isto implica em dizer que alelos que estão em desequilíbrio de ligação migram juntos na divisão celular.

GWAS: *Genome-wide* association study (estudo de associação genômica ampla) é o exame de todos os genes ou a maioria deles (genoma) de diferentes indivíduos de uma população em particular para ver o quanto os genes variam de indivíduo para indivíduo. Diferentes variações são então associadas com diferentes características, tais como doenças. Nos seres humanos, esta técnica tem levado à descoberta de associações de genes específicos com doenças como a obesidade. Eles são úteis em encontrar os caminhos moleculares da doença, mas geralmente não são úteis na busca de genes que predizem os riscos da doença. Estes estudos comparam normalmente o DNA de dois grupos de participantes: pessoas com a doença (casos) e pessoas afins, sem a doença (controles). O DNA extraído é colocado em uma placa com chips de genes que são capazes de ler

milhões de seqüências de DNA. Estes chips são lidos em computadores. Em vez de ler a seqüência inteira do DNA, estes sistemas costumam ler os SNPs que são marcados para os grupos de variação do DNA (Haplótipos). Se as variações genéticas são mais freqüentes em pessoas com a doença, as variações são associadas com a doença. As variações genéticas associadas são então consideradas como referência para a região do genoma humano onde o problema causador da doença é provável de residir. Surpreendentemente, a maioria das variações dos SNPs associadas com doenças não está na região do DNA que codifica as proteínas. Em vez disso, elas geralmente estão nas regiões não codificadas do cromossomo entre os genes ou na seqüência intrônica que é editada fora do DNA quando as proteínas são processadas. Isto implica dizer que esta técnica tem alta sensibilidade para prever uma associação entre polimorfismo e a doença, mas uma baixa especificidade necessitando de replicação dos resultados em outras populações para se confirmar os resultados.

HapMap: é uma organização que visa desenvolver um **hap** lotype **mapa** (HapMap) do genoma humano, que descreverá os padrões comuns de variação genética humana. O HapMap é esperado para ser um recurso fundamental para os pesquisadores encontrarem variantes genéticas que afetam a saúde, a doença e as respostas aos medicamentos e aos fatores ambientais.

Haploview: é comumente usado em software de bioinformática onde é projetado para analisar e visualizar padrões de LD em genética de dados. Haploview também pode realizar estudos de associação, a escolha tag SNPs e estimar a freqüência do haplótipo.

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium (Equilíbrio de Hardy-Weinberg) Em uma população Mendeliana, dentro de determinadas condições, as freqüências alélicas

permanecerão constantes ao passar das gerações e as proporções genótípicas atingiriam um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo. Independentemente de um gene ser raro ou comum, a sua frequência permanecerá a mesma com relação aos outros desde que essas condições sejam mantidas. Por pura intuição poder-se-ia supor que alelos raros se tornariam cada vez mais raros e que alelos frequentes aumentassem cada vez mais sua frequência, simplesmente por já serem raros ou comuns, mas o princípio de Hardy-Weinberg demonstra matematicamente que isso não ocorre. A importância disto é que quando o princípio de Hardy-Weinberg é respeitado (ou está em equilíbrio) significa que a amostra populacional está equilibrada e poderia ser um retrato daquela população em uma escala maior.

Se as amostras representarem populações em equilíbrio de Hardy e Weinberg poder-se-á usar a alternativa de comparar as distribuições genótípicas dessas amostras.

MAF: frequência do Alelo menos comum do polimorfismo

Pairwise: comparação de pares, geralmente se refere a qualquer processo de comparação de entidades em pares para julgar qual de cada entidade é preferida, ou que tenha uma maior quantidade de alguma propriedade quantitativa.

SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único): é uma variação da sequência do DNA em que um único nucleotídeo (A, T, G ou C) no genoma é alterado. Variantes comuns são sinônimos de polimorfismo, definidos como variantes genéticas com a frequência do alelo menos comum de ao menos 1% na população. Ou seja, são mutações com uma frequência de mais de 1% da população e por isso deixam de receber o nome de mutação e sim de polimorfismo. SNPs são a classe mais prevalente de variação genética entre os

indivíduos. O genoma humano contém ao menos 11 milhões de SNPs com aproximadamente 7 milhões ocorrendo com uma frequência do alelo menos comum (MAF) de mais de 5% e o restante tendo uma MAF de 1-5%. Há diferenças entre as populações humanas, assim um polimorfismo (SNP) que é comum em um grupo geográfico ou étnico pode ser muito raro em outro.

tag SNP: é um representante de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em uma região com alto desequilíbrio de ligação (associação não aleatória de alelos em dois ou mais loci) Isto significa que todos os polimorfismos desta região estão altamente ligados e que permanecem juntos na divisão celular. O tag SNP é o seu representante mais importante e ao se estudar o comportamento do tag SNP se estuda todos os polimorfismos desta região. É possível identificar a variação genética sem genotipar cada SNP em uma região cromossômica.

Lista de Abreviaturas e Siglas:

ATP: Trifosfato de adenosina

Cols: Colaboradores

EDTA: **Ácido etilenodiamino tetra-acético** (anticoagulante)

¹⁸F-FDG: 18 Flúor flúorodeoxiglicose

FTO: Fat mass and obesity gene associated (gene associado à massa gordurosa e obesidade)

Ft: Fused toes (dedos fundidos)

GWAS: *Genome-wide* association study (estudo de associação genômica ampla)

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium (Equilíbrio de Hardy-Weinberg)

IMC: Índice de massa corporal

Kb: kilobases

kg/m²: quilograma por metro quadrado

LD: Linkage disequilibrium (desequilíbrio de ligação)

LEP: Leptina

LEPR: Receptor da Leptina

MAF: Alelo de menor frequência

MC4R: Receptor 4 da melanocortina

mRNA: RNA mensageiro

PCR: Reação de cadeia de polimerase

PET-CT: Tomografia de emissão de Positrons-tomografia computadorizada

POMC: Proopiomelanocortina

ROS: Espécies Oxigênio Reativas (Reactive Oxygen species)

SNPs: Polimorfismo de um único nucleotídeo

TAB: Tecido adiposo branco

TAM: Tecido adiposo marrom

UCP-1: Uncoupling proteína 1 (proteína desacopladora 1)

Legenda das Figuras e tabelas	Página
-------------------------------	--------

Figura 1	Localização <i>FTO</i> no braço longo (q) do cromossoma 16 na posição 12.2	21
Figura 2	Mapa da região da <i>UCPI</i> na posição 4q28-q31	26
Figura 3	Ilustração esquemática de como o tecido adiposo marrom gera calor: A <i>UCP-1</i> na célula adiposa marrom permite a saída (vazamento/ escape) dos prótons (H^+) gerados na cadeia respiratória através da membrana interna da mitocôndria, quando ativado pelo frio e pela dieta, diminuindo, portanto o gradiente de prótons (H^+) necessário para a síntese de ATP, dissipando esta energia na forma de calor	27
Figura 4	Associação entre 6536911 e IMC no grupo controle	38
Figura 5	Representação da estrutura de desequilíbrio de ligação (LD) através do gene da <i>UCP-1</i> . A parte superior do painel mostra a localização dos 3 polimorfismos do gene da <i>UCP-1</i> e o painel inferior mostra os resultados do Haploview. A LD está representada em cada quadrado (com os valores D' escritos dentro do quadrado) representando uma pairwise relação da ligação de desequilíbrio entre os 2 SNPs. Os quadrados indicam uma ligação de desequilíbrio estatisticamente significativa entre o par de SNPs quando medido pela estatística D' . Cores mais escuras de vermelho indicam maiores valores de D' , até o máximo de 1 e o quadrado branco	40

	indica pairwise D`valor de <1 sem evidência estatística de desequilíbrio de ligação (LD). Os blocos gerados estão marcados sob intervalo algorítmico do Haploview	
Figura 6	Proporções genômicas dos componentes de ancestralidade	41
Tabela 1	Papel demonstrado e proposto das proteínas desacopladoras	25
Tabela 2	Características clínicas dos pacientes obesos e controles	34
Tabela 3	Associação entre <i>FTO</i> rs9939609, <i>UCP-1</i> rs6536911, <i>UCP-1</i> rs22700565 e <i>UCP-1</i> rs12502572 com a obesidade e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)	36
Tabela 4	Características clínicas da população estudada de acordo com o genótipo do <i>FTO</i> rs9939609	37
Tabela 5	Características Clínicas da população estudada de acordo com o genótipo do <i>UCP1</i> rs6536911	37

Sumário	Página
Resumo	03
Abstract	05
Glossário	07
Lista de Abreviaturas e siglas	11
Legenda das Figuras e Tabelas	13
1.0 Introdução	17
1.1 Estudos de associação genômica ampla (GWAS)	18
1.2 Descoberta do <i>FTO</i> como um gene susceptível à obesidade	20
1.3 Descrição do <i>FTO</i>	20
1.4 O papel fisiológico do <i>FTO</i>	21
1.5 A relevância clínica do <i>FTO</i>	22
1.6 A descoberta do tecido adiposo marrom (TAM)	23
1.7 Descrição do gene da proteína desacopladora 1 (<i>UCP-1</i>)	25
1.8 O papel fisiológico da proteína desacopladora 1 (<i>UCP-1</i>)	26
1.9 A relevância clínica da <i>UCP-1</i>	27

2.0	Objetivos	29
3.0	Materiais e Métodos	30
3.1	Seleção de pacientes	30
3.2	Técnica da coleta do sangue periférico	30
3.3	Isolamento do DNA genômico para o estudo de polimorfismos	31
3.4	Genotipagem por Realtime PCR	31
3.5	Análise estatística	33
4.0	Resultados	34
5.0	Discussão	42
6.0	Conclusão	50
7.0	Referências Bibliográficas	51
8.0	Anexos	65
8.1	Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	65
8.2	Anexo 2: Parecer do Conselho de Ética em Pesquisa	69

1.0 Introdução

A prevalência de obesidade está aumentando rapidamente no mundo inteiro e já está alcançando proporções epidêmicas. É basicamente de início tardio e sua incidência aumenta com a idade, sendo proeminente após os 20-30 anos de idade (Kopelman *e cols.*, 2000). Isto tem ocorrido principalmente pelas alterações no estilo de vida ocorridas nas últimas décadas, com uma disponibilidade elevada de alimentos altamente calóricos associada a uma diminuição do nível de atividade física no trabalho e nas horas de lazer. Embora o índice de massa corporal (IMC) tenha aumentado nos diversos países (World Health Organization., 2000), alguns indivíduos parecem ser mais susceptíveis às alterações no estilo de vida, enquanto outros parecem ser mais resistentes. Estas diferenças podem ser, em parte, explicadas pela genética. A forte contribuição genética para obesidade tem sido estabelecida em numerosos estudos de gêmeos criados separadamente e de crianças adotadas que são mais parecidas a seus pais biológicos do que seus pais adotivos com respeito ao IMC (Sørensen *e cols.*, 1989; Stunkard *e cols.*, 1990; Maes *e cols.*, 1997). De fato, estimativas de hereditariedade que podem ser interpretadas como partes da variação da adiposidade em uma dada população variam de 50-70% para o IMC (Fabsitz *e cols.*, 1994; Allison *e cols.*, 1996) e de 75 a 80% para gordura corporal total (Stunkard *e cols.*, 1986; Faith *e cols.*, 1999). Outra indicação de contribuição genética para obesidade é a existência de formas graves de obesidade monogênica, causadas pela alteração de um único gene. Mutações raras nos genes codificadores de proteínas reguladoras do apetite tais como a Leptina (LEP) e seu receptor (LEPR) (Montague *e cols.*, 1997; Clément *e cols.*, 1998), do receptor 4 da melanocortina (MC4R) (Farooqi *e*

cols., 2003) e da proopiomelanocortina (POMC) (Krude *e cols.*, 1998) foram descritas como responsáveis pela obesidade grave de início na infância. Entretanto, a identificação destes inúmeros genes presentes nestas formas raras de obesidade monogênica não é capaz de explicar a alta prevalência de obesidade na população geral (Walley *e cols.*, 2009). A obesidade comum, ao contrário da obesidade monogênica, é poligênica e multifatorial, sem um padrão de herança Mendeliana simples (Boutin *e cols.*, 2001). A identificação dos genes susceptíveis para o desenvolvimento da obesidade, especialmente as variantes genéticas comuns na população geral, são de grande importância para compreender e melhorar a prevenção da obesidade.

1.1 Estudos de associação genômica ampla (GWAS):

Durante as duas últimas décadas, estudos utilizando métodos de genes candidatos e de ligação genômica ampla contribuíram para as pesquisas de genes e de variantes genéticas relacionadas a doenças complexas e comuns como a obesidade. Embora um grande número de variantes genéticas de *loci* de características que podem potencialmente predispor à obesidade tenham sido identificados, somente poucas destas variantes e *loci* foram convincentemente confirmados (Rankinen *e cols.*, 2006). Isto tem sido causado principalmente pelo fato da maioria dos estudos serem questionáveis em termos de desenho do estudo, da avaliação dos fenótipos, dos marcadores de genes analisados e do tamanho das amostras serem estatisticamente insuficientes.

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) têm contribuído para a descoberta de genes responsáveis por diversas doenças e tem permitido investigar alterações moleculares responsáveis por mecanismos patofisiológicos no contexto de

doenças humanas complexas. Similar ao estudo de ligação genômica ampla, o estudo de GWAS é uma técnica de hipótese livre que requer a avaliação do genoma inteiro com o objetivo de identificar novos genes ou associação de variantes genéticas relacionadas a uma doença ou característica, no caso obesidade. Enquanto estudos de ligação contam com a co-segregação de *loci* de cromossomas com a doença nas famílias estudadas (necessitam ter parentesco familiar), estudos de GWAS vinculam simples associação entre centenas de milhares de variações genéticas, geralmente polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e uma característica ou doença de interesse. Como não necessitam de parentesco familiar, estudos de GWAS podem usar simplesmente grandes coortes de casos e controles e assim serem baseado em um maior número de amostras que os típicos casos baseados em famílias. Dois maiores avanços na genética tem permitido este novo paradigma. Primeiro, o término do projeto genoma humano (The international Human Genoma Mapping Consortium 2001) e mais recentemente, do HapMap internacional (The International HapMap Consortium 2007) que aumentaram consideravelmente nosso conhecimento da heterogeneidade genética. Segundo, devido a grande melhoria da tecnologia de genotipagem que possibilitou genotipar mais de um milhão de variantes genéticas em um único experimento. Juntos, estes dois avanços têm permitido a construção de chips de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que podem apontar mais de 80% das variações genéticas descritas no HapMap (Magi *e cols.*, 2007). Essa mudança na capacidade de genotipar tem facilitado o progresso na busca aos genes com características complexas e melhorado nossa compreensão na biologia de muitas doenças e características no seu nível mais fundamental.

1.2 Descoberta do *FTO* como um gene susceptível à obesidade

Em 2007, dois estudos independentes (Frayling *e cols* 2007; Scuteri *e cols* 2007) utilizando a técnica de GWAS demonstraram uma associação significativa de variantes genéticas comuns (rs9939609, rs9930506, rs9926289, rs8050136) no gene *FTO* (Fat mass and obesity associated gene) relacionado com obesidade. Interessante, que no estudo de Frayling *e cols* (2007), o *FTO* foi descoberto através de um estudo de GWAS em pacientes diabéticos do tipo 2. Um grupo de SNPs comuns no primeiro intron do *FTO* mostrou uma forte e altamente significativa associação com diabetes tipo 2. Depois de corrigida para o IMC, a associação com diabetes do tipo 2 desapareceu completamente, sugerindo que a associação *FTO*-Diabetes tipo 2 fosse mediada pelo IMC. O segundo estudo, de Scuteri *e cols* (2007), também usando GWAS, investigou uma população de mais de 4.000 indivíduos da Sardenha demonstrando forte associação entre *FTO* e IMC.

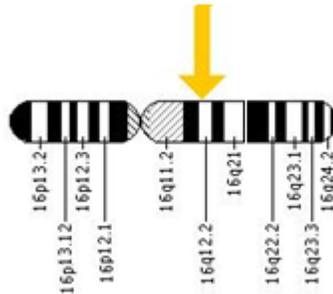
A associação do *FTO* e fenótipos relacionados à obesidade foram replicadas posteriormente em várias populações incluindo Caucasianos e Asiáticos (Dina *e cols.*, 2007; Hinney *e cols.*, 2007; Chang *e cols.*, 2008; Grant *e cols.*, 2008), embora estes dados não tenham sido confirmados em populações africanas e em algumas populações oceânicas (Ohashi *e cols.*, 2007; Hennig *e cols.*, 2009). Até o presente momento, não há relatos da associação do *FTO* com fenótipos relacionados à obesidade em uma população de descendência multi-étnica como a população Brasileira.

1.3 Descrição do *FTO*

O *FTO* é um gene com nove exons e mais de 400 Kb localizado no braço longo (q) do cromossomo 16 na posição 12.2 (figura 1). Os SNPs identificados nestes estudos estão

localizados no primeiro intron do gene, uma região onde a seqüência é fortemente conservada entre as espécies. Eles representam um grupo de ao menos 40 SNPs que estão altamente correlacionados (desequilíbrio de ligação $r^2 > 0.80$ no CEU do HapMap) em populações caucasianas (Loos *e cols.*, 2008).

Figura 1: Localização do gene *FTO* no braço longo (q) do cromossoma 16 na posição 12.2



1.4 O papel fisiológico do *FTO*

Quando a associação entre os SNPs no *FTO* e IMC foi descoberta (Frayling *e cols.*, 2007; Scuteri *e cols.*, 2007; Dina *e cols.*, 2007), pouco se sabia da função do produto do gene *FTO*. *Fto* foi identificado pela primeira vez em camundongos pela clonagem posicional (Peters *e cols.*, 1999) como um dos genes dentro de uma deleção de 1,6 megabase no cromossoma 8 responsável pelo fenótipo de dedos fundidos (Fused toes-FT) (van de Hoeven *e cols.*, 1994). Entretanto, nenhuma relação com obesidade ou magreza foi demonstrada nesses camundongos. Um fenótipo similar ao do camundongo *Ft* foi visto em humanos portando uma pequena duplicação do cromossomo 16q12.2, em uma região que inclui o gene *FTO* (Stratakis *e cols.*, 2000).

O mecanismo pelo qual o gene *FTO* leva à obesidade é ainda desconhecido (Gerken *e cols.*, 2007, Sanchez-Pulido *e cols.*, 2007). O gene *FTO* codifica uma reação de demetilação do ácido nucléico dependente da 2-oxoglutarato que está presente em muitos tecidos e é mais abundante no hipotálamo, onde o centro de controle de equilíbrio se encontra (Frayling *e cols.*, 2007; Gerken *e cols.*, 2007). Estudos em camundongos mostraram que os níveis de mRNA do *Fto* eram regulados pela alimentação e pelo jejum, dados esses que sugeriram uma ligação entre *FTO* e o peso corporal e a homeostase de energia (Gerken *e cols.*, 2007). Cecil *e cols.* (2008) demonstraram que a predisposição à obesidade em humanos não parecia estar envolvida na regulação do gasto energético quando avaliado por calorimetria indireta, mas poderia ter um papel no controle da ingestão alimentar e na escolha dos alimentos (avaliado após três refeições testes), sugerindo uma ligação a um fenótipo hiperfágico ou a uma preferência por alimentos mais ricos em energia. Desse modo é compreensível que a atividade de demetilação do ácido nucléico do *FTO* possa regular a expressão dos genes envolvidos no metabolismo e que a desregulação deste processo possa levar à obesidade.

1.5 A relevância clínica do *FTO*

A influência isolada do *FTO* no IMC e no risco de obesidade e sobrepeso é relativamente modesta, mas consistente através dos estudos realizados em populações Caucásicas. Cada alelo de risco aumenta o IMC em 0.40-0.66 kg/m² ou em 1.3-2.1 kg no peso corporal para uma pessoa de 1.80 metros de altura (Frayling *e cols.*, 2007; Scuteri *e cols.*, 2007; Andreasen *e cols.*, 2008). Em homozigose, os alelos de risco promovem um aumento de 3-4 kg e induzem um aumento de 1.67 vezes no risco de desenvolverem obesidade quando comparados àqueles que não têm os alelos de risco (Frayling *e cols.*,

2007; Scuteri *e cols.*, 2007). Crianças e adolescentes apresentam um aumento de 1,27 a 1,35 de serem obesas ou com sobrepeso para cada alelo de risco adicional (Frayling *e cols.*, 2007). Apesar deste efeito modesto, a importância do *FTO* não deve ser subestimada. A frequência dos alelos do *FTO* responsáveis por esse risco aumentado é alta em populações de descendência Européia que apresentam 63% da população carregando pelo menos um alelo de risco e 16% sendo homozigotos para os alelos de risco. Sob o ponto de vista de perspectiva populacional, 20% dos casos de obesidade entre os caucasianos poderiam ser prevenidos se os efeitos negativos dos alelos de risco do *FTO* fossem eliminados (Frayling *e cols.*, 2007; Dina *e cols.*, 2007). Entretanto, esta associação não significa causa, já que o estudo de Andreasen *e cols.* (2008) mostrou que 6000 dinamarqueses homozigotos para os alelos de risco do *FTO* tiveram esta susceptibilidade genética suprimida pela atividade física. Assim homozigotos para os alelos de risco do *FTO* seriam dois pontos no IMC mais pesados do que os controles se fossem sedentários enquanto que os homozigotos fisicamente ativos tinham o mesmo IMC do que os controles não portadores do alelo de risco.

Entretanto, baseado nestes estudos transversais, as variantes do *FTO* explicam somente 1-3% da variação do IMC (Frayling *e cols.*, 2007; Scuteri *e cols.*, 2007), sendo necessário continuar a procura por outros genes responsáveis pela obesidade.

1.6 A descoberta do tecido adiposo marrom (TAM)

Dois tipos de tecido adiposo podem ser distinguidos histologicamente e funcionalmente: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O tecido adiposo branco tem a função de armazenar o excesso de energia e de liberar hormônios e

citocinas que modulam o metabolismo corporal e a resistência insulínica (Ronti *e cols.*, 2006). O tecido adiposo marrom, localizado principalmente na região cervical supra clavicular e lateral ao músculo esternocleidomastóideo, é especializado na produção de calor (Cinti *e cols.*, 2006). O excesso de TAB causa obesidade, enquanto o TAM é importante para modular na forma de termogênese, o gasto de energia basal e estimulada, através da expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1) deste tecido específico. A contribuição dos mecanismos termorregulatórios para a regulação do peso corporal parecem ser críticos nos animais homeotérmicos (Kozak *e cols.*, 2000). O TAM é o maior sítio de termogênese (Frühbeck *e cols.*, 2009) e sua disfunção leva a obesidade, resistência à insulina e a diabetes não insulino-dependente em roedores (Lowell *e cols.*, 1993). É muito evidente que o TAM tem um importante papel na prevenção e tratamento da obesidade e do diabetes e que medicamentos específicos possam induzir o desenvolvimento do TAM em animais adultos (Lowell *e cols.*, 1993). Rothwell *e cols.*, (1983) demonstraram que 50 gramas de TAM estimulados poderiam provocar um aumento de 20% no metabolismo basal em um adulto humano. Até 2007, acreditava-se que, em humanos, somente os recém nascidos tinham TAM e que este atrofiava ou desaparecia na fase adulta, ao contrário dos animais. Portanto, o papel fisiológico do TAM em humanos era questionado. Entretanto, evidências inesperadas da presença de TAM ativo em humanos adultos (Nedergaard *e cols.*, 2007; Cypess *e cols.*, 2009) através da utilização combinada da tomografia de emissão de pósitrons e da tomografia computadorizada (PET-CT) evidenciaram a presença de tecido adiposo com elevada captação de ^{18}F -fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG) associado à expressão imunohistoquímica da UCP-1 (Zingaretti *e cols.*, 2009; Cypess *e cols.*, 2009).

1.7 Descrição do gene da proteína desacopladora 1 (UCP-1)

Até o momento (tabela 1), foram descritas cinco proteínas desacopladoras (UCP-1, UCP-2, UCP-3, UCP-4 e BMCP-1).

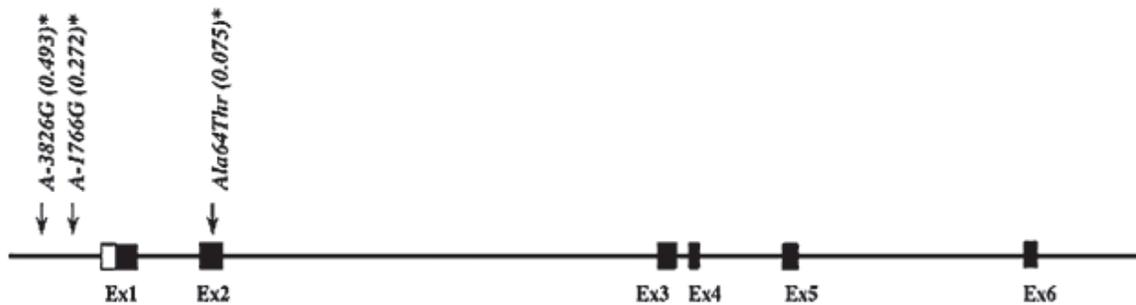
Tabela 1: Papel demonstrado e proposto das proteínas desacopladoras (Nübel e cols., 2006 modificado).

	UCP1	UCP2	UCP3	UCP4	BMCP1
Principal localização	TAM	Onipresente	Músculo esquelético	Sistema nervoso central	cérebro
Papel fisiológico	Termogênese	Secreção de insulina	Termogênese	Termogênese	Termogênese
	Limitação de ROS?	Termogênese? Limitação de ROS? e ATP?	Limitação de ROS? e ATP? Metabolismo de ácidos graxos?	Limitação de ROS? e ATP?	Limitação de ROS? e ATP?
Implicação patológica	Intolerância ao frio	Regulação da atividade inflamatória?	Obesidade?	Neuromodulação?	Sinalização do sistema nervoso central via ROS?
	obesidade	Proteção contra aterosclerose, envelhecimento e diabetes?	Efeitos pró-apoptóticos?	Neuroproteção contra apoptose?	
		Progressão do câncer?	Progressão do câncer?		
		Neuroproteção?			

ATP= Adenosina trifosfato; TAM= Tecido Adiposo Marrom; ROS= Espécies reativas de oxigênio; UCP= Proteína desacopladora; ?= papel proposto

A UCP-1 é uma proteína de 32 kilodaltons localizada na membrana interna das mitocôndrias. O seu gene está localizado no cromossoma 4q31(figura 2) e tem 6 exons (Shin e cols., 2005).

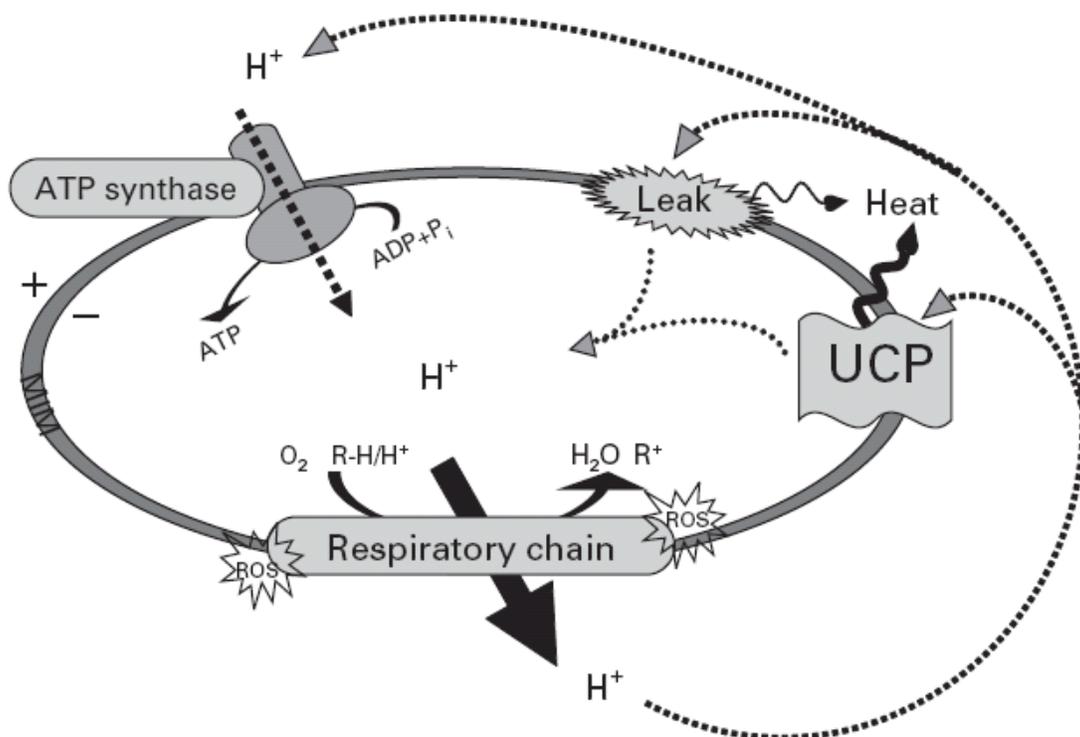
Figura 2: Mapa da região da UCP1 na posição 4q28-q31 (Jia *e cols.*, 2010)



1.8 O papel fisiológico da proteína desacopladora 1 (UCP-1)

A UCP-1 é abundante na membrana interna mitocondrial do tecido adiposo marrom (TAM) e atua como um transportador de prótons (figura 3), desacoplando a cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa evitando assim a síntese e o armazenamento de ATP e assim dissipando energia como calor (Argiles *e cols.*, 2002; Cinti *e cols.*, 2006).

Figura 3: Ilustração esquemática de como o tecido adiposo marrom gera calor: A UCP-1 na célula adiposa marrom permite a saída (vazamento/escape) dos prótons (H^+) gerados na cadeia respiratória através da membrana interna da mitocôndria, quando ativado pelo frio e pela dieta, diminuindo, portanto o gradiente de prótons (H^+) necessário para a síntese de ATP, dissipando esta energia na forma de calor (Nedergaard *e cols.*, 1992; Jia *e cols.*, 2010)



A condutância normalmente baixa de prótons é elevada, resultando em uma aceleração da respiração mitocondrial. A dissipação do gradiente eletroquímico de prótons leva a uma respiração desacoplada e à produção de calor, principal função do TAM (Nicholls *e cols.*, 1984). A expressão da UCP-1 é fortemente induzida quando a termogênese é induzida (Ricquier *e cols.*, 1986) e tem um papel importante na termogênese, no gasto energético e também na patogênese da obesidade e das desordens metabólicas em humanos (Bouillaud *e cols.*, 1988; Garruti *e cols.*, 1992; Lowell *e cols.*, 1997).

1.9 A relevância clínica da UCP-1

Embora a quantidade de TAM seja reduzida em humanos adultos, ela é responsável por 1-2% do gasto energético, prevenindo o ganho de peso de 1-2 kg/ano (Bouillaud *e cols.*, 1988; Lean *e cols.*, 1989; Klaus *e cols.*, 1991). Até o momento, muitos estudos de associação têm sido conduzidos em várias populações para elucidar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) da *UCP-1* com fenótipos relacionados à obesidade. Oppert *e cols.* (1994) estabeleceram uma relação entre o polimorfismo A-3826G do gene da *UCP-1* e a capacidade de se ganhar peso em indivíduos canadenses e Clément *e cols.* (1996) fizeram o mesmo em Franceses. Entretanto, estes resultados não foram reproduzidos em populações Holandesa (Van Rossum *e cols.*, 2002) e Polonesa (Kiec-Wilk *e cols.*, 2002). Vários SNPs da *UCP-1* tem sido descritos como associados a fenótipos de obesidade, doenças relacionadas à diabetes, dislipidemia e ganho de peso ou IMC (Hammann *e cols.*, 1998; Heilbronn *e cols.*, 2000; Kim *e cols.*, 2005).

A associação destes polimorfismos do gene do *FTO* e da *UCP-1* com o fenótipo de obesidade, fatores de risco cardiovascular e sua ancestralidade genômica biogeográfica numa população multi-étnica como a Brasileira não foi relatada.

2.0 Objetivos

1. Avaliar a associação entre o polimorfismo do gene do *FTO*(rs9939609) com obesidade extrema e com fatores de risco cardiovascular numa população multi-étnica.
2. Avaliar a associação entre o polimorfismo do gene da *UCP-1*(rs6536911, rs22705565 e rs12502572) com obesidade extrema e com fatores de risco cardiovascular numa população multi-étnica.
3. Avaliar se há efeito sinérgico entre os polimorfismos
4. Avaliar se há diferença na ancestralidade genômica biogeográfica da população brasileira com obesidade extrema e nos controles.

3.0 Materiais e Métodos

3.1 Seleção de pacientes:

Todos os indivíduos obesos que participaram do estudo eram pacientes do ambulatório de obesidade e cirurgia Bariátrica do Hospital Felício Rocho. Foram selecionados consecutivamente 126 indivíduos com IMC de $42.9 \pm 5.6 \text{ Kg/m}^2$ e com idade média de 40.3 ± 12.7 anos, que apresentavam critérios para cirurgia bariátrica (obesidade grau III ou obesidade grau II com co-morbidades associadas).

Cento e treze indivíduos de peso normal ou leve sobrepeso (IMC $22.6 \pm 3.5 \text{ Kg/m}^2$) e com idade de 50.0 ± 17.1 anos, também selecionados consecutivamente, formaram o grupo controle, com o objetivo de comparar os polimorfismos do *FTO* e *UCP-1* estudados tanto numa população obesa quanto numa população de peso normal. A altura e o peso foram medidos com os indivíduos utilizando roupas leves e sem sapatos e o IMC foi calculado através do peso em Kilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros. A cintura foi medida em centímetros e a pressão arterial foi aferida através de esfigmomanômetro e medida em mmHg. Foram colhidas amostras de sangue dos pacientes para dosagem de glicose, colesterol fracionado, triglicérides e para extração do DNA.

3.2 Técnica da coleta do sangue periférico:

Amostras de sangue venoso periférico foram colhidas em todos os 239 participantes do estudo após prévio consentimento formal, e armazenadas em tubos do tipo “Falcon” a

-80⁰c, até o momento da extração do DNA. A quantidade total de sangue coletada de cada indivíduo foi de 15 mililitros (ml) em tubos contendo EDTA 10% como anticoagulante. A extração do DNA foi realizada no laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.3 Isolamento do DNA genômico para o estudo de polimorfismos:

Após a coleta de sangue periférico, o DNA foi isolado e purificado através da técnica de alta concentração salina (Lahiri & Nurnberger, 1991), que, resumidamente, incluem:

1. Lise das células (leucócitos);
2. Remoção das proteínas por extração;
3. Precipitação do DNA total pelo etanol;
4. Dissolução do DNA em tampão contendo EDTA.
5. Quantificação do DNA obtido e diluição para 50ng/μL.
6. Genotipagem.

3.4 Genotipagem por Realtime PCR:

No presente estudo foi analisado o polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism-SNP) mais comum do Fat mass and Obesity (*FTO*) e três SNPs da proteína desacopladora-1 (uncoupling protein-1/ *UCP-1*). O SNP rs9939609 do *FTO* e os SNPs rs6536911, rs22705565 e rs12502572 da *UCP-1* foram genotipados pelo ensaio Taqman® de discriminação alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA). A PCR

foi realizada numa placa de 96- *Wells* (canaletas) num volume de 10µl de reação, utilizando 10ng de DNA genômico e sondas alélicas FAM/VIC dye. A reação foi realizada por 15 minutos a 95⁰c, e 40-50 ciclos por 15 segundos a 95⁰c e a 60⁰c por 45 segundos no Fast Thermocycler ABI 9800 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A placa do ensaio Taqman foi transferida para o sistema ABI 7500 Fast Real Time PCR no qual a intensidade do fluoróforo em cada canaleta da placa foi detectada. Os genótipos foram analisados usando o Sequence Detection Software versão 1.3. O controle de qualidade da genotipagem incluía em cada placa de 96 canaletas, controles positivos e negativos além de 10% de genótipos duplicados para checar a acurácia da genotipagem. O sucesso da genotipagem foi de 99.5% e a acurácia determinada pela concordância entre as duplicatas foi de 100%.

Em adição, cada amostra foi genotipada para 40 pequenos polimorfismos de inserção/deleção bialélicos (indels) para estabelecer a ancestralidade da população estudada (Bastos-Rodrigues *e cols.*, 2006). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ETIC 269/06). Todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento (Anexo) esclarecendo todos os detalhes do estudo.

3.5 Análise estatística

O desvio da frequência alélica do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) foi testado para todos os SNPs para verificar se as amostras das populações de casos e controles estavam em equilíbrio com o que seria esperado para estas populações multiétnicas, ou seja, para avaliar se elas seriam representativas da população estudada. Em adição, o padrão de LD entre os três SNPs estudados no gene da *UCP-1* foi testado utilizando o programa do *Haploview* com o objetivo de avaliar se estes polimorfismos caminhavam juntos ou se tinham comportamentos diferentes. O teste de 1000 permutações foi realizado para os SNPs testados próximos à *UCP-1* para confirmar os dados encontrados no *Haploview*. O programa *Unphased* foi utilizado para avaliar a frequência alélica e genotípica. Na tabela 2, o valor de p foi analisado usando o *Mann-Whitney U* test. O programa *GraphPad Prism 5* foi utilizado para determinar se há sinergismo entre os SNPs do *FTO* e *UCP-1*. Foi utilizado o programa *Structure* para estimar a proporção de ancestralidade européia, africana e ameríndia de cada grupo e o *software Unphased* para analisar os polimorfismos e sua associação com obesidade, diabetes e dislipidemia, hipertensão. As variáveis binárias foram comparadas com as variáveis categóricas com o teste do Qui-quadrado de Yates ou teste exato de Fisher. As comparáveis categóricas e as características quantitativas foram realizadas pelo teste *t-Student* (homocedasticidade) ou *Mann-Whitney*. Foi realizada uma análise multivariada (ANOVA) de todas as variáveis com significância estatística na análise univariada. Para comparação, foi utilizado um valor de $p < 0.05$ para alcance de significância estatística.

4.0 Resultados

As características clínicas dos 239 participantes do estudo estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes obesos e controles. Média \pm desvio padrão.

Medidas Antropométricas	Obesos n=126	Controles n=113	<i>P</i> valor
Idade (anos)	40.3 \pm 12.7	50.0 \pm 17.3	<0.0001
Sexo (M/F)	21/105	20/93	0.355
Altura (m)	1.63 \pm 0.09	1.60 \pm 0.09	0.038
Peso (kg)	115.0 \pm 21.4	58.3 \pm 10.4	<0.0001
IMC (kg/m ²)	42.9 \pm 5.6	22.6 \pm 3.5	<0.0001
Cintura (cm)	119 \pm 13	79 \pm 12	<0.0001
Dislipidemia (%)	54.9	46	0.631
HDL (mg/dl)	51 \pm 12	47 \pm 15	0.0248
LDL(mg/dl)	121 \pm 35	125 \pm 34	0.3355
Triglicérides (mg/dl)	151 \pm 91	134 \pm 65	0.3075
Diabetes (%)	17.2	11.4	<0.0001
Glicose (mg/dl)	105 \pm 42	89 \pm 21	<0.0001
Hipertensão (%)	40.9	21.2	0.0005
Pressão arterial sistólica (mmHg)	136 \pm 14	131 \pm 18	0.0016
Pressão arterial diastólica (mmHg)	87 \pm 9	82 \pm 9	<0.0001

Foram analisados 126 pacientes obesos com índice de massa corporal (IMC) de $42.9 \pm 5.6 \text{ kg/m}^2$ com idade média de 40.3 ± 12.7 anos e 113 pacientes com IMC de $22.6 \pm 3.5 \text{ kg/m}^2$ e com idade média de 50.0 ± 17.1 anos. Foi genotipado um polimorfismo (single nucleotide polymorphism/ SNP) no gene *FTO* (rs9939609) e 3 SNPs (rs6536911, rs22705565 e rs12502572) no gene da *UCP-1* (Proteína descopladora-1). Todos os polimorfismos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor P 0.88, 0.12, 0.35 e 0.49 para rs9939609, rs6536911, rs22705565 e rs12502572 respectivamente).

A frequência do alelo menor (MAFs) observada neste estudo foi de 0.435, 0.383, 0.056 e 0.480 para rs9939609, rs6536911, rs22705565 e rs12502572, respectivamente e foi similar à frequência encontrada na população listada no HapMap CEU (0.492, 0.540, 0.107 e 0.485, respectivamente).

Como mostrado na tabela 3, o SNP do *FTO* rs9939609 e o SNP rs6536911 da *UCP-1* tiveram uma associação significativa com a obesidade ($p=0.04$ e $p=4.09967e^{-006}$ respectivamente). Não houve diferença estatística com relação ao sexo ($p=0.355$). Após um processo de seleção de covariáveis para ajuste do modelo de regressão logística tivemos a confirmação da associação do SNP do *FTO* rs9939609 ($p=0.042$) e do SNP rs6536911 da *UCP-1* ($p<0.001$) com o IMC.

Tabela 3: Associação entre *FTO* rs9939609, *UCP-1* rs6536911, *UCP-1* rs22700565 e *UCP-1* rs12502572 com a obesidade e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)

Genótipo	Casos (126)		Controles (113)		<i>p</i>	OR	95% CI	HWE
	n	%	n	%				
<i>rs 9939609 (FTO)</i>								
Genótipo								
TT	34	27	41	36	0.04	1	-	0.88
TA	60	48	57	50		1.27	0.71-2.27	
AA	32	25	15	13		2.57	1.2-3.52	
Alelo								
T	128	51	139	62	0.02	1	-	
A	124	49	87	38		1.55	1.07-2.23	
<i>rs6536911 (UCP-1)</i>								
Genótipo								
TT	10	8	17	15	4.09967e ⁻⁰⁰⁶	1	-	0.12
TC	87	69	42	37		3.52	1.48-8.35	
CC	29	23	54	48		0.91	0.37-2.25	
Alelo								
T	107	42	76	34	0.046	1	-	
C	145	58	150	66		0.69	0.47-1.0	
<i>rs22700565 (UCP-1)</i>								
Genótipo								
TT	109	87	104	92	0.25	1	-	0.35
TA	16	13	9	8		1.70	0.72-4.01	
AA	1	1	0	0		2.968e+ ⁰⁰⁷	1.1e+ ⁰⁰⁴ -7.9e+ ⁰⁰⁴	
Alelo								
T	234	93	217	96	0.13	1	-	
A	18	4	9	4		1.86	0.82-4.21	
<i>rs12502572 (UCP-1)</i>								
Genótipo								
GG	40	32	46	41	0.35	1	-	0.49
GA	61	48	47	42		1.49	0.84-2.64	
AA	25	20	20	18		1.44	0.70-2.97	
Alelo								
G	141	56	139	62	0.22	1	-	
A	121	44	87	38		1.26	0.87-1.81	

Nas tabelas 4 e 5 são demonstradas as características das populações de obesos e controles de acordo com o genótipo do *FTO* rs9939609 e *UCP-1* rs6539911, respectivamente.

Tabela 4: Características clínicas da população estudada de acordo com o genótipo do *FTO rs9939609*

	idade	peso	altura	cintura	IMC	HDL	LDL	TG	PAS	PAD	Glucose
Obeso TT	37.7	115.8	163.3	116.5	43.1	52.8	126.2	149.9	137.1	86.2	109.9
dp	13.3	25.2	10.2	14.2	6.0	16.2	33.9	101.2	14.7	7.3	58.8
Obeso TA	42.6	115.8	163.2	122.0	43.3	51.1	126.2	161.0	135.2	86.3	105.4
dp	12.6	19.4	8.1	12.8	5.7	10.9	34.0	98.7	14.0	8.9	40.3
Obeso AA	38.8	112.7	163.8	117.4	41.8	49.8	107.6	134.3	136.3	87.3	99.0
dp	12.1	21.2	9.2	12.3	4.8	10.1	33.4	59.9	13.4	9.5	20.0
Controle TT	53.3	56.4	160.3	77.4	21.9	46.0	119.3	143.9	130.0	80.4	91.1
dp	17.6	10.7	8.9	11.1	3.4	12.3	33.9	63.9	18.5	9.6	28.1
Controle TA	49.8	60.2	160.2	81.7	23.4	48.4	129.4	124.5	131.8	81.9	85.1
dp	15.8	11.0	8.2	12.4	3.7	16.1	33.3	66.9	18.0	8.8	13.9
Controle AA	41.7	56.0	160.6	72.6	21.8	45.9	126.8	136.4	130.3	82.9	93.0
dp	20.2	5.3	10.8	10.4	2.1	17.9	35.5	64.3	15.0	6.5	18.0

(dp:desvio padrão, IMC: Índice de massa corporal, PAS: Pressão arterial sistólica, PAD: Pressão arterial diastólica)

Tabela5: Características Clínicas da população estudada de acordo com o genótipo do *UCPI rs6536911*

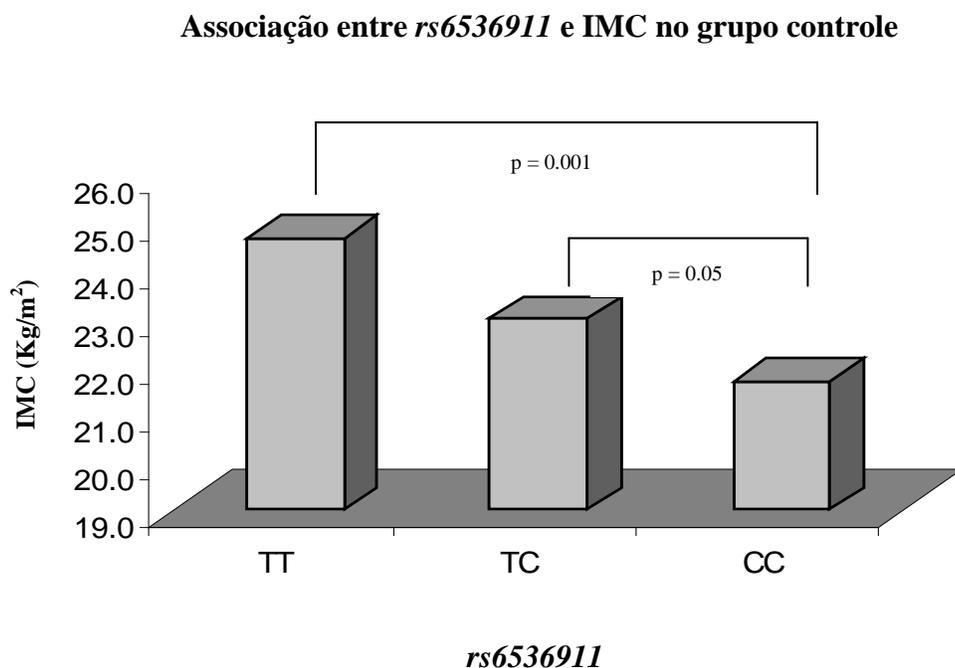
	idade	peso	altura	cintura	IMC	HDL	LDL	TG	PAS	PAD	Glucose
Obeso TT	40.5	124.2	164.3	124.6	45.6	47.2	113.1	142.1	131	83.5	98.5
dp	9.5	29.4	10.1	17.5	7.9	6.2	30.1	48.1	8.8	6.7	15.8
Obeso TC	39.8	114.6	163.6	119.7	42.6	50.6	119.6	154.0	137.4	87.2	107.7
dp	12.6	20.9	8.8	12.0	5.5	13.2	35.7	96.7	14.1	8.7	48.6
Obeso CC	41.9	113.0	162.4	116.5	42.7	54.4	129.3	145.4	133.4	85.7	98.9
dp	14.2	20.0	8.9	14.8	4.7	10.7	32.1	85.7	14.5	8.9	23.2
Controle TT	51.2	64.0	161.0	85.8	24.7	54.8	134.1	127.5	135.7	81.6	80.0
dp	16.3	9.7	6.1	11.9	3.4	15.0	39.1	52.4	21.7	6.3	12.6
Controle TC	52.1	58.0	158.4	81.2	23.0	42.3	133.4	157.6	134.2	83.3	91.1
dp	15.0	9.7	8.0	10.8	3.1	11.9	35.8	67.7	17.8	9.2	27.3
controle CC	48.0	56.6	161.6	74.4	21.7	49.3	113.1	110.4	126.9	80.1	89.3
dp	19.3	10.7	9.8	11.6	3.5	16.4	25.6	59.5	15.7	9.1	14.9

(dp:desvio padrão, IMC: Índice de massa corporal, PAS: Pressão arterial sistólica, PAD: Pressão arterial diastólica)

Já os dois outros SNPs da *UCP-1* não demonstraram associação significativa com a obesidade (Tabela 2: $p = 0.25$ e $p = 0.35$ respectivamente). Foi observado no grupo controle

um aumento do peso e do IMC proporcional à presença de alelos afetados para o polimorfismo do gene *UCP-1* rs6536911 (figura 4).

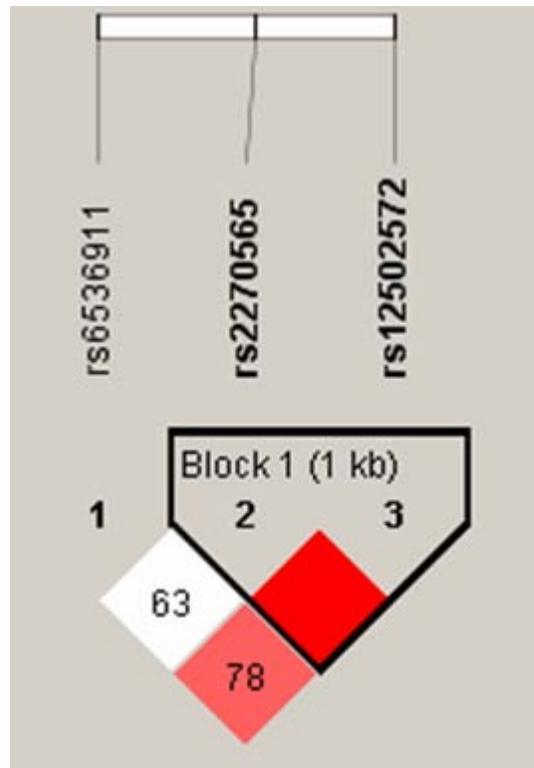
Figura 4: Associação entre 6536911 e IMC no grupo controle. TT alelo afetado em homozigose, TC alelo afetado em heterozigose e CC alelo nativo.



Houve também uma associação significativa entre os SNPs rs9939609 e rs6536911 com a presença de Diabetes melitus ($p=0.05$ e $p=0.01$, respectivamente), mas esta associação não permaneceu significativa após a estratificação do IMC. Também foi observada uma associação significativa entre o SNP rs6536911 e hipertensão arterial ($p=0.003$), mas novamente, após a estratificação do IMC essa relação não permaneceu significativa. Não houve associação de nenhum dos SNPs estudados com o diagnóstico de dislipidemia e síndrome metabólica. Apesar dos SNPs rs99399609 (*FTO*) e rs6536911

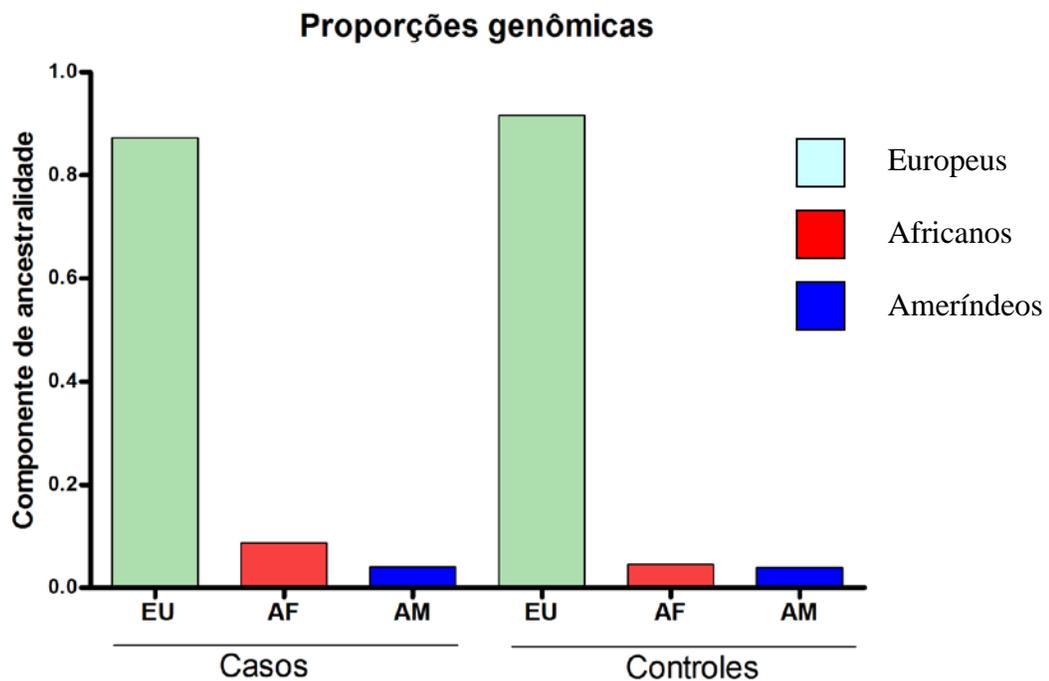
(*UCP-1*) estarem associados individualmente com a obesidade, não foi observado uma relação significativa de sinergismo entre eles. Dos 126 pacientes obesos que se submeteram à cirurgia bariátrica, obtivemos dados da variação de peso após 1 ano de 94 pacientes. Houve uma perda média de 41.5kg, mas não se observou associação estatística entre os SNPs rs99399609 (*FTO*) e rs6536911 (*UCP-1*) com esta variação do peso ($p=0.410$ e $p=0.394$ respectivamente). Na figura 5, observamos que há um desequilíbrio de ligação entre o SNP rs6536911 e os dois outros SNPs da *UCP-1* (rs22705565 e rs12502572).

Figura 5 Representação da estrutura de desequilíbrio de ligação (LD) através do gene da *UCP-1*. A parte superior do painel mostra a localização dos 3 polimorfismos do gene da *UCP-1* e o painel inferior mostra os resultados do Haploview. A LD está representada em cada quadrado (com os valores D' escritos dentro do quadrado) representando uma comparação da relação de desequilíbrio de ligação entre os 2 SNPs. Os quadrados indicam um desequilíbrio de ligação estatisticamente significativa entre o par de SNPs quando medido pela estatística D' . Cores mais escuras de vermelho indicam valores maiores de D' , até o máximo de 1 e o quadrado branco indica a comparação com D' de valor de <1 sem evidência estatística de desequilíbrio de ligação (LD). Os blocos gerados estão marcados sob intervalo algorítmico do Haploview. Os rs2270565 e rs12502572 têm o mesmo desequilíbrio de ligação e, portanto tem o mesmo comportamento numa divisão celular, diferente do que acontece com o rs6536911.



O componente ancestral de cada indivíduo foi calculado através da genotipagem dos indels. Para o grupo de obesos, a proporção de ancestralidade europeia, africana e ameríndia foi de 0.872 ± 0.021 , 0.087 ± 0.017 e 0.039 ± 0.092 (média \pm dp), respectivamente, enquanto que no grupo controle foi de 0.928 ± 0.012 , 0.037 ± 0.006 e 0.033 ± 0.061 , respectivamente. Não houve diferença significativa na ancestralidade genômica entre os dois grupos (Figura 6).

Figura 6: Proporções genômicas dos componentes de ancestralidade



5.0 Discussão:

São descritas numerosas variantes genéticas em associação com obesidade ou fenótipos relacionados à obesidade, mas apenas algumas destas variantes têm sido replicadas (Ioannidis *e cols.*, 2001, Yang *e cols.*, 2007). A falta de replicação tem sido um grande desafio nos estudos de associação genética de obesidade.

Neste trabalho, foi confirmada a associação da variante rs9939609 do *FTO* com o IMC numa população de Brasileiros de descendência multi-étnica. A população obesa que era homozigota para o alelo de risco pesava 3.1kg e 1.3 kg/m² a mais do que aqueles que eram homozigotos para o alelo protetor como demonstrado por Frayling *e cols* (2007). Eles (Frayling e cols., 2007) identificaram 10 diferentes SNPs no primeiro intron do gene do *FTO* que estão altamente correlacionados com a obesidade, sendo o rs9939609, o seu representante principal. Interessante que este estudo demonstrou uma forte e altamente significativa associação com diabetes tipo 2. Entretanto, depois de corrigida para o IMC, a associação com diabetes do tipo 2 desapareceu completamente, sugerindo que a associação *FTO*-Diabetes tipo 2 fosse mediada pelo IMC. No nosso trabalho, também não evidenciamos associação do *FTO* com diabetes tipo 2 ou com os outros fenótipos relacionados à obesidade nas análises quantitativas, principalmente após a estratificação para o IMC (ou seja, não houve correlação com diabetes, HAS, dislipidemia na ausência de obesidade) .

Ao analisarmos nossos dados do estudo de ancestralidade, percebemos que a nossa população, apesar de ser multi-étnica, apresentou grande influência da população Européia (mais de 85%) e com uma MAF semelhante ao do HapMap CEU justificando um efeito

do *FTO* semelhante ao encontrado em populações de descendência européia (Boardman *e cols.*, 2010). A associação do gene do *FTO* com a obesidade em humanos é robusta nas populações de descendência Européia (Dina *e cols.*, 2007; Frayling *e cols.*, 2007; Scuteri *e cols.*, 2007). Estes autores demonstraram uma associação significativa de variantes genéticas comuns (rs9939609, rs9930506, rs9926289, rs8050136) no gene *FTO* relacionado com obesidade. Porém, até o momento, resultados negativos têm sido observados em populações não Européias (Ohashi *e cols.*, 2007; Horikoshi *e cols.*, 2007, Li *e cols.*, 2008). Estes autores estudaram populações oceânicas, japoneses e chineses Han respectivamente e não encontraram associação do *FTO* com obesidade. Recentemente Liu *e cols.* (2010) demonstraram em 1978 jovens que o rs9939609 está associado com o IMC e a circunferência abdominal, mas não com o consumo de energia e o nível de atividade física tanto em europeus como em afro-americanos. Embora a arquitetura genética do loci do *FTO* não tenha sido desvendada em grande detalhe em várias dessas populações, evidências estão emergindo de que o rs9939609 pode estar em elevado desequilíbrio de ligação com uma variante casual em populações de descendência Européia, mas que este desequilíbrio de ligação pode ser quebrado em outras descendências ou grupos étnicos, tais como os negros (Grant *e cols.*, 2008).

Na literatura, o efeito do SNP do *FTO* no IMC também é modesto com os indivíduos homozigóticos para o alelo de risco pesando 3kg a mais do que aqueles que são homozigóticos para o alelo protetor (Frayling *e cols.*, 2007). Como impacto do ponto de vista de saúde pública das associações observadas, a elevação de 1 unidade no IMC tem sido associada a um aumento de 8% no risco de doença coronariana (Li *e cols.*, 2006) e o excesso de peso na meia idade tem sido associada a aumento de mortalidade geral (Adams

e cols., 2006). Entretanto, esta associação não significa causa, já que no estudo de Andreasen *e cols* (2008) demonstrou-se que 6000 dinamarqueses portadores homocigóticos para os alelos de risco do *FTO* tiveram esta susceptibilidade genética suprimida pela atividade física. Assim homocigotos para os alelos de risco do *FTO* eram 2 pontos no IMC mais pesados do que os controles se fossem sedentários enquanto os homocigotos fisicamente ativos tinham o mesmo IMC do que os controles não portadores do alelo de risco. Outros autores, como Rampersaud *e cols* (2008) e Ruiz *e cols* (2010) também demonstraram através de um acelerômetro que a atividade física poderia neutralizar os efeitos gênicos do *FTO* no IMC. Isto teria uma implicação prática no futuro onde, as pessoas portadoras do SNP do *FTO* poderiam ser estimuladas à prática de atividade física como forma de inativar o efeito genético obesogênico deste SNP. Não foi avaliado o nível de atividade física na nossa população e isto poderia ser considerado uma limitação na análise de nossos dados. A associação SNP-IMC fica dentro de um bloco de 47 kilobase (Kb) em desequilíbrio de ligação compreendendo partes dos primeiros dois introns e do exon 2 do gene do *FTO*. Assim, o sinal da associação pode ser devido à correlação entre a variante intrônica do SNP do *FTO* e uma variante em outro lugar qualquer no gene ou nos outros genes controladores (Frayling *e cols.*, 2007). O mecanismo preciso pelo qual gene *FTO* induz ao desenvolvimento da obesidade não está bem estabelecido (Gerken *e cols.*, 2007; Sanchez-Pulido *e cols.*, 2007). Cecil *e cols* (2008) demonstraram através de refeições padronizadas que a predisposição para a obesidade não parece estar envolvida na regulação do gasto energético, mas tem um papel no controle da ingestão alimentar e na escolha dos alimentos sugerindo uma ligação para hiperfagia ou para a ingestão de alimentos ricos em calorias. Eles demonstraram um aumento do consumo de alimentos associado com o alelo de risco, ou seja, a presença do alelo do

rs9939609 afetava o consumo de energia independente da ingesta anterior à refeição teste, mesmo após correção para idade e IMC. Estas observações não puderam ser explicadas pela presença de *outliers*, já que a análise paramétrica do consumo total de energia promoveu resultados similares (Cecil *e cols.*, 2008).

Entretanto, baseado nestes estudos transversais, as variantes do *FTO* explicam somente 1-3% da variação do IMC (Frayling *e cols.*, 2007; Scuteri *e cols.*, 2007), sendo necessário continuar a procura por mais genes que afetam a obesidade.

No presente estudo, também foram investigados os efeitos dos SNPs do gene da *UCP-1* na obesidade e fenótipos relacionados à obesidade entre pessoas brasileiras. Os achados demonstram uma associação significativa entre o polimorfismo (SNP) rs6536911 com a obesidade, mas não com os SNPs rs2270565 e rs12502572. Novamente, após a estratificação do IMC, não houve associação entre o SNP rs6536911 e diabetes tipo 2 ou com hipertensão. De modo interessante, o efeito do rs6536911 foi maior que o efeito do *FTO* em nossa população, com os indivíduos homozigotos para o alelo afetado pesando em média 3kg/m² a mais que os homozigóticos para o alelo protetor. Uma das explicações para o não efeito dos SNPs rs2270565 e rs12502572 seria a MAF muito pequena do primeiro (0.056) na população estudada e por eles estarem em outro desequilíbrio de ligação em relação com o SNP rs6536911 que mostrou associação, justificando comportamentos diferentes entre eles.

Numerosos genes candidatos parecem determinar fatores genéticos implicados na patogênese da obesidade, desordens metabólicas relacionadas e diabetes. A contribuição dos mecanismos termorregulatórios para a regulação do peso corporal parecem ser críticos

nos animais homeotérmicos (Kozak *e cols.*, 2000). Silva *e cols* (1997) demonstraram que a termogênese no TAM é devido a UCP-1, onde a expressão do gene é aumentada pelo frio, pela estimulação adrenérgica, pelos β_3 agonistas e pelos hormônios tireoidianos. Por estes fatores, a UCP-1 foi considerada ser um destes genes candidatos. O gene da *UCP1* tem sido descrito ter um papel importante na termogênese e no gasto energético e é implicado na patogênese da obesidade e desordens metabólicas em humanos (Bouillaud *e cols.*, 1988; Garruti *e cols.*, 1992; Lowell *e cols.*, 1997). Embora a quantidade de TAM seja reduzida em humanos adultos, ela ainda é responsável por 1-2% do gasto energético, prevenindo o ganho de peso de 1-2 kg/ano (Bouillaud *e cols.*, 1988; Lean *e cols* 1989; Klaus *e cols.*, 1991). Até o momento, muitos estudos de associação também foram conduzidos em várias populações para elucidar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) da *UCP-1* com fenótipos relacionados à obesidade. Oppert *e cols* (1994) estabeleceram pela primeira vez uma relação entre o polimorfismo -3826- do gene da *UCP-1* e a capacidade de se ganhar peso em indivíduos canadenses e Clément *e cols* (1996) fizeram o mesmo em Franceses. Eles não observaram uma diferença significativa entre os obesos mórbidos e os não obesos quanto à presença do polimorfismo A-3826G do gene da UCP-1, entretanto, na população obesa mórbida a presença deste está associado a um maior ganho de peso na vida adulta. Tem sido relatado que vários SNPs estão associados com fenótipos de obesidade, doenças relacionadas a diabetes, dislipidemia e ganho de peso ou IMC (Hamann *e cols.*, 1998; Heilbronn *e cols.*, 2000; Kim *e cols.*, 2005). Hamann *e cols* (1998) observaram em alemães uma frequência maior do polimorfismo Ala64Thr em 293 crianças e adolescentes obesas quando comparadas com 134 indivíduos magros. Já Heilbronn *e cols* (2000), estudaram 526 mulheres

australianas com sobrepeso e obesidade e concluíram que a presença do polimorfismo A-3826G do gene da UCP-1 aumentava a suscetibilidade para a obesidade indicando que a UCP-1 poderia estar envolvida na regulação do peso corporal. Kim e cols (2005) descreveram pela primeira vez, o polimorfismo A-1766G que está 2kb abaixo do polimorfismo A-3826G, mas sem nenhuma ligação entre eles, em 397 mulheres Coreanas e acharam que o haplótipo GG foi significativamente associado com um aumento na gordura corporal. Entretanto estes resultados não foram reproduzidos em uma população Holandesa (van Rossum *e cols.*, 2002) e Polonesa (Kiec-Wilk *e cols.*, 2002). van Rossum e cols (2002) compararam 286 holandeses de 20-40 anos que ganharam uma média de 12.8kg (5.5kg-47kg) durante uma média de seguimento de 6.8 anos com 296 holandeses que permaneceram com o peso relativamente constante pelo mesmo período de tempo e eles não conseguiram determinar uma associação do polimorfismo A-3826G do gene da UCP-1 com o ganho de peso. Kiec-Wilk e cols (2002) estudaram 118 poloneses com sobrepeso/obesidade e eles não demonstraram um papel significativo do polimorfismo A-3826G do gene da UCP-1 com o desenvolvimento de obesidade ou de distúrbios do metabolismo da glicose, mas observaram uma relação com um aumento dos níveis de triglicérides e redução do HDL colesterol. Possivelmente, as diferentes características metodológicas entre os estudos ou os diferentes tipos étnicos ou fatores ambientais e culturais expliquem estas divergências (Boardman *e cols.*, 2010).

Demonstramos que os polimorfismos rs9939609 do gene do *FTO* e rs6536911 do gene da *UCP-1* aumentaram significativamente o risco de obesidade, mas não o risco de fenótipos relacionados à obesidade na população brasileira. Apesar dos SNPs rs9939609 do gene do *FTO* e rs6536911 do gene da *UCP-1* estarem associados individualmente com

a obesidade, não houve efeito sinérgico entre eles. Uma amostragem maior da população poderia evidenciar este sinergismo ou, caso contrário, pelo fato de estarem em cromossomos diferentes não teriam correlação. Também não observamos um efeito dos SNPs rs9939609 do gene do *FTO* e rs6536911 do gene da *UCP-1* com relação à variação de peso em um ano dos 94 pacientes obesos que se submeteram a cirurgia bariátrica. Os SNPs rs2270565 e rs12502572 do gene da *UCP-1* não apresentaram correlação com a obesidade ou fenótipos relacionados à obesidade. Neste caso, a explicação mais provável seria MAF muito pequena para ser representativa (quanto menor a frequência do alelo menor (MAF), maior a necessidade de uma grande amostragem para determinar significância) ou simplesmente devido à falta de correlação destes SNPs com uma população multi-étnica como a brasileira.

Brasileiros formam uma população heterogênea, que é o resultado de cinco séculos de cruzamentos étnicos entre pessoas de três continentes: os colonizadores Europeus, principalmente representados pelos Portugueses, os escravos africanos e os Ameríndios nativos. Estes três grupos têm se misturado continuamente de modo que há uma correlação muito pequena entre a cor da pele e a ancestralidade no Brasil (Parra *e cols.*, 2003). Embora com maior representatividade da descendência Européia, a diferença nas proporções de ancestralidade genômica entre os obesos e controles não foi significativa. Estes dados foram semelhantes aos resultados encontrados em uma população de Minas Gerais (Pena *e cols.*, 2009). A presença dos controles genômicos ajuda a excluir possíveis explicações alternativas com relação à influência da ancestralidade racial ou étnica entre os casos e controles (Boardman *et al.*, 2010). Estes achados trazem importantes questões na epidemiologia genética e social da obesidade.

Apesar do recente sucesso em identificar variantes genéticas relacionadas à obesidade usando o método de GWAS, está bem estabelecido que tais variantes não causam obesidade sem o indivíduo ser exposto a um ambiente obesogênico e que o mesmo seja sedentário. Também, somente uma pequena fração da contribuição genética da obesidade tem sido descoberta até o momento (Frazer *e cols.*, 2009). Frazer e cols demonstraram que os estudos de GWAS não capturam informações sobre as variantes raras e têm limitado poder estatístico para detectar pequenas interações gene-gene e gene-ambiente. Estas complexas interações entre os fatores genéticos e ambientais podem estar mascarando os efeitos de variantes genéticas específicas. Além do mais, mais estudos são necessários e com maior número de pacientes para examinar se outras variantes comuns no gene do *FTO* e no gene da *UCP-1* contribuem para o risco de obesidade ou de fenótipos relacionados à obesidade na população brasileira.

6.0 Conclusão:

Demonstrou-se uma associação entre o polimorfismo do gene do *FTO* (rs9939609) com obesidade, mas não com os fatores de risco cardiovascular.

Demonstrou-se também uma associação entre o polimorfismo do gene da *UCP-1* (rs6536911) com obesidade, mas não com os fatores de risco cardiovascular.

Não se demonstrou associação entre os polimorfismos (rs22705565 e rs12502572) do gene da *UCP-1* com a obesidade e/ou fatores de risco cardiovascular.

Não se demonstrou efeito sinérgico entre os polimorfismos.

Não houve diferença na ancestralidade genômica biogeográfica da população brasileira com obesidade extrema e nos controles.

7.0 Referências Bibliográficas:

1. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006;355:763-778.
2. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:501-6.
3. Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torekov SS, Wegner L, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Rasmussen SS, Clausen JO, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen L, Jorgensen T, Pedersen O, Hansen T. Low physical activity accentuates the effect of FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 2008;57:95-101.
4. Argiles JK, Busquets S, López-Soriano FJ. The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1145-1152.
5. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Annals of Human Genetics* 2006;70: 658-665.
6. Boardman JD, Blalock CL, Corley RP, Stallings MC, Domingue BW, McQueen MB, Crowley TJ, Hewitt JK, Lu Y, Field SH. Ethnicity, body mass and genome-wide data. *Biodemography Soc Biol* 2010;56:123-36.

7. Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C, Ricquier D. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP-1) : UCP-2, UCP3, BMCP1 and UCP-4. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:107-119.
8. Bouillaud F, Villarroya F, Hentz E, Raimbault S, Cassard AM, Ricquier D. Detection of brown adipose tissue uncoupling protein mRNA in adult patient by a genomic probe. *Clin Sci* 1988; 71:291-297.
9. Boutin P, Froguel P. Genetics of human obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001; 15:391-404.
10. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CNA. An Obesity-Associated *FTO* gene variant and increased energy intake in children. *N England J Med* 2008;359:2558-66.
11. Chang YC, Liu PH, Lee WJ, Jiang YD, Li HY, Kuo SS, Lee KC, Chuang LM. Common variation in the fat mass and obesity-associated (FTO) gene confers risk of obesity and modulates BMI in the Chinese population. *Diabetes* 2008;57:2245-2252.
12. Cinti S. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2006;16:569-74.
13. Clément K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P. Additive effect of A/G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the trp64arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight-gain in morbid-obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:1062-1066.

14. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Goumelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401.
15. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Roadman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of Brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009;360:1509-1517.
16. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoœur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruitz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724-726.
17. Fabsitz RR, Sholinsky P, Carmelli D. Genetic influences on adult weight gain and maximum body mass index in male twins. *Am J Epidemiol* 1994;140:711-20.
18. Faith MS, Pietrobelli A, Nuñez C, Heo M, Heymsfeld SB, Allison DB. Evidence for independent genetic influences on fat mass and body mass index in a pediatric twin sample. *Pediatrics* 1999;104:61-7.

19. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4-receptor gene. *N Engl J Med* 2003;348:1085-95.
20. Forga LI, Corbalán M, Marti A, Fuentes C, Martínez-González MA, Martínez A. Influence of the polymorphism 03826A→G in the *UCP-1* gene on the components of metabolic syndrome. *An. Sis. Sanit. Navar.* 2003; 26:231-236.
21. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin M, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos R, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CNA, Doney ASF, Morris AD, Smith GD, The Wellcome Trust Case Control Consortium, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889-94.
22. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009;10:241-251.
23. Frühbeck G, Becerril S, Sáinz N, Garrastachu P, Garça-Velloso MJ. BAT: A new target for human obesity? *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:387-96.
24. Garruti G, Ricquier D. Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16:383-390.

25. Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CL, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O’Rahilly S, Schofield CL. The obesity – associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007;308:1469-72.
26. Grant SF, Li M, Bradfield JP, Kim CE, Annaiah K, Santa E, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Shaner JL, Smith RM, Imielinski M, Eckert AW, Chivacci RM, Berkowitz RI, Hakonarson H. Association analysis of the *FTO* gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. *PloS ONE* 2008; 3:e1746.
27. Hamann A, Tafel J, Büsing B, Münzberg H, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Ricquier D, Greten H, Hebebrand J, Matthaei S. Analysis of the uncoupling protein-1 (*UCP-1*) gene in obese and lean subjects: identification of four amino acid variants. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:939-941.
28. Heilbronn LK, Kind KL, Pancewicz E, Morris AM, Noakes M, Clifton PM. Association of -3826G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women. *Diabetologia* 2000;43:242-244.
29. Hennig BJ, Fulford AJ, Sirugo G, Rayco-Solon P, Hattersley AT, Frayling TM, Prentice AM. *FTO* gene variation and measure of body mass in an African population. *BMC Med Genet* 2009;10:21.

30. Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brönner G, Muller TD, Grallert H, Illig T, Wichmann HE, Rief W, Schäfer H, Hedebrand J. Genoma Wide Association (GWASS) Study for Early Onset Extreme Obesity Supports the Role of Fat Mass and Obesity Associated Gene (*FTO*) Variants. PLoS ONE 2007; 2:e1361.
31. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R, Ueki K, Froguel P, Kadowaki T. Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in Japanese population. Diabetologia 2007;50:2461-2466.
32. Ionnisidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ionnisidis DG. Replication validity of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. Nat Genet 2001;29:306-309.
33. Jia JJ, Tian Yb, Cao Zh, Tao Ll, Shang X, Gao Sz, Ge Cr, Lin QY, Jois M. The polymorphisms of *UCPI* genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. Mol Biol Rep 2010; 37:1513-1522.
34. Kiec-Wilk B, Wybrauska I, Malczewska-Malec M, Leszczyuska-Golabek L, Partyka L, Niedbal S, Jabrocka A, Dembińska-Kiec A. Correlation of the -3826 A/G polymorphism in the promoter of the uncoupling protein 1 gene with obesity and metabolic disorders in obese families from southern Poland. J Physiol Pharmacol 2002;53:477-490.

35. Kim KS, Cho DY, Kim YJ, Choi SM, Kim JY, Shin SU, Yoon YS. The finding of new genetic polymorphism of UCP-1 A-1766G and its effects on body fat accumulation. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:149-155.
36. Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D. The uncoupling protein UCP: a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int J Biochem* 1991;23:791-801.
37. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635-643.
38. Kozak LP, Harper ME. Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr* 2000;20:339-363.
39. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grütters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998;19:155-7.
40. Lahiri DK, Numberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Research* 19 (1991), p. 5444.
41. Lean ME. Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc* 1989;48:243-256.
42. Li H, Wu Y, Loos RJF, Hu FB, Liu Y, Wang J, Yu Z, Lin X. Variants in the fat mass- and obesity- associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* 2008;57:264-68.

43. Li TY, Rana JS, Manson JE, Willet WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rexrode KM, Hu FB. Obesity as compared with physical activity in predicting risk of coronary heart disease in women. *Circulation* 2006;113:499-506.
44. Liu G, Zhu H, Lagou V, Gutin B, Stallmann-Jorgensen IS, Dong Y, Snieder H. FTO variant rs9939609 is associated with body mass index and waist circumference, but not with energy intake or physical activity in European and African-American youth. *BMC Med Genet* 2010;11:57-68.
45. Loos RJF, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obesity reviews* 2008;9:246-50.
46. Lowell BB, Flier JS. Brown adipose tissue, β -adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med* 1997;48:307-316.
47. Lowell BB, Susulic SV, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. Development of obesity in transgenic mice after ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993;366:1740-2.
48. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997;27:325-351.
49. Magi R, Pfeufer A, Nelis M, Montpetit A, Metspalu A, Remm M. Evaluating the performance of commercial whole-genome marker sets for capturing common genetic variation. *BMC Genomics* 2007;8:159.

50. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *JAMA* 2003;289:76-79.
51. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Diqby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in human. *Nature* 1997;387:903-8.
52. Müller TD, Hinney A, Scherag A, Nguyen TT, Schreiner F, Schäfer H, Hebebrand J, Roth CL and Reinehr T. Fat mass and obesity associated gene (FTO): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *BMC Medical Genetics* 2008;9:85-90.
53. Nedergaard J, Bengtsson, T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol.* 2007;293:E444-E452.
54. Nedergaard J, Cannon B. The uncoupling protein thermogenic and mitochondrial thermogenesis. In: Ernster L (ed) *New comprehensive biochemistry: molecular mechanisms in bioenergetics*. Elsevier, Amsterdam, pp385-420.
55. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 1984;64:61-64.
56. Nübel T, Ricquier D. Respiration under control of Uncoupling proteins: clinical perspective. *Horm Res* 2006;65:300-310.

57. Ohashi J, Naka I, Kimura R, Natsuhara K, Yamauchi T, Furusawa T, Nakazawa M, Ataka Y, Patarapotikul J, Nuchnoi P, Tokunaga K, Ishida T, Inaoka T, Matsumura Y, Ohtsuka R. *FTO* polymorphism in oceanic populations. *J Hum Genet* 2007;52:1031-5.
58. Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D, Pérusse L, Bouchard C. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994;18:526-531.
59. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Penna SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl. Acad Sci.* 2003;100:177-182.
60. Pena SDJ, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:870-876.
61. Peters T, Ausmeier K, Rütther U. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused Toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome* 1999;10:983-986.
62. Price RA, Li WD, Zhao H. *FTO* gene SNPs associated with extreme obesity in cases, controls and extremely discordant sister pairs. *BMC Medical Genetics* 2008;9:4-9.
63. Rampersaud E, Mitchell BD, Pollin TI, Fu M, Shen H, O'Connell JR, Ducharme JL, Hines S, Sack P, Naglieri R, Shuldiner A, Sniker S. Physical activity and the association of common *FTO* gene variants with body mass index and obesity. *Arch Intern Med* 2008;168:1791-1797.

64. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obes Res* 2006;14:529-644.
65. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-578.
66. Ricquier D, Bouillaud F, Toumelin P, Mory G, Bazin R, Arc J, Penicaud L. Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptional regulated step during activation of thermogenesis. *J Biol Chem* 1986;261:13905-13910.
67. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;4:355-65.
68. Rothwell NJ, Stock MJ. Luskonsumption, diet-induced thermogenic and brown fat: the case in favour. *Clin Sci (Lond)* 1983;64:19-23.
69. Ruiz JR, Labayen I, Ortega FB, Legry V, Moreno LA, Dallongeville J, Martinez-Gomez D, Bokor S, Manios Y, Ciarapica D, Gottrand F, De Henauw S, Molnár D, Sjöström M, Meirhaeghe A. Attenuation of the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on total and central body fat by physical activity in adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2010;164:328-333.

70. Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem.* **2007** 8;8:23.
71. Saunders CL, Chiodini BD, Sham P, Lewis CM, Abkevich V, Adeyemo AA, de Andrade M, Arva R, Berenson GS, Blangero J, Boehnke M, Borecki IB, Chagnon YC, Chen W, Comuzzie AG, Deng HW, Duggirala R, Feitosa MF, Froguel P, Harson RL, Hebebrand J, Huezo-Dias P, Kissebah AH, Li W, Luke A, Martin LI, Nash M, Ohman M, Palmer LJ, Peltonen L, Perola M, Price RA, Redline S, Srinivasan SR, Stern MP, Stone S, Stringham H, Turner S, Wijmenga C, Collier DA. Meta-analysis of genome-wide linkage studies in BMI and obesity. *Obesity* 2007;15:2263-2275.
72. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orru M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PloS Genet* 2007;3:e115.
73. Shin HD, Kim KS, Cha MH, Yoon Y. The effects of UCP-1 polymorphisms on obesity phenotypes among Korean female subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:624-630.
74. Silva JE, Rabelo R. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 1997;136:251-264.

75. Sørensen TI. Genetic and environmental influences on obesity assessed by the adoption method. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1989;37:525-31.
76. Stratakis CA, Lafferty A, Taymans SE, Gafni RI, Meck JM, Blancato J. Anisomastia associated with interstitial duplication on chromosome 16, mental retardation, obesity, dysmorphic facies, and digital anomalies: molecular mapping of a new syndromes by fluorescent in situ hybridization and microsatellites to 16q13. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3396-3401.
77. Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. A twin study of human obesity. *JAMA* 1986;256:51-4.
78. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 1990;322:1483-7.
79. Urhammer SA, Hansen T, Borch-Johnsen K, Pedersen O. Studies of synergistic effect of the trp/Arg64 polymorphism of the b3-adrenergic receptor gene and -3826 A/G variant of the uncoupling protein-1 gene on features of obesity and insulin resistance in a population-based sample of 379 young Danish subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3151-3154.
80. van der Hoeven F, Schimmanq T, Volkmann A, Matei MG, Kyewski B, Rüther U. Programmed cell death is affect in the novel mouse mutant Fused Toes (Ft). *Development* 1994;120:2601-2607.
81. van Rossun CT, Hoebee B, Seidell JC, Bouchard C, Van Baak MA, De Groot CP, Chagnon M, de Graaf C, Saris WH. Genetic factors as predictors of weight-gain in

- young adult Dutch men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:517-528.
82. Walley JA, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nature Reviews genetics* 2009;10:431-42.
83. Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr* 2008;87:398-404.
84. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic, Report of a WHO consultation, parts I and III. Geneva World Health Organization; 2000.
85. World Health Organization 2006. Fact sheet: obesity and overweight. Geneva: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>. Accessed May 10,2009.
86. Yang W, Kelly T, He J. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev* 2007;29:49-61.
87. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, Cinti S. The presence of UCP-1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB journal* 2009;23:3113-3120.

8.0 Anexos:

8.1 Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nº Registro COEP: ETIC 269/06

Título do Projeto: Farmacogenômica e farmacogenética da Obesidade

“O “senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa de título:” Farmacogenômica e farmacogenética da Obesidade”. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia atentamente as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se você não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Se você concordar em participar basta preencher os seus dados e preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se você tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa.

Obrigado (a).

Objetivo do estudo

Este projeto está sendo proposto porque há pouco conhecimento nacional sobre os genes envolvidos com a fisiopatologia da obesidade e a interação destes genes com diversos fatores presentes em nosso meio, ao longo da vida. A maior parte do conhecimento sobre a obesidade origina-se de amostras provenientes de populações eminentemente brancas e de classe média dos Estados Unidos e Europa Ocidental. O objetivo desse trabalho é o de estudar uma população brasileira, o papel de alguns

genes que possam causar obesidade, de modo a propiciar uma melhora no prognóstico e tratamento dos pacientes.

Procedimentos

Todos os indivíduos com obesidade já diagnosticada, assinarão termo de consentimento esclarecido. Não serão administrados aos pacientes quaisquer fármacos ou testes diagnósticos. O único inconveniente aos quais os pacientes serão submetidos será a coleta de sangue total ou coleta de saliva. O desconforto da coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina e é realizada com material estéril, descartável e por pessoas treinadas. O material colhido (sangue ou saliva) será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa, não havendo quaisquer custos para o paciente. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolveram custos ou pagamentos de qualquer espécie.

Pesquisadores

A equipe de pesquisadores é composta pelos seguintes profissionais: Dr. Luiz Armando De Marco (Coordenador da pesquisa), Dra. Maria Marta Sarquis Soares, Dra. Wolfanga Lentz Bóson e Dr. Aduino Versiani Ramos.

Confidencialidade

Todos os dados gerados nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Os dados de cada participante receberão um código e não terão nenhuma identificação que permita associá-los a um participante em particular. Caso o senhor (a) queira poderá ter acesso aos resultados individuais.

Benefícios e riscos

Esta pesquisa não oferece qualquer risco ao participante, uma vez que consiste apenas de coleta de sangue total ou saliva; exceto aqueles inerentes à própria coleta de

sangue total. Esta pesquisa é sem benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a compreender os mecanismos envolvidos com a obesidade.

Não haverá qualquer tipo de despesa ao paciente, no que tange a materiais ou testes. Ao assinar esse termo de consentimento o senhor (a) não está abrindo mão de seus direitos legais.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Senhor (a) _____ que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o paciente participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reservo-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou danos, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores, Dr. Luiz Armando De Marco e Dra. Wolfanga Lentz Boson no telefone 3499-2717 (UFMG) ou Dra. Maria Marta Sarquis Soares, no telefone 3295-5267 (Hospital Felício Rocho) ou Dr. Adauto Versiani Ramos no telefone 3337-4926.

Eu, _____, paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, para que se façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20_____.

Assinatura do Participante

(COEP (Campus da Pampulha, Av. Antônio Carlos, 6627, telefone 3499-4592), caso algum dos participantes queira se informar sobre o projeto independentemente da equipe do Coordenador).