

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (UFMG)
INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MEDICINA MOLECULAR
(INCT-MM)

Cinthia Vila Nova Santana

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *FOXO3A*, *AMPK* E
POMC E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE MÓRBIDA**

Belo Horizonte

2013

Cinthia Vila Nova Santana

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *FOXO3A*, *AMPK* E
POMC E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE MÓRBIDA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre junto ao Programa de pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Marco Aurélio Romano Silva e coorientação do Dr. Luiz Alexandre Viana Magno.

Belo Horizonte

2013

Santana, Cinthia Vila Nova.
S232a Avaliação de polimorfismos nos genes FOXO3a, AMPK e POMC e sua relação com a obesidade mórbida [manuscrito]. / Cinthia Vila Nova Santana. -- Belo Horizonte: 2013.
93f.: il.
Orientador: Marco Aurélio Romano Silva.
Co-Orientador: Luiz Alexandre Viana Magno.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Obesidade Mórbida. 2. Polimorfismo Genético. 3. Proteínas/genética. 4. Pró-Opiomelanocortina. 5. Marcadores Genéticos. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Romano-Silva, Marco Aurélio. II. Magno, Luiz Alexandre Viana. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WD 210

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

Cinthia Vila Nova Santana

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *FOXO3A*, *AMPK* E
POMC E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE MÓRBIDA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre junto ao Programa de pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Marco Aurélio Romano Silva e coorientação do Dr. Luiz Alexandre Viana Magno.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2013.

Banca Examinadora:



Prof. Marco Aurélio Romano Silva / orientador



Prof.ª Luciana Bastos Rodrigues



Prof.ª Débora Marques de Miranda

Belo Horizonte

2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Emerson e Nádia, por todo o amor, pelo porto seguro, por todas as longas e curtas conversas por telefone e pela confiança em mim depositada. Aos meus irmãos, Brenda e Vinni, por me ensinarem a enxergar como é bom ter irmãos, pela amizade sincera e pela companhia.

Ao Jhonny pelo amor, compreensão, companheirismo e por ser meu anjo da guarda desde o primeiro instante.

Aos meus tios Emílio e Lívia, por me incentivarem a continuar sempre estudando.

Aos meus amigos da Bahia, Edinho, Marcelle, Sâmela, Eduardo, Natayme, Jamille, Patrícia, que, mesmo longe, estão presentes alegrando meus dias.

Aos meus amigos de Belo Horizonte, Flavinha, Jéssika, Gabriel, Priscila, Vitor, Érika, Patrícia, Simone, Karen, Antônio, Manuel, Paulo, Alexandre Barros, Célio, Elizete, Geise, Luiza, que me receberam com muito carinho e se tornaram amigos queridos. Em especial, meu agradecimento à Daniela e ao “tio” Ricardo por me presentear com uma amizade tão sincera.

Ao Alexandre Magno que, além de um grande amigo, foi de extrema importância para a construção da minha vida científica.

Aos professores, Marco Aurélio, Débora, MVG, Luiz Armando, Marcelo Mamede, Rodrigo Nicolato por contribuírem com a minha formação e por acreditarem no meu trabalho. E também ao Dr Adauto Versiani, Marcos Vinícius Cardoso e Dra Valéria Sandrim pela colaboração no recrutamento dos indivíduos participantes desta pesquisa.

Agradeço ainda aos que não citei aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa.

Finalmente, agradeço a Deus por permitir que pessoas tão especiais entrem no meu caminho e por todas as bênçãos concedidas a mim e à minha família.

"In a way, science is more of a vocation than a regular daytime job. The secret to surviving a PhD is proactively avoiding common problems and learning to enjoy what you are doing. Nothing in life is worth doing without passion, and a career in science is an exemplary case."

(Leonardo Almeida-Souza & Jonathan Baets)

“A ciência não tem sentido senão quando serve aos interesses da humanidade”

(Albert Einstein)

RESUMO

A obesidade mórbida (OBM) é um distúrbio metabólico comum na população mundial. A doença representa um alto risco para a saúde já que, frequentemente, encontra-se associada a diversas comorbidades, como doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Além de fatores ambientais, diversos estudos também têm sugerido que determinados polimorfismos genéticos predisõem ao desenvolvimento da OBM. Os genes *FOXO3a* (fator de transcrição *forkhead box O 3a*), *AMPK* (proteína quinase ativada por AMP) e *POMC* (proopiomelanocortina) codificam proteínas reguladoras do metabolismo energético e comportamento alimentar e, desta forma, é possível que suas variantes genéticas possam modular a susceptibilidade à OBM. Por esse motivo, os polimorfismos dos genes *FOXO3a* (*rs1536057*, *rs2802292*, *rs3813498*, *rs1935952*), *AMPK* (*rs1442760*, *rs1036851*, *rs1348316*, *rs11584787*) e *POMC* (*rs934778*, *rs6545975*) foram investigados a fim de conferir o risco de desenvolver OBM. Para tanto, foram recrutados 242 pacientes obesos mórbidos (IMC ≥ 40 Kg/m²) e 283 indivíduos saudáveis (IMC $\leq 24,99$ Kg/m²). Em seguida, os polimorfismos de interesse foram avaliados através do método *TaqMan Genotyping* a partir de DNA isolado do sangue. As análises genéticas do estudo demonstraram que as frequências alélicas e genotípicas de quatro dos polimorfismos estudados, a saber, *rs1536057* (*FOXO3a*), *rs103685* (*AMPK*), *rs934778* e *rs6545975* (*POMC*), foram distribuídas diferentemente entre os grupos de obesos mórbidos e indivíduos saudáveis. Nenhuma associação significativa foi encontrada quando as análises de interação gene-gene foram empregadas. Os resultados deste estudo fornecem dados inéditos sobre a frequência genética dos marcadores estudados na população brasileira e sustentam o princípio de que variações genéticas específicas podem conferir o risco de desenvolver a OBM.

Palavras-chave: obesidade mórbida, *FOXO3a*, *AMPK*, *POMC*, polimorfismo.

ABSTRACT

Morbid obesity (MO) is a metabolic disorder that affects people worldwide. Excessive fat accumulation in MO patients is frequently found to increase the risk for several co-morbidities, including cardiovascular disease and type 2 diabetes. Although environmental factors are well-known to play a role in MO risk, accumulate evidence has also highlighted that inherited factors may predispose subjects to MO. Because the genes *FOXO3a* (*forkhead box O 3a* transcription factor), *AMPK* (activated protein kinase) and *POMC* (proopiomelanocortin) encode regulatory proteins that act on both energy metabolism and feeding behavior, here we have addressed whether polymorphisms in these genes are risk factors to MO. Therefore, the genetic frequencies of *rs1536057*, *rs2802292*, *rs3813498*, *rs1935952* (*FOXO3a*), *rs1442760*, *rs1036851*, *rs1348316*, *rs11584787* (*AMPK*) and *rs934778*, *rs6545975* (*POMC*) were evaluated in 242 morbidly obese patients (BMI \geq 40 kg/m²) and 283 healthy subjects (BMI \leq 24.99 kg/m²). DNA samples were isolated from blood and genotyping was performed by TaqMan-based assays. Our findings revealed that out of 10 polymorphisms analyzed, only allele and genotype frequencies of *rs1536057* (*FOXO3a*), *rs103685* (*AMPK*), *rs934778* and *rs6545975* (*POMC*) were heterogeneously distributed between morbid obesity and healthy subjects groups. Furthermore, epistasis analysis did not show any significant model of genetic interaction influencing the susceptibility to morbid obesity. Results of this study for the first time provide data on distribution of *FOXO3a*, *AMPK* and *POMC* polymorphisms in the Brazilian population and suggest that selected genetic variants may confer risk of morbid obesity in humans.

Keywords: morbid obesity, *FOXO3a*, *AMPK*, *POMC*, polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem da população com IMC \geq 30 Kg/m ² desde 1960 com previsão para 2025.....	02
Figura 2: Modelo do balanço energético regulado pelo SNC em resposta a sinais adipocitários.	07
Figura 3: Controle da ingestão alimentar pelo SNC em resposta a sinais periféricos.....	09
Figura 4: Regulação transcricional pelo fator de transcrição <i>FOXO3a</i>	13
Figura 5: Regulação de FOXO pela via da insulina e em condições de estresse....	15
Figura 6: Principais ações da proteína AMPK.....	17
Figura 7: Modulação de AMPK frente a situações de fome e de saciedade.....	19
Figura 8: Substratos fosforilados a partir da ativação da AMPK.....	20
Figura 9: Estrutura do gene e processamento pós-transcricional de POMC.....	21
Figura 10: Ação de POMC no controle da ingestão alimentar.....	22
Figura 11: Esquema ilustrativo do mecanismo da PCR em tempo real.....	30
Figura 12: Resultado ilustrativo da análise da discriminação alélica em uma PCR em tempo real no aparelho Stratagene Mx3005P QPCR System.....	32
Figura 13: Comparação entre os perfis genotípicos e os parâmetros clínico laboratoriais alterados no grupo dos obesos mórbidos.....	42
Figura 14: Blocos haplotípicos para o gene <i>FOXO3a</i> na amostra total (a) e, separadamente, para casos (b) e controles (c).....	44
Figura 15: Blocos haplotípicos para o gene <i>AMPK</i> na amostra total (a), apenas nos casos (b) e apenas nos controles (c).....	45

Figura 16: Ausência de blocos haplotípicos para o gene POMC na amostra total (a) e, separadamente, para os obesos mórbidos (b) e os controles (c).....45

Figura 17: Dendograma gerado pelo MDR.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do grau de obesidade e risco de comorbidades de acordo com o IMC.....	03
Tabela 2: Valores de referência para dosagem de colesterol total e suas frações e triglicerídeos para adultos (maiores de 20 anos de idade).....	05
Tabela 3: Polimorfismos selecionados, sua localização cromossômica, gênica e a mutação correspondente.....	29
Tabela 4: Sondas selecionadas para o estudo.....	30
Tabela 5: Caracterização clínica dos indivíduos obesos mórbidos e controles.....	35
Tabela 6: EHW e MAF para os <i>tagSNPs</i> usados neste estudo.....	36
Tabela 7: Frequências genótípicas e alélicas dos <i>tagSNPs</i> de <i>FOXO3a</i>	39
Tabela 8: Frequências genótípicas e alélicas dos <i>tagSNPs</i> de <i>AMPK</i>	40
Tabela 9: Frequências genótípicas e alélicas dos <i>tagSNPs</i> de <i>POMC</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
AG: ácido graxo
AgRP: proteína agouti-relacionada
AMPK: gene da proteína quinase ativada por AMP
CART: transcrito relacionado a cocaína e a anfetamina
CEU: caucasianos europeus
CV: validação cruzada (*cross-validation*)
EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg
FOXO3a: *forkhead Box O 3a*
GWAS: estudos de associação genômica (*Genome-Wide Association Studies*)
HDL: lipoproteína de alta densidade
IMC: índice de massa corporal
IR: receptor de insulina
LD: desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*)
LDL: lipoproteína de baixa densidade
MAF: menor frequência alélica
MC4R: receptor da melanocortina 4
MDR: *Multifactor Dimensionality Reduction*
MSH: hormônios estimuladores de melanócitos
NIH: *National Institutes of Health*
NPY: neuropeptídeo Y
OBM: obesidade mórbida
OMS: Organização Mundial da Saúde
OR: *odds ratio*
PCR: reação da polimerase em cadeia
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase
POMC: gene da proopiomelanocortina
ROS: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
SNC: sistema nervoso central
SNP: polimorfismo de base única
UTR: região não traduzida

SUMÁRIO

Introdução.....	01
1. A obesidade.....	02
1.1. A obesidade mórbida.....	04
1.2. Parâmetros laboratoriais.....	04
2. Etiologia da obesidade.....	05
2.1. Metabolismo e o balanço energético.....	06
2.1.1. O comportamento alimentar no hipotálamo.....	08
2.2. Genética da obesidade.....	10
3. Os genes candidatos.....	12
3.1. <i>Forkhead box O 3a (FOXO3a)</i>	12
3.2. Proteína quinase ativada por AMP (<i>AMPK</i>).....	16
3.3. Proopiomelanocortina (<i>POMC</i>).....	20
Objetivos.....	24
1. Objetivo geral.....	25
2. Objetivos específicos.....	25
Materiais e métodos.....	26
1. Recrutamento dos indivíduos e parâmetros laboratoriais.....	27
2. Coleta e obtenção do DNA.....	27
3. Seleção dos polimorfismos.....	28
4. Genotipagem pela PCR em tempo real.....	29
5. Análise estatística.....	32
Resultados.....	34
1. Caracterização da amostra.....	35
2. Análise genética.....	36
2.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	36
2.2. Frequências genéticas e estimativas de risco.....	37
2.3. Haplótipos.....	43
2.4. Análise de interação gene-gene.....	45

Discussão.....	47
Conclusão.....	56
Referências bibliográficas.....	58
Glossário.....	74
Anexos.....	78

Introdução

1. A obesidade

A obesidade é uma condição onde há um acúmulo excessivo de gordura que apresenta risco para a saúde (WHO, 2012). Uma vez considerado um problema apenas dos países de renda elevada, o sobrepeso e a obesidade também estão aumentando em países de baixa e média renda, especialmente em áreas urbanas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a população global de obesos mais que duplicou desde 1980 e, pelo menos, 2,8 milhões de adultos morrem por ano em consequência da obesidade e sobrepeso. Em 2008, aproximadamente 1,5 bilhões de adultos (acima de 20 anos) estavam acima do peso e cerca de 500 milhões eram obesos. Estima-se que em 2015 cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão acima do peso e, dentre estes, mais de 700 milhões de indivíduos serão obesos (WHO, 2012).

Nos últimos 30 anos, houve um rápido avanço nos índices de obesidade (Figura 1) devido à revolução econômica trazida pela globalização, o que afetou enormemente o estilo de vida da população dos grandes centros urbanos. O Brasil já ganhou papel de destaque neste cenário. Recentemente, pesquisas do Ministério da Saúde têm ressaltado a preocupação com o grande aumento no índice de obesos no país. Estudos mostraram que o percentual de obesos subiu de 11,4% em 2006 para 15,8% em 2011 e, estima-se que em 2025 este índice possa atingir até 30% (Ministério da Saúde, 2012).

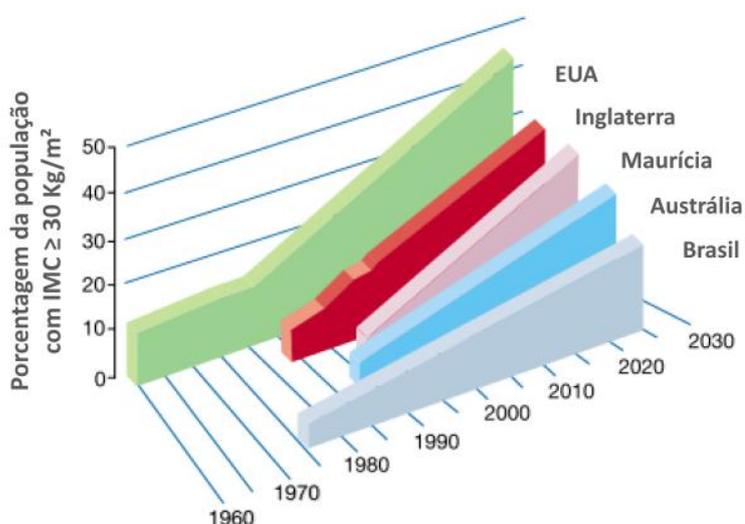


Figura 1: Porcentagem da população com IMC \geq 30 Kg/m² desde 1960 com previsão para 2025. Histórico, situação atual e previsão até 2025 para porcentagem da população obesa nos

Estados Unidos, Inglaterra, Maurícia (ilha localizada no oceano Índico), Austrália e Brasil (Kopelman, 2000).

A medida preconizada pela OMS para definição da obesidade é o índice de massa corporal (IMC), no qual o peso do indivíduo (em quilogramas) é dividido pelo quadrado de sua altura (em metros). Um IMC de 25,00 kg/m² ou mais é classificado como sobrepeso, ao passo que um IMC igual ou acima de 30,00 kg/m² é considerado como obesidade (Tabela 1) (Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010). No entanto, apesar de ser um bom indicador, o IMC não está totalmente correlacionado com a gordura corporal, uma vez que este índice não distingue a massa gordurosa da massa magra e tampouco reflete a distribuição da gordura corporal. Esta última é uma importante limitação, pois o acúmulo da gordura visceral (intra-abdominal) aumenta o risco para comorbidades associadas à obesidade, tais como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* e hipertensão (Folsom *et al.*, 1990; Carey *et al.*, 1997; Rexrode *et al.*, 1998).

Tabela 1: Classificação do grau de obesidade e risco de comorbidades de acordo com o IMC.

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidades
Abaixo do peso	< 18,50	Baixo
Peso normal	18,50 - 24,99	Médio
Sobrepeso	25,00 - 29,99	Aumentado
Obeso	≥ 30,00	
Obesidade grau I	30,00 - 34,99	Moderado
Obesidade grau II	35,00 - 39,99	Grave
Obesidade grau III ou mórbida	≥ 40,00	Muito grave

IMC: Índice de Massa Corporal. Fonte: NIH, 2000; Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010.

Outra medida também utilizada para determinação da obesidade é o valor da circunferência abdominal. O índice deve estar abaixo de 88 cm ou 102 cm em mulheres e homens, respectivamente (NIH, 2000). Medidas elevadas do IMC e da circunferência abdominal estão associadas com o risco aumentado de diabetes,

doenças cardíacas, desordens musculares, osteoartrite e alguns tipos de câncer (endometrial, de mama e de colon) (Kopelman, 2000; Chang *et al.*, 2012; Katzmarzyk *et al.*, 2012).

Portanto, uma avaliação combinada do IMC com medida da circunferência abdominal fornece, com maior exatidão, o grau de obesidade e os riscos aos quais os indivíduos estão expostos.

1.1. A obesidade mórbida

Como observado na Tabela 1, existem diferentes graus de obesidade, destacando-se aquela de grau III ou também chamada obesidade mórbida (OBM). Este é o estágio mais preocupante da obesidade, uma vez que os obesos mórbidos são mais propensos a desenvolver morbidades relacionadas à doença (revisado por Kopelman 2000, 2007; NIH, 2000).

O indivíduo é classificado como obeso mórbido ($\text{IMC} \geq 40,00 \text{ kg/m}^2$) quando a educação alimentar, a prática de exercícios físicos regulares e o tratamento farmacológico não são mais suficientes para a perda de peso de forma significativa. Nestas condições, a cirurgia bariátrica é a terapia indicada para pacientes com IMC maior que $35,00 \text{ kg/m}^2$ com a presença comorbidades associadas, tais como hipertensão e diabetes, ou indivíduos com IMC maior que $40,00 \text{ kg/m}^2$, que tentaram sem sucesso a perda de peso com farmacoterapia por dois anos e que apresentam a obesidade grave por, pelo menos, cinco anos (Garrido Junior, 2002; Santo & Cecconello, 2008).

1.2. Parâmetros laboratoriais

Como abordado anteriormente, o principal método utilizado no diagnóstico da OBM é o cálculo do IMC e a medida da circunferência abdominal. No entanto, a dosagem laboratorial de alguns parâmetros sorológicos também se faz relevante, pois estes podem estimar o risco e prognóstico das comorbidades relacionadas à obesidade. O teste mais empregado na rotina clínica é a determinação do perfil

lipídico, o qual pode ser realizado através da dosagem do colesterol total e suas frações, e pela dosagem dos triglicerídeos (Tabela 2) (Misra & Vikram, 2003; Sikaris, 2007). Para tanto, orienta-se ao paciente que seja feito jejum de 12 a 14 horas antes da coleta sanguínea.

Tabela 2: Valores de referência para dosagem de colesterol total e suas frações e triglicerídeos para adultos (maiores de 20 anos de idade).

Dosagem	Valores (mg/dL)	Classificação
Colesterol total	< 200	Ótimo
	200 a 239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
Colesterol LDL	< 100	Ótimo
	100 a 129	Desejável
	130 a 159	Limítrofe
	160 a 189	Alto
	≥ 190	Muito alto
Colesterol HDL	< 40	Baixo
	> 60	Alto (desejável)
Triglicerídeos	< 150	Ótimo
	150 a 200	Limítrofe
	200 a 499	Alto
	≥ 500	Muito alto

LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade.

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 1996.

2. Etiologia da obesidade

Fatores sociais, comportamentais, psicológicos, metabólicos, celulares e moleculares podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade. Por essa razão, o excesso de peso não pode ser atribuído a um único fator causal. De fato, a obesidade é considerada uma doença multifatorial, com origens genéticas e ambientais (Hoh & Ott, 2004). Acredita-se que a doença é, simplificada, o resultado do desequilíbrio entre a quantidade de calorias ingeridas (comportamento

alimentar) e aquelas consumidas pelo metabolismo, particular ao indivíduo (Spiegelman & Flier, 2001; Trayhurn, 2005). Dessa forma, atribui-se à ingestão elevada de alimentos calóricos e pouco nutritivos (característicos da sociedade globalizada) associada ao estilo de vida sedentário como causas principais relacionadas ao excesso de peso (Swinburn *et al.*, 2006).

Existem, basicamente, duas linhas de pesquisa complementares no estudo da etiologia da obesidade. Uma delas apresenta seu foco no metabolismo e balanço energético, abordando aspectos como a resistência à insulina e o comportamento alimentar. A outra linha segue uma perspectiva genética, a fim de identificar genes relacionados com a susceptibilidade à doença.

2.1. Metabolismo e o balanço energético na obesidade

Proposto há quase 60 anos, o modelo de *feedback* negativo para adiposidade parte da premissa de que sinais circulantes informam ao cérebro mudanças na quantidade de massa adiposa e, em resposta, o cérebro realiza ajustes adaptativos para estabilizar o balanço energético e os depósitos de gordura (Kennedy, 1953; Morton *et al.*, 2006). Dentre os nutrientes, citocinas e hormônios que funcionam como sinais circulantes, insulina e leptina merecem destaque pelo seu excelente desempenho como sinais de *feedback* negativo para adiposidade. Estes hormônios, liberados em proporção direta à quantidade de tecido adiposo corporal, agem no SNC a fim de estimular o gasto de energia e inibir a ingestão alimentar (Figura 2) (Schwartz *et al.*, 2000).

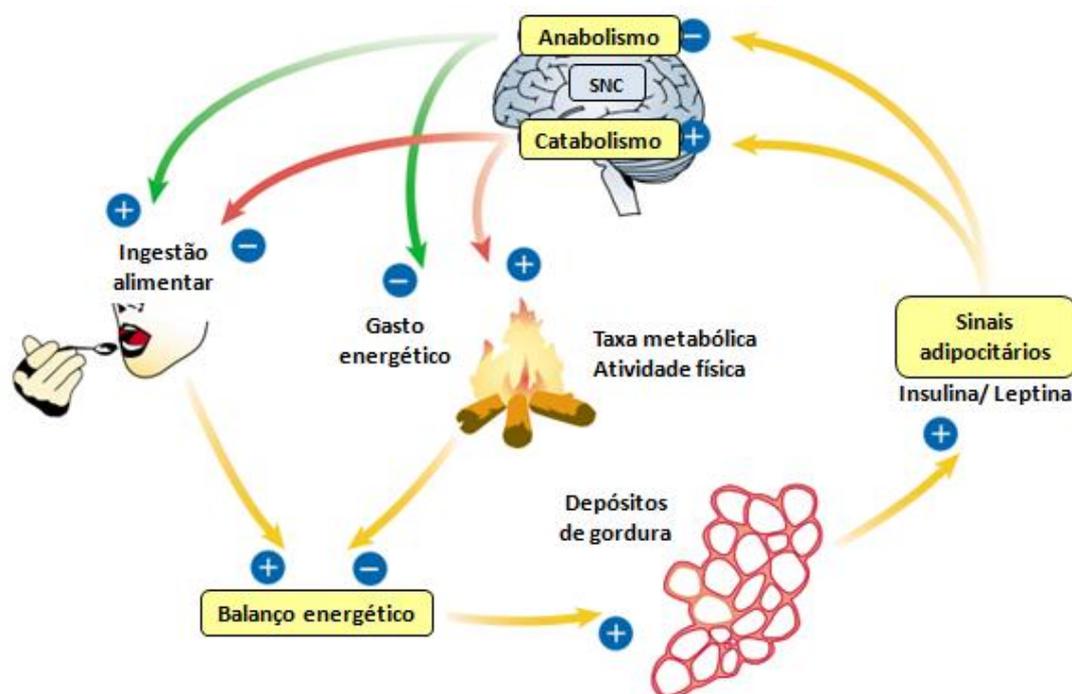


Figura 2: Modelo do balanço energético regulado pelo SNC em resposta a sinais adipocitários. Leptina e insulina são sinais emitidos pelo tecido adiposo em resposta à quantidade de gordura corporal, que agirão no SNC, estimulando vias catabólicas e inibindo vias anabólicas. Estas vias têm efeitos opostos no equilíbrio energético, de forma que o anabolismo estimula a ingestão alimentar e inibe o gasto energético, ao passo que o catabolismo age de maneira contrária. Quando o balanço energético é positivo, isto é, a quantidade de calorias ingeridas é maior que as gastas no metabolismo e atividades físicas, ocorre um acúmulo de gordura, desencadeando todo o processo novamente. Baixas taxas de leptina e insulina na circulação sanguínea apresentam efeitos contrários aos da figura, inibindo-se as vias catabólicas e estimulando as anabólicas. Figura adaptada (Schwartz *et al.*, 2000).

Estudos revelam que roedores com hiperfagia e obesidade grave, frequentemente, apresentam redução na sinalização das vias de insulina e leptina (Bruning *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001). Em casos de OBM, usualmente, não é a deficiência na produção de insulina e leptina que se faz presente, mas sim uma disfunção nos seus respectivos receptores, ocasionando resistência a esses hormônios e consequente desenvolvimento da obesidade (Considine *et al.*, 1996; Kahn *et al.*, 2006; Kopelman, 2000). Estes dados reforçam a importância da sinalização nas vias de *feedback* negativo para adiposidade, uma vez que mutações nestas vias podem resultar no descontrole do comportamento alimentar pelo SNC, culminando na OBM.

2.1.1. O comportamento alimentar no hipotálamo

A regulação do comportamento alimentar pode ser dividida em duas categorias: controles a curto e a longo prazo. O primeiro inclui a sinalização para o início e fim das refeições, enquanto que o segundo envolve a estocagem de energia, agindo em conjunto com o SNC a fim de promover a homeostase energética (Spiegelman & Flier, 2001).

No SNC, os núcleos hipotalâmicos, localizados na região central do diencéfalo, são apontados como a principal região responsável pelo controle do apetite e balanço energético (Williams *et al.*, 2001; Sainsbury *et al.*, 2002). Duas populações de neurônios reguladores do apetite fazem parte desta região: os anorexígenos e os orexígenos (Millington, 2007). Os primeiros — representados pela proopiomelanocortina (POMC) e pelo transcrito relacionado a cocaína e a anfetamina (CART) — promovem a sensação de saciedade, enquanto que, os neurônios orexígenos — como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína agouti-relacionada (AgRP) — atuam estimulando o apetite e favorecendo a ingestão alimentar (Sainsbury *et al.*, 2002; Barsh & Schwartz, 2002; Bell *et al.*, 2005).

Dessa forma, em condições de jejum prolongado, o estômago libera a grelina para estimulação do apetite no hipotálamo, através da ativação de neurônios orexígenos (NPY/ AgRP) (Figura 3) (Nazarato *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2001). Adicionalmente, os reduzidos níveis de leptina e insulina também contribuem para a ativação dos neurônios orexígenos, levando o indivíduo à ingestão alimentar. Paralelamente, neurônios anorexígenos (POMC/ CART) são inibidos, resultando na redução da liberação da melanocortina α -MSH, produto da clivagem do neuropeptídeo POMC, e aumento da ingestão alimentar (Figura 3) (Schwartz *et al.*, 2000; Millington *et al.*, 2007). Com a alimentação, ocorre um aumento nas taxas de insulina e leptina e os níveis de grelina sofrem redução abrupta, indicando o fim da refeição. Conseqüentemente, os neurônios orexígenos são inibidos e os anorexígenos, ativados, promovendo, assim, a diminuição da ingestão alimentar atrelada à sensação de saciedade (Figura 3) (Schwartz *et al.*, 2000; Millington *et al.*, 2007).

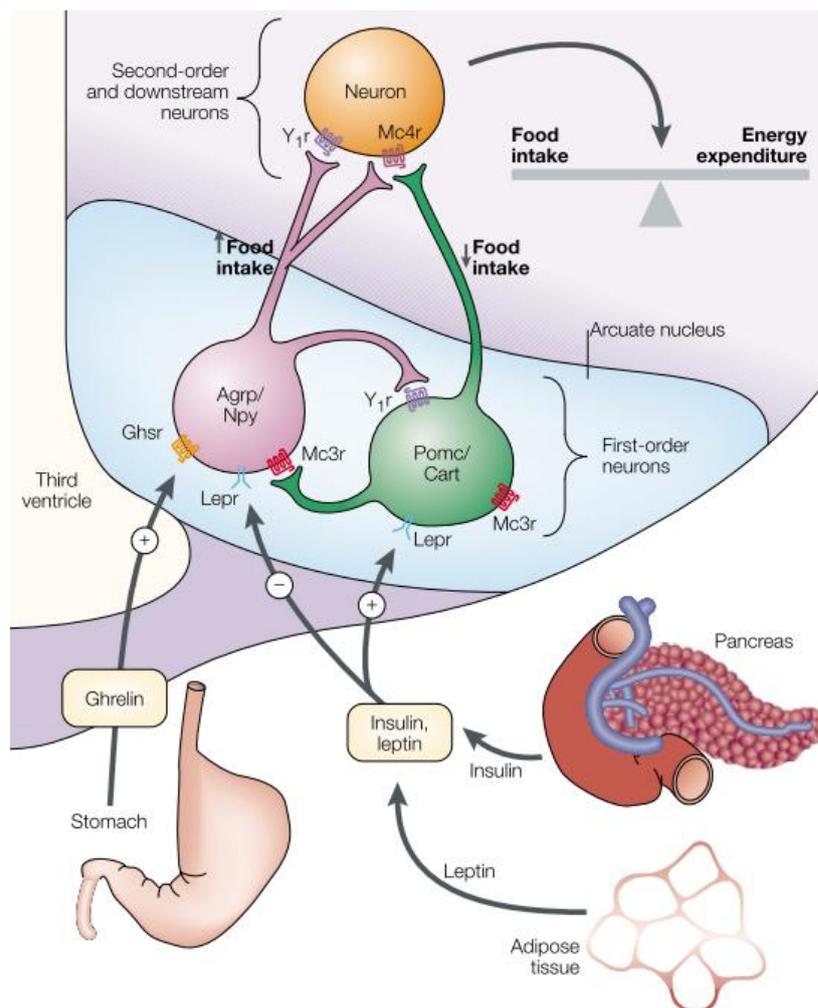


Figura 3: Controle da ingestão alimentar pelo SNC em resposta a sinais periféricos.

Existem dois grupos de neurônios no núcleo arqueado do hipotálamo - AgRP/NPY e POMC/CART - que são regulados por níveis de hormônios circulantes. AgRP/NPY são neuropeptídeos que estimulam a ingestão alimentar e diminuem o gasto energético, enquanto que α -MSH (produto da clivagem pós-transcricional de POMC) e CART inibem o apetite e aumentam o gasto de energia. A insulina e a leptina, hormônios que circulam em proporção direta à massa de tecido adiposo corporal, inibem neurônios AgRP/NPY e estimulam neurônios POMC/CART. Baixos níveis destes hormônios provocam o efeito contrário, culminando no aumento do apetite e redução da saciedade. Outro sinal periférico é a grelina, peptídeo secretado pelo estômago antes das refeições que ativa neurônios AgRP/NPY para aumentar o apetite. AgRP, proteína agouti-relacionada; NPY, neuropeptídeo Y; POMC, proopiomelanocortina; CART, transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina; α -MSH, hormônios estimulador de α -melanócitos; Ghsr, receptor secretagogo do hormônio do crescimento; Lepr, receptor de leptina; Mc3r/Mc4r, receptor das melanocortinas 3 e 4, respectivamente; Y1r, receptor do neuropeptídeo Y1. (Barsh & Schwartz, 2002).

Um balanço energético positivo, isto é, a quantidade de calorias ingeridas é maior que as gastas no metabolismo e atividades físicas, é um importante fator

etiológico para desenvolvimento da obesidade (Pereira-Lancha *et al.*, 2012). A literatura tem retratado que mutações nestas vias podem levar o indivíduo a um quadro de hiperfagia e obesidade severa (Barsh & Schwartz, 2002; Bell *et al.*, 2005), como será abordado a seguir.

2.2. Genética da obesidade

Está bem estabelecido que mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no comportamento alimentar e metabolismo energético levam a desordens mendelianas, cujo fenótipo mais comum é a obesidade (Bell *et al.*, 2005). Evidências apontam para uma forte participação, em torno de 30-50%, do componente genético na variação fenotípica observada nesta doença (Vogler *et al.*, 1995; Bouchard, 1997). Pesquisas com gêmeos monozigóticos criados separadamente, em famílias distintas, chegam a considerar a influência genética em até 70% (Stunkard *et al.*, 1990; Haworth *et al.*, 2008). Estudos com crianças adotadas demonstram, ainda, que existe uma maior correlação com seus pais biológicos que com os pais adotivos (compartilhamento dos mesmos fatores ambientais), reforçando a ideia de que o fator genético apresenta notória participação no desenvolvimento da obesidade (Sorensen *et al.*, 1989). Estudos com histórico familiar evidenciam que o risco de se desenvolver a doença é proporcional à presença de genitores obesos. Isto é, quando nenhum dos pais é obeso este risco é de 9%, ao passo que a presença de um genitor obeso eleva este índice para 50% e pode atingir até 80% quando ambos os genitores estão acima do peso (Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010).

Uma das primeiras evidências relevantes no âmbito da genética da obesidade foi a descoberta da leptina, hormônio protéico produzido predominantemente pelo tecido adiposo branco em relação proporcional direta à massa corporal deste tecido (Zhang *et al.*, 1994). Como visto anteriormente, a leptina estimula a síntese de neuropeptídeos anorexigênicos pelos neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico, de forma a diminuir o apetite e incentivar o gasto energético (Krude *et al.*, 1998; Velloso, 2006).

Estudos genéticos comprovam que mutações nos genes que codificam a leptina (*ob/ob*) e/ou o receptor da leptina (*db/db*) predis põem ao ganho de peso exagerado, tanto em modelos animais como em humanos (Zhang *et al.*, 1994; Farooqi *et al.*, 1998). O primeiro relato, em humanos, da mutação *ob/ob* no gene da leptina data de 1998, quando o grupo do pesquisador O'Rahilly identificou dois primos de origem paquistanesa com genótipo homocigoto para esta mutação. As crianças apresentaram peso normal ao nascimento, porém, ainda na primeira infância, desenvolveram um quadro de obesidade precoce relacionada à hiperfagia severa (Farooqi *et al.*, 1998). Não obstante, são raros os casos de deficiência da leptina por mutação no gene *ob* na espécie humana (Carlsson *et al.*, 1997). Na verdade, é comum que indivíduos obesos tenham níveis séricos de leptina superiores àqueles não obesos, o que implica em uma redução na sensibilidade a este hormônio, resultando em um quadro de resistência à leptina (Considine *et al.*, 1996).

Apesar da relevância da leptina, a forma mais frequente de obesidade monogênica deve-se à mutação no gene que codifica o receptor de melanocortina 4 (MC4R). A deficiência no MC4R responde por cerca de 4 a 6% dos indivíduos obesos de diferentes grupos étnicos, com maior prevalência nos casos de maior gravidade e de início precoce (Coll *et al.*, 2004). Experimentos revelam que camundongos com MC4R deficiente não são hiperfágicos quando alimentados com uma dieta com baixo teor de gordura, entretanto, desenvolvem a hiperfagia ao terem contato com uma dieta hipercalórica, o que sugere uma considerável interação gene-ambiente (Butler & Cone, 2003). Tal efeito poderia contribuir para explicar o rápido crescimento no número de indivíduos obesos consumidores de dietas hipercalóricas que surgiram nos últimos vinte anos (Bell *et al.*, 2005).

Estudos de associação genômica (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) têm identificado outros genes relacionados com a obesidade, entre eles *FTO*, *MC4R*, *GNPDA2*, *BDNF*, *NEGR1*, *SH2B1*, *ETV5*, *MTCH2* e *KCTD15* (revisado por Speliotes *et al.*, 2010). Muitos destes genes são expressos ou agem no SNC, reforçando o componente neuronal na predisposição à obesidade. Além destes, Speliotes *et al.* (2010) identificaram mais 18 *loci* envolvidos na doença, em uma população de 249.796 indivíduos europeus.

Por apresentar uma herança poligênica e multifatorial, é possível que outros genes ainda não identificados também possam contribuir significativamente para o desenvolvimento da obesidade. Portanto, a identificação destes genes é de grande importância para compreensão e melhora da prevenção da obesidade, especialmente a mórbida.

3. Os genes candidatos

3.1. *Forkhead box O 3a (FOXO3a)*

Um fator de transcrição tem como função ligar-se ao DNA em regiões específicas para que seja ativada ou reprimida a expressão de genes alvo. A família de fatores de transcrição *Forkhead box (FOX)* é caracterizada por um conservado domínio *forkhead* ou uma “asa de hélice” de ligação ao DNA, o que resulta em uma aparência de borboleta quando submetido a técnicas de cristalografia de raio-X ou ressonância magnética nuclear (Maiese *et al.*, 2007).

Mais de 100 genes *forkhead* e 19 subgrupos foram identificados desde a descoberta inicial destes genes em *Drosophila melanogaster* (Weigel *et al.*, 1989). A subfamília *Forkhead box O (FOXO)* destaca-se das outras devido à inserção de 5 aminoácidos no domínio *forkhead* (FH) de ligação ao DNA (Arden & Biggs, 2002). A literatura científica tem mostrado que a via metabólica envolvendo as proteínas FoxO são conservadas em vários organismos incluindo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e mamíferos, o que sugere um importante papel dessas proteínas na regulação das funções celulares (Maiese *et al.*, 2008).

Em mamíferos, quatro membros foram identificados, a saber, *FOXO1*, *FOXO3a*, *FOXO4* e, mais recentemente, *FOXO6* (Jacobs *et al.*, 2003).

O gene *FOXO3a*, localizado na região cromossômica 6q21, está relacionado com a modulação transcricional de genes alvos envolvidos na apoptose, metabolismo, proliferação celular, estresse oxidativo e reparo do DNA (Figura 4) (Yang & Hung, 2011). Sua proteína correspondente apresenta 71 kDa e está expressa principalmente no miocárdio e no cérebro, destacando-se, neste último, o cerebelo, córtex e o hipocampo (Maiese *et al.*, 2008).

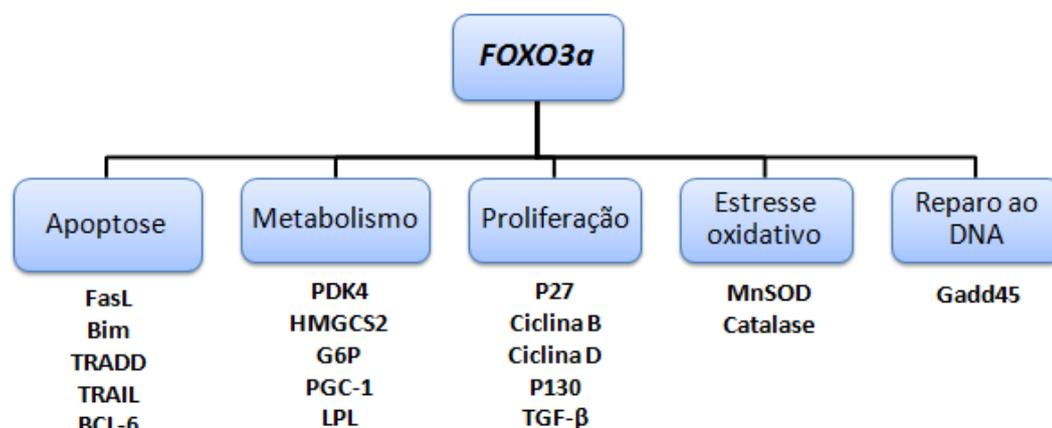


Figura 4: Regulação transcricional pelo fator de transcrição *FOXO3a*. *FOXO3a* modula a atividade transcricional de genes alvo relacionados ao reparo do DNA, proliferação, estresse oxidativo, metabolismo e apoptose. Figura adaptada (Yang & Hung, 2011).

As primeiras evidências da regulação de *FOXO3a* são originárias de pesquisas realizadas com DAF-16, um análogo de *FOXO* no nematódeo *C. elegans*. Foi demonstrado que a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt suprime a função de DAF-16. A ativação de PI3K/Akt promove a fosforilação de *FOXO3a*, resultando na perda de afinidade de *FOXO3a* ao DNA e na sua ligação com a proteína chaperona 14-3-3 (Brunet *et al.*, 1999). Esta, por sua vez, possui uma sequência de exportação nuclear que faz com que o complexo *FOXO3a*/14-3-3 seja realocado para o citoplasma, tornando *FOXO3a* inativo (Birkenkamp & Coffey, 2003). Além da via PI3K/Akt, *FOXO3a* também pode ter sua atividade modulada a partir de sinais externos como níveis de insulina e estresse oxidativo (Figura 5) (Moll & Schubert, 2012; Eijkelenboom & Burgering, 2013), os quais, frequentemente, encontram-se alterados na obesidade mórbida.

Assim é que a ativação da cascata de sinalização da via do receptor de insulina (IR) resulta na fosforilação de *FOXO3a*, e na sua consequente exclusão nuclear (Qin *et al.*, 2008). Experimentos em cultura de células, com superexpressão do IR, revelaram um aumento significativo na fosforilação de Akt e considerável redução nos níveis de RNA mensageiro de *FOXO3a* (Zemva *et al.*, 2012; Moll & Schubert, 2012). No entanto, como abordado anteriormente, obesos mórbidos, comumente, apresentam resistência à insulina (Kahn *et al.*, 2006). Nestes termos, a

sinalização na via do IR encontrar-se-á diminuída, promovendo, assim, um aumento nos níveis de *FOXO3a* ativo.

FOXO3a está envolvido também na resposta ao estresse oxidativo, induzindo a expressão de enzimas antioxidantes (Kops *et al.*, 2002). Condições de estresse oxidativo ocorrem quando há uma defasagem na detoxificação por enzimas antioxidantes ou quando as células são expostas a espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (Droge & Kinscherf, 2008). Cabe ressaltar que a ativação da via da insulina bem como a fome contribuem para o aumento do estresse oxidativo (Goldstein *et al.* 2005; Dandona *et al.*, 2005). Dessa forma, os elevados níveis de ROS facilitam a localização de *FOXO3a* no núcleo por meio da desfosforilação e desacetilação deste fator de transcrição através de vias da quinase c-Jun-N-terminal (JNK) e da sirtuína (SIRT) (Figura 5) (Huang & Tindall, 2007; Wang *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2010). Uma vez no núcleo, *FOXO3a* promove a expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes como a manganês superóxido dismutase (MnSOD) e catalase (Kops *et al.*, 2002; Nemoto & Finkel, 2002). Portanto, pode-se sugerir que *FOXO3a* ativo constitui um importante fator para a detoxificação de ROS na OBM.

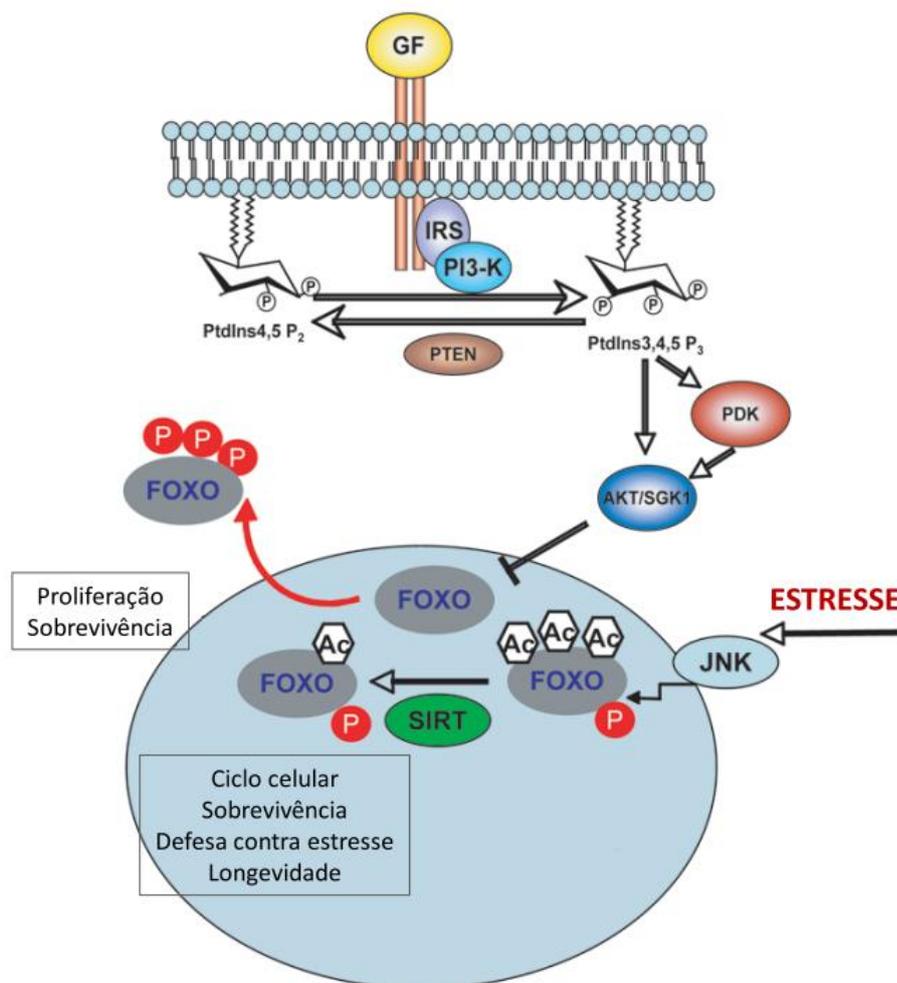


Figura 5: Regulação de FOXO pela via da insulina e em condições de estresse. A ligação da insulina ao seu receptor promove a ativação da via PI3K/ Akt. Uma vez ativada, Akt fosforila FOXO, que será translocado para o citoplasma, ficando, portanto, inativo. Em condições de estresse oxidativo, a via JNK desfosforila FOXO, que retorna ao núcleo, onde poderá exercer sua atividade transcricional. As sirtuínas (SIRT) também contribuem para ativação de FOXO através da desacetilação do mesmo. Dessa forma, genes envolvidos no ciclo celular, sobrevivência, resistência ao estresse oxidativo e longevidade podem ser transcritos. Figura adaptada (Brosens *et al.*, 2009).

Alterações na sinalização de FOXO podem contribuir para a susceptibilidade à OBM, uma vez que sua regulação permeia sinais envolvidos no metabolismo de glicose e lipídios e no comportamento alimentar (Puigserver *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2007; Calnan & Brunet, 2008). Embora estudos apontem FOXO1 como proteína controladora do metabolismo energético, especula-se a possibilidade de FOXO3a também estar envolvida com o controle da ingestão alimentar. No entanto, ainda não existem dados que comprovem esta relação.

Há apenas um estudo genético em humanos relacionando obesidade com *FOXO3a*. Kim e colaboradores (2006) realizaram o sequenciamento dos éxons de *FOXO1*, *FOXO3a* e *FOXO4* na população coreana, e observaram que um polimorfismo em *FOXO3a* (343–1582, C>T) demonstrou associação entre genótipo e IMC. Indivíduos com genótipo *TT* apresentaram menor IMC, enquanto que aqueles com perfil *CC* obtiveram correlação com IMC mais elevado, correspondente ao sobrepeso (Kim *et al.*, 2006). Além disso, outras pesquisas identificaram regiões cromossômicas próximas à 6q21, onde *FOXO3a* está localizado, como um dos alvos potenciais na genética da obesidade (Meyre *et al.*, 2004; Rankinen *et al.*, 2006).

3.2. Proteína quinase ativada por AMP (AMPK)

A proteína quinase ativada por AMP é um dos maiores sensores metabólicos presentes em uma diversidade de organismos, desde bactérias até mamíferos (Minokoshi, 2011). Esta proteína é constituída por três subunidades: alfa catalítica, beta, com domínio de ligação ao glicogênio, e gama regulatória. Em mamíferos, essas três subunidades possuem diferentes isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$), codificadas por genes distintos e todas as possíveis combinações dos heterotrímeros formam a proteína ativa (Hardie *et al.*, 2012).

A ativação da AMPK ocorre, principalmente, pelo estímulo do aumento na razão AMP/ATP nas células, de forma que o excesso de AMP faz com que sejam acopladas duas das suas moléculas na subunidade gama, com posterior fosforilação da subunidade alfa, resultando na molécula de AMPK ativada (Ahn *et al.*, 2012). AMPK pode ser ativada ainda por inibidores mitocondriais, exercícios físicos, sinais adipocitários (adiponectina), grelina, canabinóides e indiretamente por mudanças na concentração intracelular de íons cálcio (Stahmann *et al.*, 2006; Tamás *et al.*, 2006; Thornton *et al.*, 2008).

Inicialmente, a primeira evidência que demonstrou a ativação de AMPK devido ao estresse metabólico foi publicada em 1991, quando o grupo do pesquisador Hardie comprovou que AMPK torna-se ativa frente à depleção de ATP (Moore *et al.*, 1991). Desde então, esta proteína tem sido considerada um sistema de proteção celular diante do comprometimento do estado energético (Hardie, 2004).

Em situações de exercícios físicos, por exemplo, exige-se uma maior demanda de energia da célula. Portanto, para aumentar o fornecimento de ATP para o músculo, a AMPK torna-se ativa, promovendo uma melhora na sensibilidade à insulina, aumento da captação de glicose e da biogênese mitocondrial (Figura 6) (Hardie, 2004).

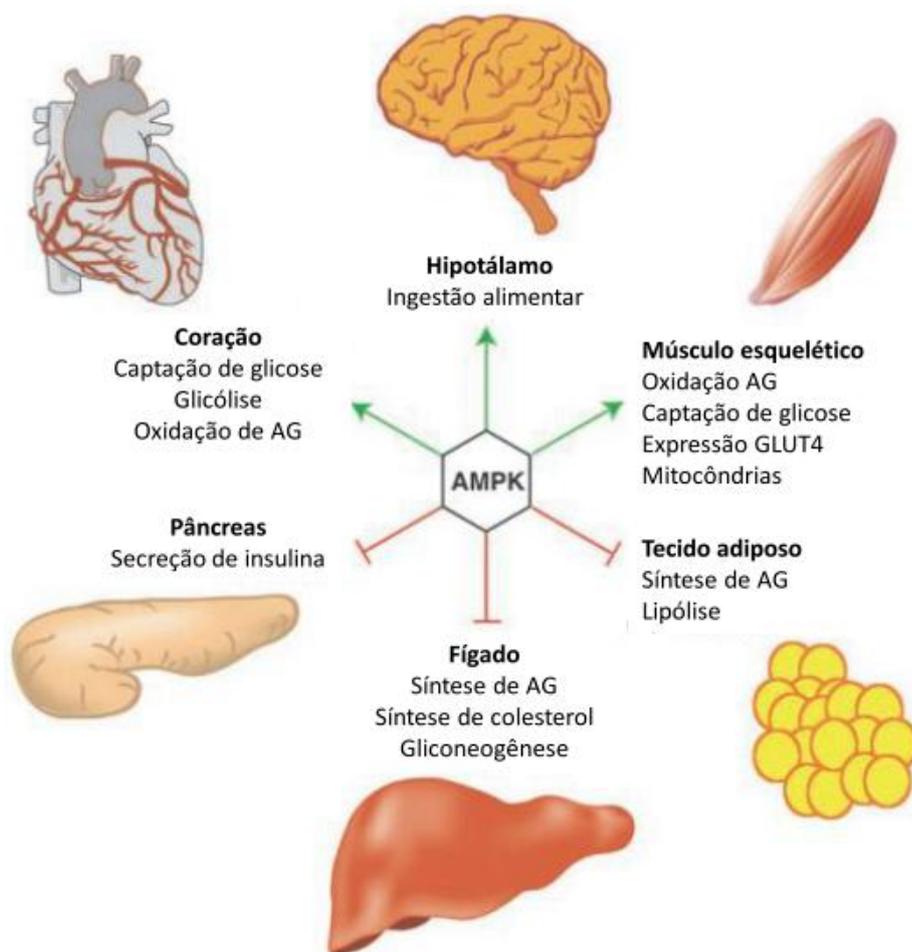


Figura 6: Principais ações da proteína AMPK. No coração promove um aumento na captação de glicose, glicólise e oxidação de ácidos graxos (AG). No hipotálamo, estimula a ingestão alimentar. No músculo esquelético propicia o aumento na oxidação de ácidos graxos, na captação de glicose, na expressão do receptor de glicose GLUT4, e na biogênese mitocondrial. Dentre os efeitos inibitórios encontram-se a inibição da síntese de ácidos graxos e da lipólise pelo tecido adiposo. No fígado inibe a síntese de ácidos graxos, de colesterol e a gliconeogênese. Por fim, no pâncreas ocorre a inibição da secreção de insulina. Figura adaptada (Hardie, 2004).

Como visto na figura acima, no hipotálamo, AMPK participa do aumento da ingestão alimentar. Experimentos em roedores mostraram que hormônios que promovem a saciedade, como a leptina, inibem a isoforma AMPK α 2, enquanto que

aqueles que aumentam o apetite, por exemplo a grelina, ativam AMPK em alguma isoforma ainda não determinada (Andersson *et al.*, 2004; Minokoshi *et al.*, 2004). Em condições de fome, o estômago libera grelina que aumenta a concentração de cálcio intracelular no hipotálamo, ativando a AMPK. Posteriormente, ocorre a ativação de neurônios NPY/ AgRP e bloqueio de neurônios POMC, promovendo a elevação do apetite (Figura 7a). Após a refeição, ocorre queda abrupta nos níveis de grelina, concomitantemente ao aumento da secreção da leptina pelo tecido adiposo, gerando a sensação de saciedade. Dessa maneira, neurônios POMC são ativados e a AMPK inibida, com conseqüente redução do apetite e da ingestão alimentar (Figura 7b) (Hardie *et al.*, 2012).

Estudos recentes indicam que a ativação farmacológica de AMPK por AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosida) ou pela expressão constitutiva de adenovírus AMPK ativo promove um aumento da ingestão alimentar e do peso corporal (Ramamurthy & Ronnett, 2012). Além disso, experimentos com camundongos *knockout* para a subunidade β 1 revelaram uma redução do apetite, da adiposidade e do peso corporal, mesmo quando estes animais alimentavam-se com uma dieta hipercalórica (Dzamko *et al.*, 2010).

Portanto, AMPK estaria envolvida em mecanismos orexigênicos, relacionados ao aumento da ingestão alimentar (Andersson *et al.*, 2004) e um desbalanço positivo nesta via poderia contribuir para o ganho exagerado de peso.

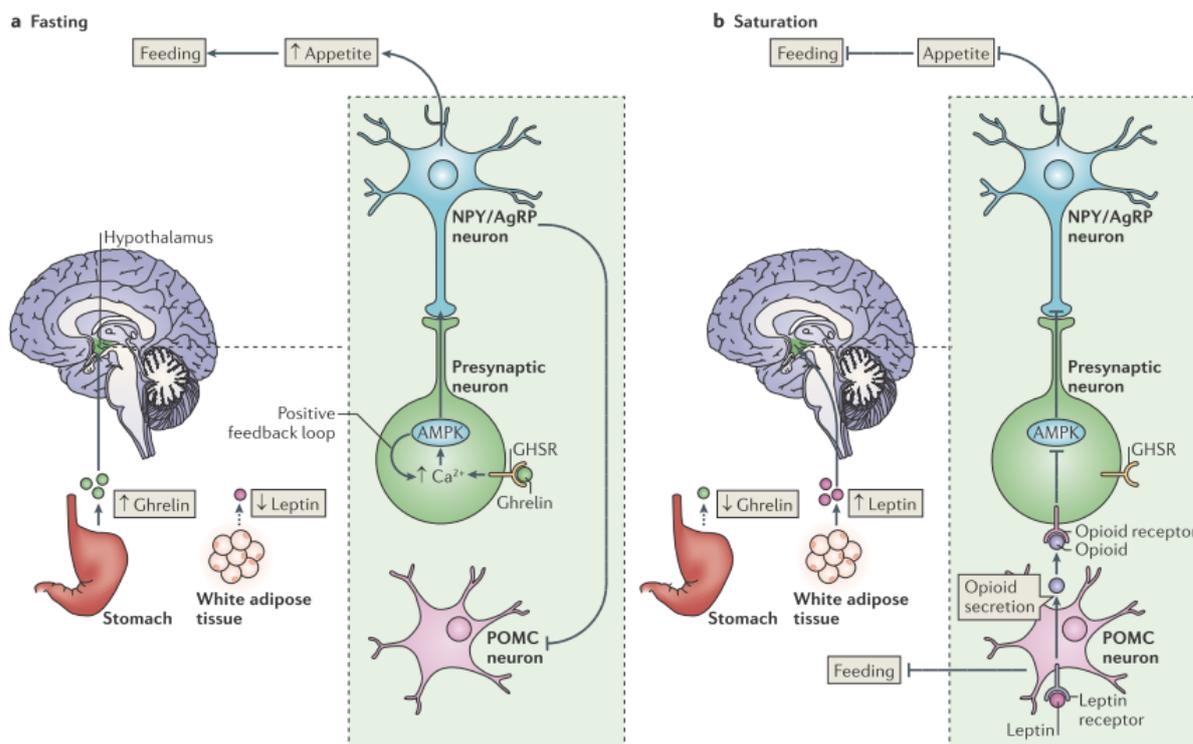


Figura 7: Modulação de AMPK frente a situações de fome e de saciedade. Em condições de jejum, ocorre a liberação da grelina pelo estômago, com consequente ativação de AMPK no hipotálamo através do aumento nas concentrações de Ca^{2+} intracelular. Posteriormente, ocorre a ativação de neurônios NPY/ AgRP e bloqueio de neurônios POMC, promovendo a elevação do apetite (Figura 7a). Com a refeição, há queda abrupta nas taxas de grelina e aumento na secreção da leptina pelo tecido adiposo para gerar a saciedade. Assim, neurônios POMC são ativados, com consequente secreção de moléculas opióides e posterior inibição de AMPK por esta via. Dessa forma, sucede-se o bloqueio de neurônios NPY/ AgRP, com redução do apetite e da ingestão alimentar (Figura 7b) (Hardie *et al.*, 2012).

Além do seu efeito hipotalâmico, a ativação da AMPK relaciona-se ainda com crescimento celular, autofagia, e na modulação transcricional de uma série de genes, com destaque, nesta última categoria, para um dos genes alvo deste estudo, *FOXO3a* (Figura 8) (Hardie, 2004; Chiacchiera & Simone, 2010; Mihaylova & Shaw, 2011). Em pesquisa realizada por Greer e colaboradores (2007) foi demonstrado que, em resposta à restrição calórica, AMPK participa diretamente da fosforilação de *FOXO3a* e a mesma não resulta na realocação de *FOXO3a* para o citoplasma. O trabalho sugeriu ainda que este mecanismo de fosforilação seja de forma gene específica, uma vez que AMPK não afeta os outros membros da família *FOXO* da mesma maneira (Greer *et al.*, 2007). Esses dados corroboram com estudo realizado por Nakashima & Yakabe (2007), o qual constatou que ao utilizar-se um agonista de

AMPK (AICAR) em cultura celular, foi observado um aumento nos níveis de RNAm para *FOXO3a* (Nakashima & Yakabe, 2007).

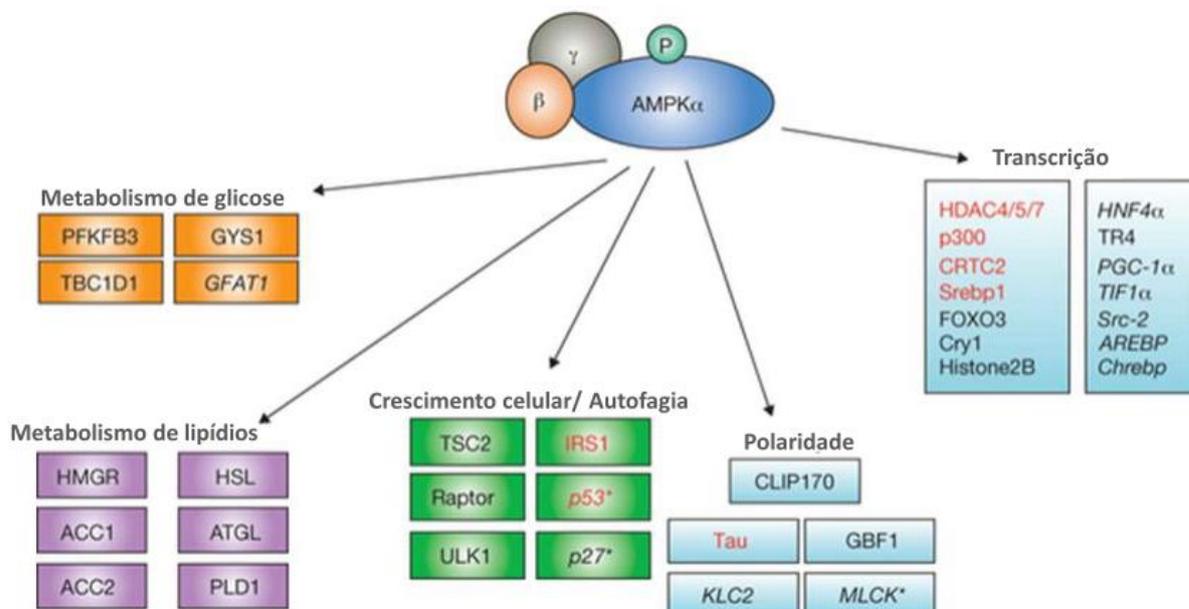


Figura 8: Substratos fosforilados a partir da ativação da AMPK. Dentre os substratos fosforilados pela AMPK estão aqueles relacionados ao metabolismo de glicose e lipídios, crescimento celular e autofagia, polaridade celular, além de reguladores transcricionais. Substratos em vermelho são também alvos de outros membros da família da AMPK (SIK1, SIK2, MARKs, SADs) Figura adaptada (Mihaylova & Shaw, 2011).

3.3. Proopiomelanocortina (POMC)

O gene *POMC*, localizado na região cromossômica 2p23, é constituído por quatro éxons intercalados por íntrons (Zabel *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 2012). Este gene codifica um hormônio polipeptídico precursor com 241 aminoácidos que sofre extensas mudanças pós-transcricionais e tecido-específicas. A depender do processo de clivagem, o processamento pode render vários peptídeos diferentes (Figura 9) com funções biológicas distintas, entre eles as β -endorfinas, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e os hormônios estimuladores de melanócito (MSH) (Millington, 2007; Yeo & Heisler, 2012).

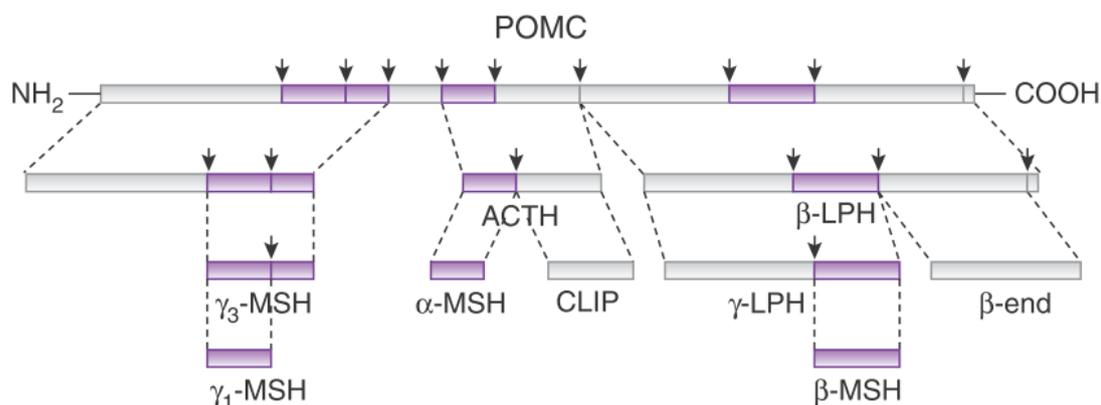


Figura 9: Estrutura do gene e processamento pós-transcricional de POMC. POMC pode originar diversos peptídeos diferentes, com funções biológicas distintas, a depender do processo de clivagem. POMC, proopiomelanocortina; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; LPH, lipotrofina; MSH, hormônio estimulante de melanócito; CLIP, peptídeo intermediário semelhante a corticotrofina; β-end, β-endorfina (Yeo & Heisler, 2012).

POMC é expresso na pele, no sistema imunológico e no SNC, com destaque, neste último, para o hipotálamo (Yeo *et al.*, 2000). Nesta região cerebral, a proteína POMC pode ser regulada por diversos estímulos — incluindo hormônios esteroides, neurotransmissores e neuropeptídeos — para desempenhar importante função coordenando o controle da ingestão alimentar (Wardlaw, 2001; Zeltser *et al.*, 2012). Assim é que, em jejum, neurônios POMC são inibidos a partir de estímulos GABAérgicos e neuropeptídeos orexigênicos (AgRP e NPY), por exemplo (Figura 10). Paralelamente, como já explicitado anteriormente, neurônios orexígenos são ativados pela AMPK para que haja o aumento do apetite e da ingestão alimentar. Em contraste, frente à saciedade, neurônios POMC são ativados pela leptina e liberam o neuropeptídeo β-endorfina (produto da clivagem de POMC). Este, por sua vez, inibe AMPK, interrompendo, portanto, o estímulo ao apetite (Figura 10) (Zeltser *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos sugerem que, em condições de restrição alimentar, os níveis de RNA mensageiro de *POMC* no hipotálamo estão reduzidos, enquanto que em ratos superalimentados, estes níveis encontram-se elevados (Mizuno *et al.*, 1998; Hagan *et al.*, 1999; Millington *et al.*, 2007).

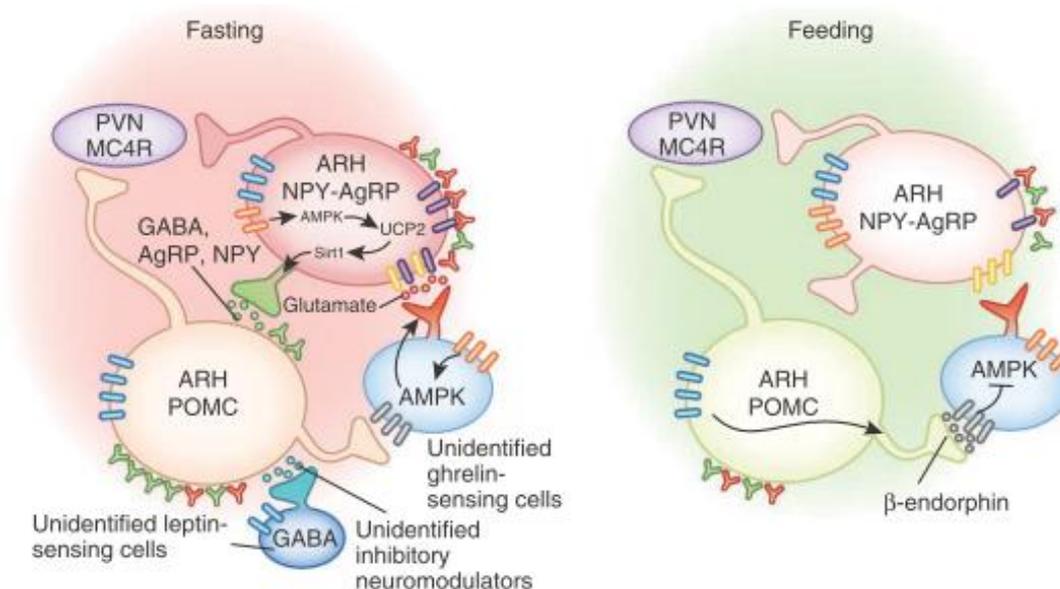


Figura 10: Ação de POMC no controle da ingestão alimentar. Em situações de jejum (à esquerda), neurônios POMC são inibidos por estímulos GABAérgicos, e por neuropeptídeos orexigênicos (AgRP e NPY). Por sua vez, AMPK é ativada pela grelina (receptor de grelina em laranja na figura), resultando na ativação de neurônios orexígenos NPY/ AgRP no núcleo arqueado do hipotálamo (ARH) e, conseqüentemente, no aumento do apetite e da ingestão alimentar. Em contraste, em situações de saciedade (à direita), neurônios POMC, ativados pela leptina (receptor de leptina em azul na figura), liberam o neuropeptídeo β-endorfina (produto da clivagem de POMC), que inibe AMPK, cessando, desta forma, o estímulo ao apetite. Figura adaptada (Zeltser *et al.*, 2012).

Estudos de associação genética têm identificado a região cromossômica 2p23 relacionada com ingestão de nutrientes (Cai *et al.*, 2004), tecido adiposo (Comuzzie *et al.*, 1997) e obesidade (Hager *et al.*, 1998). Em humanos, a perda completa de POMC provoca desenvolvimento da obesidade ainda nos primeiros meses de vida, com constante agravamento da doença devido à hiperfagia intensa (Krude *et al.*, 1998), corroborando com experimentos realizados em camundongos *POMC* inativo, que revelaram um acelerado desenvolvimento da obesidade no modelo animal (Smart *et al.*, 2006). Em contraste, modelos genéticos com superexpressão de *POMC* têm demonstrado uma proteção contra a obesidade, mesmo quando os camundongos são submetidos a uma dieta hipercalórica (Mizuno *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007). Outros trabalhos relacionam ainda o gene da *POMC* com IMC, peso corporal, circunferência abdominal e gorduras visceral e total (Chen *et al.*, 2005; Sutton *et al.*, 2005).

Não apenas *POMC*, mas também seus produtos apresentam papel importante no comportamento alimentar e balanço energético. Por exemplo, a deficiência na produção de α -MSH, como já abordado, é um dos principais contribuintes para a obesidade com suporte na herança genética (Coll *et al.*, 2004). Em adição, as secreções de ACTH e β -LPH encontram-se aumentadas em pacientes obesos (Weaver *et al.*, 1993).

Portanto, dado o exposto acima e considerando-se a heterogeneidade da herança genética da obesidade, a investigação de polimorfismos nos genes *FOXO3a*, *AMPK* e *POMC* em indivíduos obesos mórbidos torna-se relevante, uma vez que este é o grau mais elevado da obesidade (grau III) e, portanto, deve existir uma forte influência genética, além do fator ambiental, para desenvolvimento desta doença.

Objetivos

1. Objetivo geral:

Identificar associações entre polimorfismos nos genes *FOXO3a*, *AMPK* e *POMC* que possam modular a susceptibilidade para o desenvolvimento da obesidade mórbida.

2. Objetivos específicos:

Caracterizar a amostra selecionada quanto aos dados clínico-laboratoriais.

Caracterizar a amostra selecionada para as variantes genéticas de *FOXO3a*, *AMPK* e *POMC*.

Avaliar a existência da relação entre os *tagSNPs* associados com a OBM e as variações dos parâmetros clínico laboratoriais alterados neste grupo.

Avaliar se há efeito sinérgico entre os *tagSNPs* selecionados dos genes *FOXO3a*, *AMPK* e *POMC* na obesidade mórbida.

Materiais e métodos

1. Recrutamento dos indivíduos e parâmetros laboratoriais

251 pacientes diagnosticados com obesidade mórbida ($\text{IMC} \geq 40,00 \text{ kg/m}^2$ ou $\text{IMC} \geq 35,00 \text{ kg/m}^2$ associado a comorbidades, como hipertensão e diabetes), que tentaram sem sucesso a perda de peso e se tornaram candidatos à cirurgia bariátrica de acordo com os critérios do Instituto Nacional de Saúde (NIH, *National Institute of Health*), foram recrutados no Hospital Felício Rocho e na Santa Casa de Misericórdia, localizados em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O grupo controle consistiu de 212 voluntários saudáveis recrutados em Pernambuco, sem histórico de hipertensão, diabetes ou doenças cardiovasculares e com $\text{IMC} < 25,00 \text{ kg/m}^2$.

Os parâmetros laboratoriais (glicemia, dosagem de triglicerídeos, HDL e LDL) foram mensurados do plasma coletado dos indivíduos após 12 horas de jejum de acordo com os protocolos padronizados pela Doles[®].

Todos os integrantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2. Coleta e obtenção do DNA

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo contendo o anticoagulante EDTA de onde extraiu-se o DNA genômico através do método salino de Lahiri e Numberger (1991), modificado por Cavalli *et al* (1996) e Salazar *et al* (1998), como segue:

- Homogeneizou-se delicadamente a amostra no tubo contendo EDTA para, em seguida, transferir o sangue colhido para um tubo falcon de 50 mL;
- Adicionou-se a solução tampão TKM1 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 2 mM EDTA) para lavagem do sangue, retirando o excesso de plasma e de hemácias da amostra. O volume de TKM1 adicionado é correspondente ao volume de sangue coletado;
- 500 μL do reagente Triton X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) foram adicionados para lise celular dos leucócitos. O conteúdo foi agitado vigorosamente e

centrifugado por 15 min a 4 °C (2600 rpm). Desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* (parte sedimentada na centrifugação contendo o DNA) foi mantido;

- O *pellet* foi lavado novamente com TKM1 para retirada do Triton X-100. O conteúdo foi agitado vigorosamente e centrifugado por 10 min a 4°C (1600 rpm). Desprezou-se o sobrenadante;
- Ressuspendeu-se o *pellet* em 1600 µL de solução tampão de TKM2 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,4 M NaCl; 20 mM EDTA) e 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% para reafirmar a lise dos leucócitos;
- O conteúdo foi agitado vigorosamente com o auxílio de um vórtex, para fragmentação do *pellet*;
- Incubou-se o tubo falcon em banho maria a 55 °C durante 10 a 20 min;
- Depois, 900 µL de cloreto de sódio 6 M foram adicionados para precipitação das proteínas;
- Centrifugou-se o tubo falcon por 15 min a 4 °C (15000 rpm);
- O sobrenadante foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, contendo 5 mL de etanol absoluto para precipitação do DNA;
- O DNA foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta Pasteur e mergulhado em outro tubo falcon de 15 mL, contendo 300 µL de etanol 70%. O tubo foi deixado aberto para secagem do etanol;
- O DNA foi ressuspendido em 500 µL de tampão Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 a 8,0) e acondicionado a 4°C, devidamente identificado.

A quantificação do DNA foi realizada no aparelho de espectrofotômetro e, posteriormente, sua concentração foi ajustada para 50 ng/µL.

3. Seleção dos polimorfismos

Os polimorfismos de base única representativos (*tagSNPs*) para os genes *FOXO3A*, *AMPK* e *POMC* foram selecionados no banco de dados do HapMap

(www.hapmap.org), com uma frequência mínima de 0,25 na população caucasiana europeia (CEU) (Tabela 3).

Tabela 3: Polimorfismos selecionados, localização cromossômica, gênica e mutação correspondente.

<i>tagSNP</i>	Localização cromossômica	Localização gênica	Alteração
FOXO3A			
<i>rs1536057</i>	chr.6 108992316	Intron 1	G>A
<i>rs2802292</i>	chr.6 109015211	Intron 1	G>T
<i>rs3813498</i>	chr.6 109050858	Intron 1	T>C
<i>rs1935952</i>	chr.6 109105598	Intron 2	C>G
AMPK			
<i>rs1442760</i>	chr.1 145095031	UTR ^a	C>T
<i>rs1036851</i>	chr.1 145100374	Intron	T>C
<i>rs1348316</i>	chr.1 145110179	Intron	G>A
<i>rs11584787</i>	chr.1 145095103	UTR ^a	C>G
POMC			
<i>rs934778</i>	chr.2 25242728	Intron	T>C
<i>rs6545975</i>	chr.2 25238989	Intron	T>C

^aUTR: região não traduzida (*untranslated region*)

Como visto na Tabela 3 acima, os *tagSNPs* selecionados encontram-se em regiões intrônicas, à exceção de dois marcadores para *AMPK* (*rs1442760*, *rs11584787*) que estão localizados em regiões não traduzidas (UTRs).

4. Genotipagem pela PCR em tempo real

A genotipagem foi realizada a partir de 50 ng de DNA através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real, pelo método *TaqMan® Genotyping*. Esta técnica baseia-se na replicação do fragmento de DNA de interesse, a partir da utilização de sondas (*probes*) específicas (Tabela 4), que consistem em oligonucleotídeos ligados a um fluoróforo. Desta forma, após a hibridização das

sondas à fita de DNA complementar, a DNA polimerase realiza a extensão do fragmento e, ao clivar a probe, faz com que o fluoróforo seja liberado, permitindo a detecção da fluorescência pelo equipamento (Figura 11). Uma vez que cada sonda apresenta uma fluorescência alelo específica, o aparelho pode realizar a discriminação alélica a partir da fluorescência liberada durante a reação.

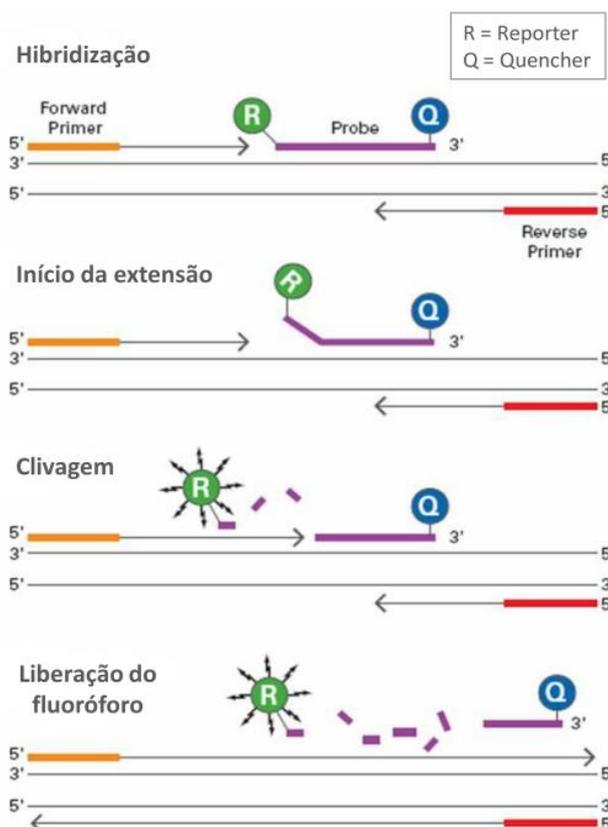


Figura 11: Esquema ilustrativo do mecanismo da PCR em tempo real. Inicialmente ocorre o pareamento da probe com a fita de DNA. Esta probe contém um fluoróforo R (R, repórter) que tem sua fluorescência captada pelo quencher (Q) quando próximos. Após a hibridização, a DNA polimerase realiza a extensão do fragmento e, ao clivar a probe, faz com que o fluoróforo seja liberado, permitindo a detecção da fluorescência pelo equipamento.

Tabela 4: Sondas selecionadas para o estudo.

<i>tagSNP</i> (Código Applied)	Sequência e alelo ancestral
FOXO3A	
<i>rs1536057</i> (C__8701842_10)	GTCATGATTAGTCATTTTGAAGCA[C/T]GCATGTGCATTTAAACCACACTACT Alelo ancestral: G
<i>rs2802292</i> (C__16097219_10)	TGCTCACAAGAGCTCAGGGCTGGGA[G/T]AAGCCTCTGTGTGACAGATGAAGGG Alelo ancestral: G

<i>rs3813498</i> (C___431204_10)	AAAAAAAAAAAAAAGCTGGAAGAGTT[C/T]CCCTTCCTGAGCTTCAGTGGAAGCA Alelo ancestral: T
<i>rs1935952</i> (C__11957503_10)	TGGTTTATTAAGTGTTATTGTGAGG[C/G]GAAAAACCAAATCCTCTTCCAGAG Alelo ancestral: C
AMPK	
<i>rs1442760</i> (C___8719003_10)	AGATGGTTATACACTGCTAATTCTG[T/C]ACAGTGAGATCCAAGGACACCACCA Alelo ancestral: C
<i>rs1036851</i> (C___8719006_10)	AGTTCTTTTGTACACCCCAATGA[T/C]AACTACTCCTTTATGTTGTGCTCAA Alelo ancestral: T
<i>rs1348316</i> (C___8719009_30)	TGCAGTACTGACACCAACTGCGGGC[G/A]TGGGACGCTTACCTTGGAGTCAGGG Alelo ancestral: G
<i>rs11584787</i> (C___1745072_10)	TTTTTAAAAGAGATCATTTCAGTT[G/C]TAAGTTACTCAACCCTTTATTCTAT Alelo ancestral: C
POMC	
<i>rs934778</i> (C___8722915_10)	CAGGCTGTTCCCATTGTACCCTGCC[A/G]GTGATCTATTCAAGTACACAGCCAG Alelo ancestral: T
<i>rs6545975</i> (C__32192453_10)	TTTTTAAACATATTTTAAATAATGC[C/T]TCAACCTGTGTGAACCTGGGAGGTG Alelo ancestral: T

Polimorfismo entre colchetes em negrito na sequência.

A reação de PCR foi preparada em placas para 96 reações. Destas, 94 continham a amostra de DNA a ser genotipada e duas eram controles negativos, contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA (para exclusão de contaminações). Cada reação continha 3,5 µL do kit *TaqMan® Genotyping PCR Master Mix* (Applied Biosystems Life Technologies Inc, Foster City, CA, USA), 3,4 µL de água deionizada, 0,1 µL da sonda (Applied Biosystems Life Technologies Inc, Foster City, CA, USA) e 1 µL de DNA (50 ng/µL), totalizando 8 µL.

Para a reação de PCR em tempo real, utilizou-se o aparelho Stratagene Mx3005P QPCR System (La Jolla, CA, USA). Foi realizado um ciclo de desnaturação para separação da fita dupla de DNA, com duração de 10 minutos a 95 °C, acompanhado por cinquenta ciclos de anelamento da sonda e extensão do fragmento de DNA com duração de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, respectivamente. A leitura da fluorescência foi feita ao final de cada ciclo. Para a análise dos produtos da reação, foi utilizado o modo de discriminação alélica (Figura 12) do software que acompanha o aparelho.

Um número mínimo de 10% das amostras selecionadas aleatoriamente foram genotipadas novamente como controle de qualidade para garantir a exclusão de possíveis erros laboratoriais.

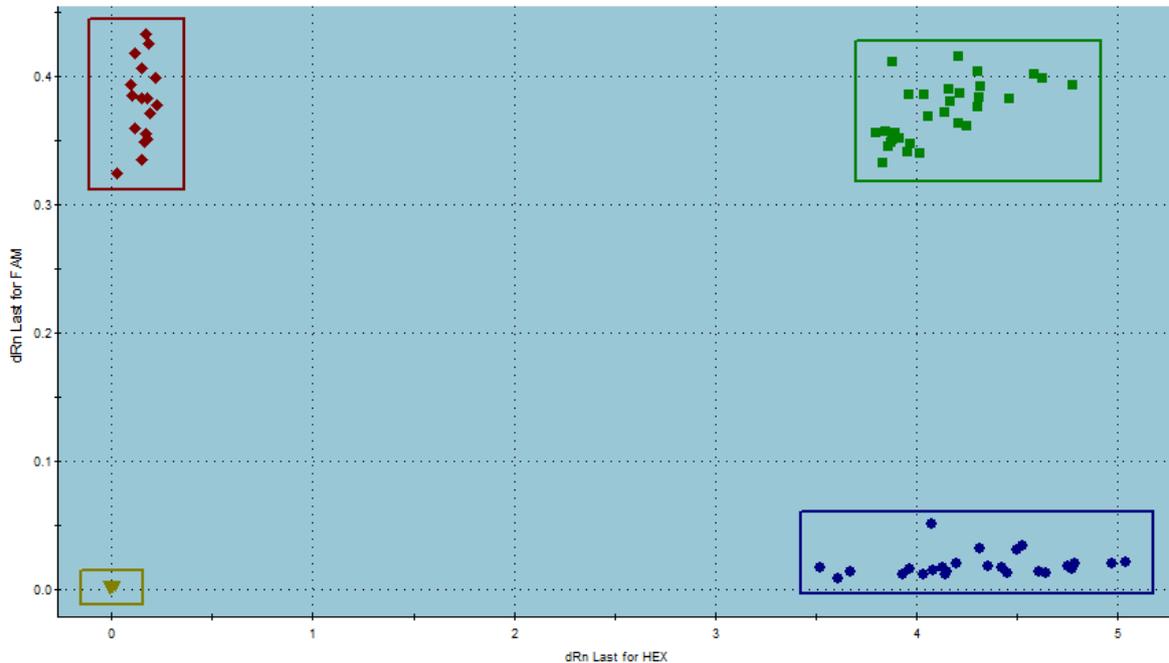


Figura 12: Resultado ilustrativo da análise da discriminação alélica em uma PCR em tempo real no aparelho Stratagene Mx3005P QPCR System. Cada ponto é o resultado de uma amostra, os pontos em vermelho no canto superior esquerdo são homozigotos para o alelo marcado com a fluorescência FAM, os pontos em azul no canto inferior direito representam os indivíduos homozigotos para o alelo marcado com a fluorescência HEX e os pontos em verde no canto superior direito são heterozigotos (um alelo marcado com a fluorescência FAM e o outro com a HEX). Os pontos em marrom no canto inferior esquerdo são os controles negativos.

5. Análise estatística

O teste t de Student foi utilizado para comparação entre as variáveis quantitativas (IMC, circunferência abdominal, níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, HDL e LDL) dos casos e controles, usando o *software GraphPad Prism*, na sua versão 5.01.

A análise das frequências alélicas e genotípicas e a estimativa de risco determinada pela presença dos polimorfismos (*odds ratio*, OR) foram realizadas através do programa *Unphased* (versão 3.1.5) (Dudbridge, 2008). Os resultados

foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$. No intuito de confirmar os resultados obtidos pelo *Unphased*, foi realizado o teste de 1000 permutações, permitindo a exclusão de possíveis resultados falsos positivos (erro tipo I).

Após as análises do *Unphased*, foi feita a comparação entre os polimorfismos que demonstraram associação com a OBM ($p < 0,05$) e os parâmetros clínico laboratoriais alterados no grupo dos obesos mórbidos (IMC, circunferência abdominal, níveis plasmáticos de glicose). Para tanto, realizou-se o teste de análise de variância simples (ANOVA 1 way) no programa *GraphPad Prism* (versão 5.01). Os testes estatísticos foram bicaudados e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A análise do EHW foi realizada para todos os SNPs através do *software Haploview*, versão 4.2 (Barrett *et al.*, 2005). A frequência do menor alelo (MAF, *Minor Allele Frequency*) e formação de haplótipos através dos valores de desequilíbrio de ligação (LD), também foram determinadas por este *software*. Neste estudo, os haplótipos foram determinados através do cálculo do LD. O D' (lê-se *D prime*), valor representativo do nível de recombinação entre os *loci*, é a medida mais utilizada para representação do LD (Gabriel *et al.*, 2002). Os resultados do *Haploview* foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,001$ e também foram submetidos à análise das 1000 permutações.

A fim de investigar a existência de uma interação entre os genes selecionados na susceptibilidade da obesidade mórbida empregou-se o *software* MDR, versão 2.0 beta 8.4. Os resultados provenientes das suas análises foram representados sob forma de dendograma, uma das ferramentas visuais para interpretação dos modelos de interação gene-gene (Moore *et al.*, 2006). É importante ressaltar que o uso deste *software* reduz as chances de falsos positivos, em função da estratégia de validação cruzada empregada no método (Ritchie *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2006). Neste modelo o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ e também foi aplicada a análise das 1000 permutações.

Resultados

1. Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 463 indivíduos, subdividindo-se em 251 obesos mórbidos e 212 controles saudáveis. Do total de obesos mórbidos, obteve-se acesso apenas aos dados clínicos de 161 pacientes. Destes, 22 sujeitos eram do sexo masculino (13,70 %), com média de idade de $37,40 \pm 13,24$ anos e 139 (86,30 %) eram do sexo feminino, com média de $42,21 \pm 11,68$ anos. O IMC desse grupo foi de $44,94 \pm 6,55$ kg/m² e as medidas da circunferência abdominal ($136,15 \pm 13,48$ e $122,97 \pm 13,23$ para os sexos masculino e feminino, respectivamente) estavam acima dos padrões de referência. As dosagens dos triglicerídeos, HDL e LDL encontraram-se de acordo com a normalidade, diferentemente dos níveis plasmáticos de glicose ($107,04 \pm 45,96$ mg/dL), que estavam acima dos valores de referência (Tabela 5).

Dos 212 controles recrutados não foi possível ter acesso a 16 prontuários. Destes, 65 indivíduos (33,16 %) eram do sexo masculino, com média de idade de $59,17 \pm 12,92$ anos, e 131 (66,84 %) do sexo feminino, com média de $58,17 \pm 14,15$ anos. O IMC apresentado por este grupo foi de $24,08 \pm 2,82$ kg/m² e os valores da circunferência abdominal, assim como os demais parâmetros laboratoriais estavam dentro dos valores de referência (Tabela 5).

Tabela 5: Caracterização clínica dos indivíduos obesos mórbidos e controles.

Parâmetros	Valores de referência	Obesos mórbidos	Controles	p-valor
IMC (kg/m ²)	< 25,00	$44,94 \pm 6,55$	$24,08 \pm 2,82$	< 0,0001
Circunferência abdominal (cm)				
Masculino	102	$136,15 \pm 13,48$	$88,40 \pm 9,68$	<0,0001
Feminino	88	$122,97 \pm 13,23$	$87,19 \pm 9,63$	<0,0001
Glicose (mg/dL)	≤ 100	$107,04 \pm 45,96$	$79,83 \pm 11,84$	< 0,0001
Triglicerídeos (mg/dL)	≤ 150	$145,72 \pm 88,66$	$141,05 \pm 58,99$	0,4012
HDL (mg/dL)	≥ 40	$48,87 \pm 11,52$	$42,39 \pm 13,72$	<0,0001
LDL (mg/dL)	≤ 130	$120,63 \pm 38,08$	$118,37 \pm 28,73$	0,5615

IMC, índice de massa corporal; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade. Valores de referência baseados na Sociedade Brasileira de Cardiologia (1996).

2. Análise genética

2.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

À exceção dos polimorfismos *rs11584787* do gene *AMPK* e os dois *tagSNPs* de *POMC*, todos os demais estavam de acordo com o EHW (Tabela 6). Na avaliação individual dos casos e controles, o *rs11584787* continuou apresentando desvio do EHW para ambos os grupos. Já o *rs934778* mostrou-se dentro do EHW apenas no grupo dos obesos mórbidos ($p = 0,7935$) e o *rs6545975* apresentou-se dentro dos critérios para o EHW tanto para os casos quanto para os controles ($p = 0,1044$ e $p = 0,0012$).

Tabela 6: EHW e MAF para os *tagSNPs* usados neste estudo.

<i>tagSNP</i>	EHW (p -valor)			MAF (%)	MAF CEU (%)
	OBM	Controles	Total		
<i>FOXO3a</i>					
<i>rs1536057</i>	0,0144	0,0716	0,5020	29,90	27,90
<i>rs2802292</i>	0,4277	0,2972	1,0000	49,40	42,40
<i>rs3813498</i>	1,0000	0,2228	0,4264	29,80	18,30
<i>rs1935952</i>	0,1695	0,6276	0,5182	42,20	30,50
<i>AMPK</i>					
<i>rs1442760</i>	0,0184	0,2438	0,0092	45,30	41,50
<i>rs1036851</i>	0,0407	0,0087	1,0000	49,20	35,80
<i>rs1348316</i>	0,0426	1,0000	0,1194	48,10	40,70
<i>rs11584787</i>	$1,53e^{-10}$	$1,34e^{-11}$	$7,64e^{-21}$	41,90	27,00
<i>POMC</i>					
<i>rs934778</i>	0,7935	$2,48e^{-6}$	$9,16e^{-6}$	37,10	31,40
<i>rs6545975</i>	0,1044	0,0012	$3,00e^{-4}$	43,40	41,20

EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; MAF, Frequência do menor alelo encontrada neste estudo; MAF CEU: Frequência do menor alelo na população caucasiana europeia (CEU) disponível no banco de dados do HapMap (www.hapmap.org) e do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2. Frequências genéticas e estimativas de risco

A frequência do menor alelo observada neste estudo foi similar à frequência encontrada na população caucasiana europeia listada no HapMap e NCBI (Tabela 6), à exceção dos *rs3813498*, *rs1935952*, *rs1036851* e *rs11584787*. Sabe-se que *loci* com pequena MAF (< 10 %) tem fraco poder de detecção de genótipos de risco quando comparado a *loci* com MAF > 40 % (Ardlie *et al.*, 2002). Nenhum dos nossos resultados apresentou MAF < 10 %.

251 amostras de OBM e 193 de controles foram genotipadas para os polimorfismos de *FOXO3a* (Tabela 7). Dentre eles, apenas o *rs1536057* demonstrou relação com a obesidade mórbida. Este *tagSNP* apresentou um perfil dual, de maneira que, o perfil heterozigoto AG esteve em maior frequência no grupo caso (51,8 %) quando comparado ao controle (31,4 %), conferindo uma *odds ratio* (OR) de 1,936. Por sua vez, o genótipo homozigoto selvagem GG esteve em maior frequência nos controles (40,6 % nos casos e 59,7 % nos controles), determinando uma OR de 0,797. O mesmo ocorre para as frequências alélicas: o alelo mutante A foi mais frequente no grupo caso (33,5 % nos casos e 24,6 % nos controles) e o alelo G nos controles (66,5 % nos casos e 75,4 % nos controles). Contudo, apesar das associações observadas, ao submeter estes dados ao teste das 1000 permutações, os valores de *p* não se mantiveram significativos.

No que tange ao gene da *AMPK* (Tabela 8), 241 obesos mórbidos e 205 controles foram genotipados. A frequência observada para o genótipo homozigoto selvagem (TT) do *rs1036851* foi substancialmente maior no grupo caso (frequência de 35,4 % nos obesos mórbidos e 13,9 % nos controles), atribuindo uma OR de 3,033 para este grupo. No entanto, quando em heterozigose (genótipo CT), leve tendência à proteção foi observada (OR = 0,849). Do mesmo modo, a presença do alelo ancestral T foi maior nos obesos mórbidos (56,5 % nos casos e 43,6 % nos controles), demonstrando susceptibilidade para a OBM, com uma OR de 1,679.

Apesar disso, assim como para *FOXO3a*, os valores de p não se sustentaram após as 1000 permutações e os outros *tagSNPs* também não evidenciaram diferenças expressivas entre casos e controles.

Quanto ao gene *POMC* (Tabela 9), foram genotipados 240 obesos mórbidos e 210 controles. Para o *rs934778*, foi observada pequena proporção do genótipo *CC* nos casos (8,5 %) quando comparados aos controles (30,5 %), sugerindo que a presença deste possa conferir um fator de risco diminuído para a obesidade mórbida. Quando em heterozigose (genótipo *CT*) este marcador conferiu uma OR de 4,251, e, em homozigose (genótipo *TT*), a OR tornou-se ainda mais significativa, com valor de 5,137, com frequência maior no grupo caso (51,9 % nos casos e 36,2 % nos controles). A presença do alelo ancestral *T* foi significativamente maior nos obesos mórbidos (71,7 %) que nos controles (52,9 %), resultando em uma OR de 2,26. Apesar da forte associação, ao submeter esses resultados às 1000 permutações, apenas o valor de p para o genótipo *CC* do *rs934778* manteve-se menor que 0,05 ($p = 0,0104$) (Tabela 9). Por sua vez, o *rs6545975* de *POMC* apresentou o genótipo homozigoto mutante *CC* mais frequente no grupo controle (frequência de 18,3 % e 28,7 % nos casos e controles, respectivamente), com uma OR de 0,543. O alelo mutante *C* obteve maior frequência dentre os controles (39,6 % nos casos e 47,7 % nos controles), conferindo uma OR alélica de 0,718. Entretanto, o valor de p não se sustentou após as 1000 permutações (Tabela 9).

Tabela 7: Frequências genotípicas e alélicas dos tagSNPs de FOXO3a.

<i>tagSNP</i>	OBM (Freq%)	Controle (Freq%)	OR (95% IC)	χ^2	p-valor ^a	p-1000 ^b
<i>rs1536057</i>						
AA	19 (7,6)	15 (8,9)	1,0	0,231	0,6304	
AG	130 (51,8)	53 (31,4)	1,936 (0,916 - 4,094)	17,15	3,46e ⁻⁵	0,5171
GG	102 (40,6)	101 (59,7)	0,797 (0,384 - 1,656)	14,79	0,0001	0,2040
	251 (100)	169 (100)				
A	168 (33,5)	83 (24,6)	1,0			
G*	334 (66,5)	255 (75,4)	0,647 (0,475 - 0,882)	7,653	0,0056	0,1430
	502 (100)	338 (100)				
<i>rs2802292</i>						
TT	59 (23,7)	54 (28,1)	1,0	1,116	0,2907	
TG	132 (53,0)	88 (45,8)	1,373 (0,869 - 2,17)	2,235	0,1349	
GG	58 (23,3)	50 (26,1)	1,062 (0,626 - 1,801)	0,443	0,5057	
	249 (100)	192 (100)				
T	250 (50,2)	196 (51,0)	1,0			
G*	248 (49,8)	188 (49,0)	1,034 (0,792 - 1,350)	0,061	0,8044	
	498 (100)	384 (100)				
<i>rs3813498</i>						
TT	122 (48,6)	100 (51,8)	1,0	0,449	0,5028	
TC	106 (42,2)	73 (37,8)	1,190 (0,799 - 1,773)	0,880	0,3480	
CC	23 (9,2)	20 (10,4)	0,943 (0,490 - 1,815)	0,179	0,6719	
	251 (100)	193 (100)				
T*	350 (69,7)	273 (70,7)	1,0			
C	152 (30,3)	113 (29,3)	1,049 (0,784 - 1,403)	0,105	0,7458	
	502 (100)	386 (100)				
<i>rs1935952</i>						
GG	42 (16,8)	30 (16,9)	1,0	0,001	0,9677	
GC	135 (54,0)	81 (45,8)	1,190 (0,691 - 2,050)	2,813	0,0935	
CC	73 (29,2)	66 (37,3)	0,790 (0,445 - 1,404)	3,088	0,0789	
	250 (100)	177 (100)				
G	219 (43,8)	141 (39,8)	1,0			
C*	281 (56,2)	213 (60,2)	0,849 (0,644 - 1,120)	1,339	0,2472	
	500 (100)	354 (100)				

*Alelo Ancestral; p-valor^a: p-valor antes da permutação; p-1000^b: p-valor após 1000 permutações para casos em que $p < 0,05$.

Tabela 8: Frequências genótípicas e alélicas dos *tagSNPs* de *AMPK*.

<i>tagSNP</i>	OBM (Freq%)	Controle (Freq%)	OR (95% IC)	χ^2	p-valor ^a	p-1000 ^b
<i>rs1442760</i>						
CC	85 (35,3)	63 (30,7)	1,0	1,029	0,3104	
CT	100 (41,5)	93 (45,4)	0,797 (0,518 - 1,227)	0,676	0,4108	
TT	56 (23,2)	49 (23,9)	0,847 (0,512 - 1,401)	0,027	0,8688	
	241 (100)	205 (100)				
C*	270 (56,0)	219 (53,4)	1,0	0,6056	0,4365	
T	212 (44,0)	191 (46,6)	0,900 (0,691 - 1,173)			
	482 (100)	410 (100)				
<i>rs1036851</i>						
CC	52 (22,4)	50 (26,7)	1,0	1,051	0,3052	
CT	98 (42,2)	111 (59,4)	0,849 (0,529 - 1,363)	12,13	0,0005	0,1275
TT	82 (35,4)	26 (13,9)	3,033 (1,685 - 5,458)	24,88	6,10e ⁻⁷	0,5736
	232 (100)	187 (100)				
C	202 (43,5)	211 (56,4)	1,0	13,75	0,0002	0,7030
T*	262 (56,5)	163 (43,6)	1,679 (1,276 - 2,210)			
	464 (100)	374 (100)				
<i>rs1348316</i>						
AA	66 (27,4)	45 (22,1)	1,0	1,675	0,1956	
AG	104 (43,1)	101 (49,5)	0,702 (0,440 - 1,120)	1,797	0,1801	
GG	71 (29,5)	58 (28,4)	0,835 (0,499 - 1,395)	0,056	0,8115	
	241 (100)	204 (100)				
A	236 (49,0)	191 (46,8)	1,0	0,408	0,5226	
G*	246 (51,0)	217 (53,2)	0,917 (0,705 - 1,195)			
	482 (100)	408 (100)				
<i>rs11584787</i>						
CC	109 (45,2)	83 (43,9)	1,0	0,074	0,7858	
CG	68 (28,2)	48 (25,4)	1,079 (0,676 - 1,721)	0,427	0,5133	
GG	64 (26,6)	58 (30,7)	0,840 (0,533 - 1,325)	0,889	0,3455	
	241 (100)	189 (100)				
C*	286 (59,3)	214 (56,6)	1,0	0,645	0,4219	
G	196 (40,7)	164 (43,4)	0,894 (0,681 - 1,175)			
	482 (100)	378 (100)				

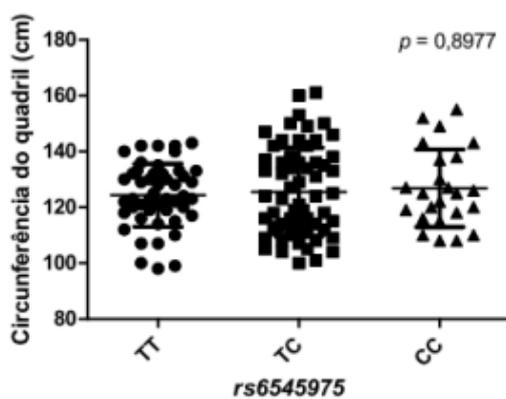
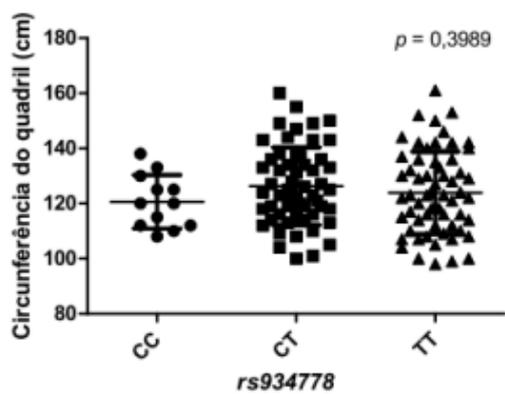
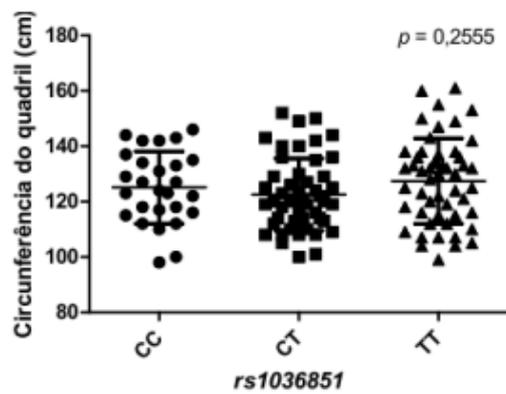
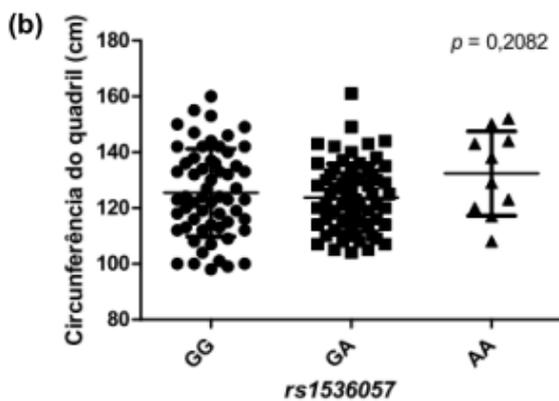
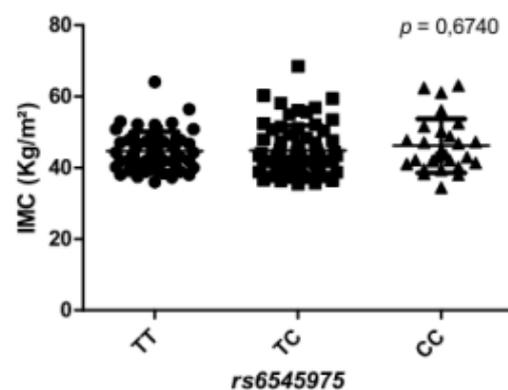
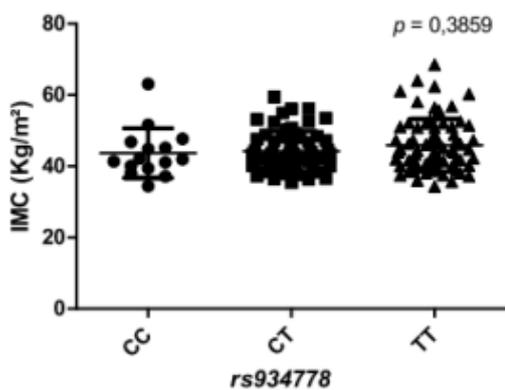
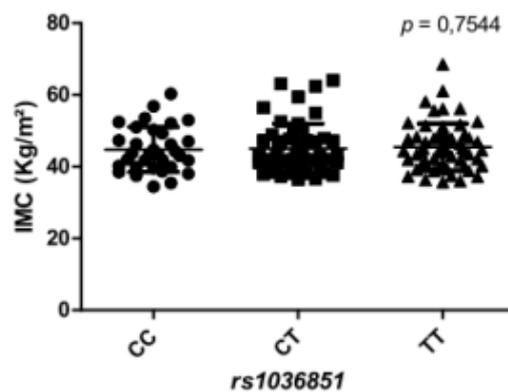
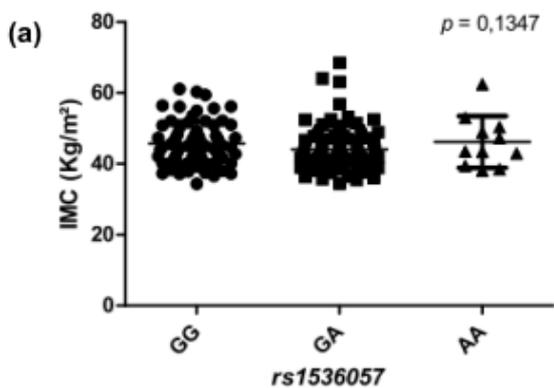
*Alelo Ancestral; p-valor^a: p-valor antes da permutação; p-1000^b: p-valor após 1000 permutações para casos em que $p < 0,05$.

Tabela 9: Frequências genotípicas e alélicas dos *tagSNPs* de *POMC*.

<i>tagSNP</i>	OBM (Freq%)	Controle (Freq%)	OR (95% IC)	χ^2	p-valor ^a	p-1000 ^b
<i>rs934778</i>						
CC	20 (8,5)	64 (30,5)	1,0	34,94	3,397e ⁻⁹	0,0268
CT	93 (39,6)	70 (33,3)	4,251 (2,356 - 7,671)	1,861	0,1725	
TT	122 (51,9)	76 (36,2)	5,137 (2,882 - 9,157)	11,10	0,0008	0,6542
	235 (100)	210 (100)				
C	133 (28,3)	198 (47,1)	1,0	33,72	6,364e ⁻⁹	0,3462
T*	337 (71,7)	222 (52,9)	2,260 (1,712 - 2,983)			
	470 (100)	420 (100)				
<i>rs6545975</i>						
TT	94 (39,2)	65 (33,3)	1,0	1,579	0,209	
TC	102 (42,5)	74 (38,0)	0,953 (0,617 - 0,925)	0,925	0,3361	
CC	44 (18,3)	56 (28,7)	0,543 (0,328 - 0,901)	6,553	0,0104	0,4785
	240 (100)	195 (100)				
T*	290 (60,4)	204 (52,3)	1,0	5,766	0,0163	0,2345
C	190 (39,6)	186 (47,7)	0,718 (0,548 - 0,941)			
	480 (100)	390 (100)				

*Alelo Ancestral; p-valor^a: p-valor antes da permutação; p-1000^b: p-valor após 1000 permutações para casos em que $p < 0,05$.

Ao se comparar as frequências genotípicas para os marcadores que apresentaram $p < 0,05$ no grupo dos obesos mórbidos com os valores de IMC, circunferência abdominal e glicemia — parâmetros alterados neste grupo (Tabela 5) —, não foi observada diferença significativa entre os perfis genotípicos (Figura 13). Este dado sugere que os polimorfismos testados não estão associados ao aumento do IMC, da circunferência abdominal ou da glicemia no grupo dos obesos mórbidos.



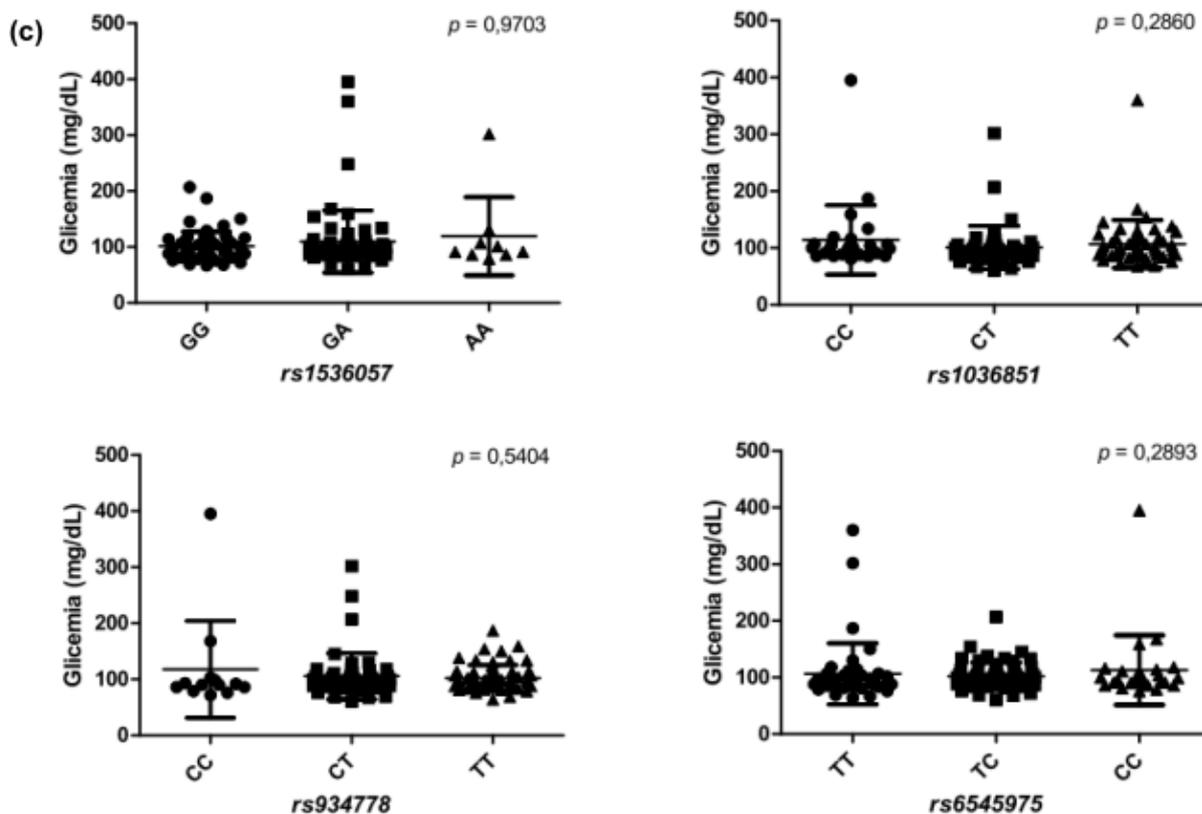


Figura 13: Comparação entre os perfis genotípicos e os parâmetros clínico laboratoriais alterados no grupo dos obesos mórbidos. Os marcadores que apresentaram $p < 0,05$ na análise caso x controle são: *rs1536057* (*FOXO3a*), *rs1036851* (*AMPK*), *rs3813498* e *rs1935952* (*POMC*). Nenhum *tagSNP* demonstrou diferença significativa para os perfis genotípicos quando comparados aos valores de IMC (Figura 13a), circunferência abdominal (Figura 13b) e glicemia (Figura 13c).

2.3. Haplótipos

A fim de verificar os padrões de recombinação, foi realizada a análise de haplótipos utilizando-se o programa *Haploview* 4.2. Seus resultados mostraram a formação de blocos haplotípicos para o gene *FOXO3a*, entre os *rs1536057* e *rs2802292* ($D' = 1,0$) e entre os *rs3813498* e *rs1935952* ($D' = 0,94$) (Figura 14a), de acordo com os padrões de Gabriel e colaboradores (2002). Analisando-se separadamente casos e controles, pode-se notar que nos obesos mórbidos o padrão haplotípico se mantém (Figura 14b), entretanto, nos controles, apenas o haplótipo entre os *rs1536057* e *rs2802292* permanece ($D' = 1,0$) (Figura 14c).

Embora não tenha sido observada a formação de bloco haplotípico para *AMPK* na amostra total (Figura 15a), ao realizar a análise individual, o grupo dos

obesos mórbidos apresentou forte LD entre os *rs1442760*, *rs1036851* e *rs1348316* ($D' = 1,0$) (Figura 15b), não demonstrando nenhuma relação nos controles (Figura 15c). Estes resultados sugerem que, apesar do *Haploview* contemplar blocos com $D' > 0,9$, nem todos os LD's com valores de D' superiores a este podem ser considerados blocos, aja vista que o grupo dos controles impediu a formação de haplótipo na análise global das amostras para *AMPK* (Figura 15a).

Nenhum bloco haplotípico foi obtido entre os *tagSNPs* de *POMC*, tanto na análise geral ($D' = 0,53$) (Figura 16a) quanto nas individuais (Figuras 16b e 16c), como o esperado, uma vez que ambos os *tagSNPs* para este gene encontraram-se em desacordo com o EHW.

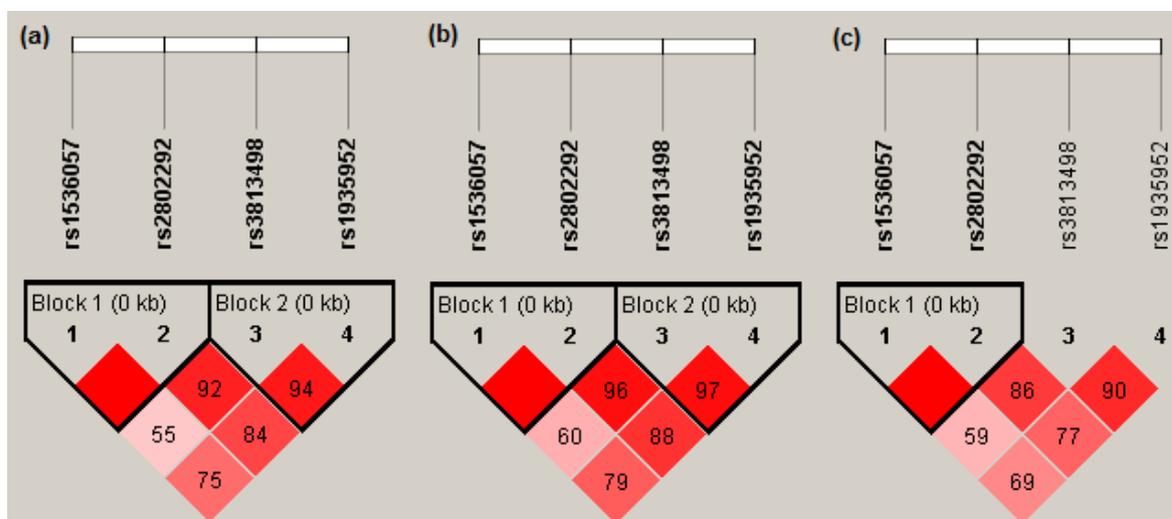


Figura 14: Blocos haplotípicos para o gene *FOXO3a* na amostra total (a) e, separadamente, para casos (b) e controles (c). O painel superior indica os polimorfismos e os valores dentro dos losangos representam o valor D' . Quanto mais escura a cor, maior é o valor de D' e, portanto, maior o desequilíbrio de ligação. Haplótipos foram formados entre os *rs1536057* e *rs2802292* ($D' = 1,0$) e entre os *rs3813498* e *rs1935952* ($D' = 0,94$) (Figura 14a). Nos casos o padrão haplotípico se mantém (Figura 14b) e nos controles, apenas o haplótipo entre os *rs1536057* e *rs2802292* permanece (Figura 14c).

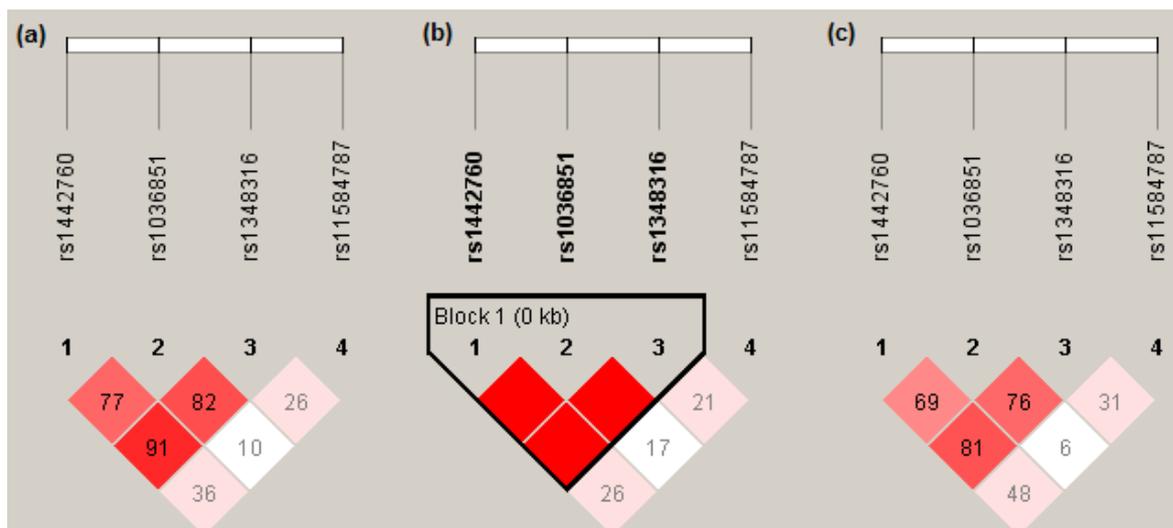


Figura 15: Blocos haplotípicos para o gene *AMPK* na amostra total (a), apenas nos casos (b) e apenas nos controles (c). O painel superior indica os polimorfismos e os valores dentro dos losangos representam o valor D' . Quanto mais escura a cor, maior será o valor de D' e, portanto, maior o desequilíbrio de ligação. Formou-se haplótipo apenas no grupo dos obesos mórbidos entre os *rs1442760*, *rs1036851* e *rs1348316* ($D' = 1,0$) (Figura 15b).

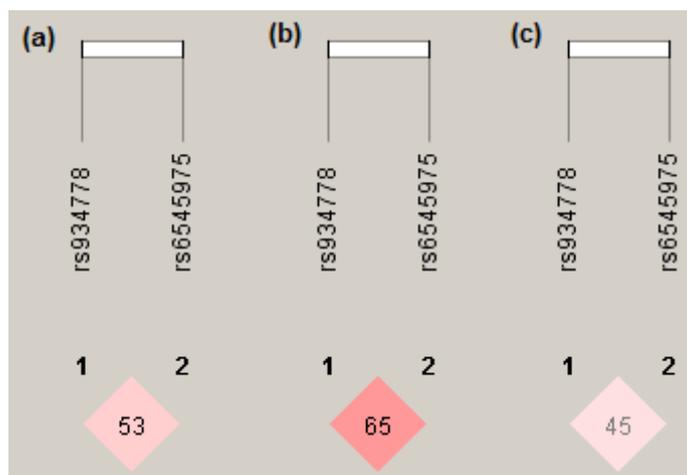


Figura 16: Ausência de blocos haplotípicos para o gene *POMC* na amostra total (a) e, separadamente, para os obesos mórbidos (b) e os controles (c). O painel superior indica os polimorfismos e os valores dentro dos losangos representam o valor D' . Quanto mais escura a cor, maior será o valor de D' e, portanto, maior o desequilíbrio de ligação. Nenhum haplótipo foi evidenciado.

2.4. Análise de interação gene-gene

No intuito de avaliar se existe interação entre os polimorfismos dos genes estudados na susceptibilidade para a obesidade mórbida, foi feita uma análise de

interação gene-gene com o auxílio do programa estatístico MDR (Figura 17). Se a interação entre os *tagSNPs* promover um ganho de informação, isto é aumenta-se o poder de predição da OBM, admite-se que ocorreu sinergismo (representado no dendograma pelas cores vermelha e laranja), por exemplo em casos de epistasia. Por sua vez, quando a combinação dos polimorfismos provocar uma perda de informação, ou seja, diminui o poder de predição da doença, sugere-se uma correlação ou redundância (coloração azulada no dendograma), ocorrendo usualmente com polimorfismos em LD.

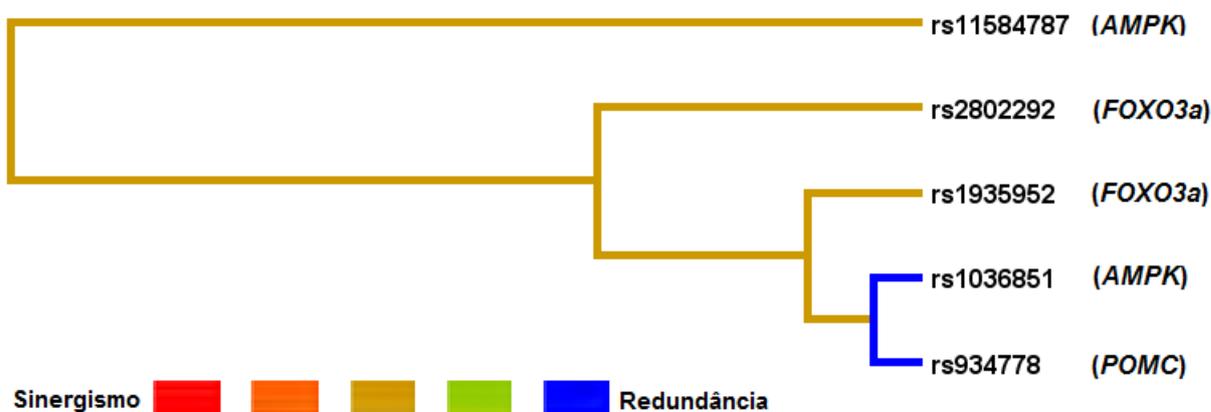


Figura 17: Dendograma gerado pelo MDR. As cores da legenda compreendem um espectro representando a transição de sinergismo para redundância. As cores vermelha e laranja representam sinergismo e, verde e azul, redundância. Em amarelo admite-se que os *tagSNPs* possuem efeitos independentes. Os *tagSNPs* *rs1036851* de *AMPK* e *rs934778* de *POMC* apresentaram redundância entre eles.

Através desta análise, não foi possível identificar um modelo de interação que possa prever a susceptibilidade para a OBM. Todavia, o *rs934778* de *POMC* e o *rs1036851* de *AMPK* demonstraram um espectro de redundância. Este resultado sugere que a combinação desses dois *tagSNPs* promove uma perda de informação genética, visto que aumenta-se o erro de predição para OBM.

O melhor modelo gerado pelo MDR é composto pelos *rs1935952* (*FOXO3a*), *rs1036851* (*AMPK*) e *rs934778* (*POMC*), com acurácia de 57,24 % e consistência de 8/10. Isto significa que este modelo é capaz de prever a obesidade mórbida de um indivíduo em 57,24% dos casos. Contudo, após as 1000 permutações, o valor de *p* não se sustentou (*p* = 0,216).

Discussão

Dados recentes da OMS mostram que aproximadamente 65% da população mundial vive em países onde sobrepeso e obesidade matam mais que a desnutrição (OMS, 2012). De acordo com pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde, Belo Horizonte apresentou um aumento exponencial no percentual de obesidade entre 2006 e 2011, chegando a ter 14% da sua população obesa e 45% com excesso de peso no último ano (Ministério da Saúde, 2012).

Nossa amostra abrange um total de 251 obesos mórbidos e 212 indivíduos saudáveis, com uma frequência notadamente superior do sexo feminino, o que pode ser explicado culturalmente pela maior procura de serviço médico pelas mulheres. O grupo de indivíduos saudáveis apresentou uma média de idade de 21,77 e 15,96 anos a mais para os sexos masculino e feminino, respectivamente, quando comparados aos obesos mórbidos (Tabela 5). Este fato reflete um aspecto positivo da amostra selecionada, uma vez que o desenvolvimento da OBM, usualmente, se dá em uma faixa etária inferior (entre 20 e 40 anos) (Kopelman, 2000) a apresentada pelos controles ($59,17 \pm 12,92$ anos para homens e $58,17 \pm 14,15$ anos para mulheres), portanto, a probabilidade que eles venham a desenvolver OBM torna-se remota.

Dentre os exames laboratoriais avaliados, apenas a glicemia dos obesos mórbidos ($107,04 \pm 45,96$ mg/dL) apresentou valor superior à normalidade (Tabela 5). Este dado reforça o conceito de que a obesidade mórbida é determinada primariamente pelo IMC e pela circunferência abdominal, e que exames bioquímicos como a medida dos níveis de triglicerídeos, HDL e LDL, não necessariamente estarão fora dos padrões.

O crescente índice de obesos mórbidos na população pode está relacionado ao estilo de vida comum à boa parcela dos habitantes que vivem em grandes centros urbanos, submetidos ao estresse do dia a dia, aliado à falta de exercícios físicos regulares e à dieta hipercalórica (Swinburn *et al.*, 2006). Entretanto, cabe aqui uma ressalva de que não somente os fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento da obesidade, mas também a herança genética possui ampla participação nesta patologia (Sorensen *et al.*, 1989; Bouchard, 1997). Disfunções nas vias que participam do comportamento alimentar regulado pelo hipotálamo, por exemplo, - mutações nos genes da leptina, *POMC*, *MC4R* - acarretam em graves quadros de hiperfagia e obesidade (Barsh & Schwartz, 2002; Bell *et al.*, 2005). Desta

forma, se faz relevante a investigação de genes que possam contribuir para a susceptibilidade à OBM.

Todos os *tagSNPs* analisados neste estudo se encontravam de acordo com o EHW, a exceção de três deles: *rs11584787* de *AMPK* e os *rs934778* e *rs6545975* de *POMC* (Tabela 6). O EHW postula que, se não existirem fatores evolutivos atuando sobre uma população, as frequências gênicas permanecem inalteradas e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio estável ao longo das gerações (Beiguelman, 2008). Os fatores que podem alterar o EHW incluem os casamentos consanguíneos, surgimento de novas mutações, migrações, seleção natural e deriva genética (Ortiz *et al.*, 2000; Zintzaras, 2010).

Os desvios no EHW encontrados neste trabalho podem ser atribuídos à estratificação da população, viés de seleção da amostra ou a erros de genotipagem (Zintzaras & Lau, 2008; Zintzaras, 2010). A estratificação populacional inclui diferenças entre grupos de origens étnicas distintas ou diferenças entre grupos de origem étnica similar, mas com limitada mistura racial (Wittke-Thompson *et al.*, 2005). Neste caso, desvios no EHW ocorrem quando indivíduos são selecionados de duas populações geneticamente diferentes e em proporções distintas entre casos e controles (Zintzaras & Lau, 2008). Neste estudo, não foi avaliada a origem étnica dos indivíduos, no entanto, sabe-se que foram recrutados de locais distintos — obesos mórbidos em Minas Gerais e controles em Pernambuco —, com elevado grau de miscigenação e que sofreram diferentes colonizações (Fausto, 1999). Portanto, este pode ser um fator considerável para os desvios observados. Além disso, não parece ser evidente a relação entre os desvios do EHW e erros de laboratoriais, já que, pelo menos, a genotipagem de 10% das amostras foi repetida aleatoriamente e nenhuma disparidade foi encontrada.

A MAF observada neste estudo foi similar à frequência encontrada na população caucasiana europeia listada no HapMap e NCBI, à exceção dos *rs3813498*, *rs1935952*, *rs1036851* e *rs11584787*. Esta diferença também pode ser atribuída a diferenças nas etnias da nossa amostra, uma vez que nos baseamos em caucasianos europeus como referência, o que não necessariamente configura o perfil genotípico da nossa amostra, aja vista que, embora, aparentemente, os indivíduos sejam classificados como caucasianos, nem sempre características

fenotípicas condizem com a herança genética do indivíduo, principalmente no Brasil, onde há um elevado grau de miscigenação (Pena *et al.*, 2011).

Este trabalho analisou as frequências de quatro polimorfismos para o gene *FOXO3a* (*rs1536057*, *rs2802292*, *rs3813498*, *rs1935952*). A exceção do *rs1536057*, as frequências genéticas observadas para os outros marcadores não diferiram significativamente entre casos e controles (Tabela 7). Desta forma, nossas análises estatísticas mostraram que os indivíduos portadores de apenas um alelo polimórfico (genótipo heterozigoto AG) apresentaram quase 2 vezes (OR = 1,936) mais chance de desenvolver a OBM.

Embora não significativos após as mil permutações, os resultados aqui encontrados mostrando que um polimorfismo genético em *FOXO3a* aumenta a susceptibilidade para desenvolvimento da OBM são relevantes já que este gene é amplamente descrito como um fator de transcrição chave para as respostas fisiológicas à insulina. Sabe-se que a atividade de *FOXO3a* pode ser regulada negativamente pelos níveis de insulina, os quais encontram-se elevados na OBM (Schwartz *et al.*, 2005; Zemva *et al.*, 2012). No entanto, evidências têm demonstrado que obesos mórbidos frequentemente, são caracterizados por disfunções metabólicas, apresentando resistência à insulina (Kahn *et al.*, 2006). Logo, sugere-se que a reduzida ativação da via da insulina, provocada pela resistência a este hormônio, afete as funções de *FOXO3a* na OBM, refletindo diretamente na transcrição de genes relacionados ao metabolismo de glicose e lipídios e ao comportamento alimentar (Yang & Hung, 2011). Contudo, outras pesquisas são necessárias para confirmação desta hipótese.

Até o momento, nenhum outro grupo avaliou a frequência destes marcadores selecionados na OBM. Existe apenas um artigo publicado com os *rs1536057*, *rs2802292* e *rs1935952* no banco de dados científico (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*), todavia, este retrata a frequência em indivíduos com transtorno bipolar (Magno *et al.*, 2011). Para o *rs2802292*, ainda foram encontrados alguns trabalhos, os quais descreviam sua relação com longevidade (Anselmi *et al.*, 2009; Banasik *et al.*, 2010), porém nenhum contemplou a OBM. Já para o *rs3813498*, nenhum estudo foi encontrado. Uma vez que não há um respaldo na literatura sobre os polimorfismos selecionados e a OBM, este trabalho torna-se o primeiro a descrever as frequências desses *tagSNPs* nesta doença.

Assim como para *FOXO3a*, este estudo analisou a frequência de quatro polimorfismos para o gene *AMPK* (*rs1442760*, *rs1036851*, *rs1348316*, *rs11584787*) e apenas o *rs1036851* demonstrou relação substancial com a OBM. Nossos resultados revelaram que indivíduos com genótipo homozigoto selvagem (*TT*) foram mais frequentes no grupo dos obesos mórbidos (35,4 %) quando comparado ao controle (13,9 %). Isto significa dizer que portadores deste perfil genotípico possuem uma predisposição até 3 vezes maior (OR = 3,033) para susceptibilidade à doença. Nossos resultados sugerem que indivíduos com genótipo *TT* para o *rs1036851* possam apresentar uma maior atividade da *AMPK*, contribuindo para maior ingestão alimentar. Contudo, após o teste das mil permutações, este resultado não se manteve significativo.

Estudos retratam o papel da *AMPK* na regulação energética em neurônios hipotalâmicos, de forma que hormônios estimuladores do apetite promovem sua ativação de alguma maneira ainda não estabelecida (Andersson *et al.*, 2004; Minokoshi *et al.*, 2004). Portanto, a ausência de associação positiva em nossos resultados após as mil permutações não invalida a participação da *AMPK* na OBM, mesmo porque foram selecionados apenas quatro *tagSNPs*, os quais não cobrem todo o gene. Sendo assim, polimorfismos em outras regiões podem ter impacto relevante sobre a função da proteína.

No que tange ao gene da *POMC*, foram observados riscos para predisposição à OBM bastante significativos para ambos os polimorfismos (*rs934778*, *rs6545975*). Para o *rs934778*, nossos resultados mostraram que indivíduos carregando apenas um alelo selvagem *T* no perfil heterozigoto (*CT*) apresentam cerca de 4 vezes mais chances de desenvolverem a OBM (OR = 4,251) e, na presença de dois alelos *T* (homozigotos *TT*) esta chance aumenta para 5 vezes mais (OR = 5,137) (Tabela 9).

É de sólido conhecimento que a deficiência da *POMC* e de seus peptídeos derivados configura-se como um importante desencadeador da obesidade grave (Krude *et al.*, 1998, 2003; Yaswen *et al.*, 1999). Farooqi e colaboradores (2006) inferiram ainda que a perda de apenas uma das cópias de *POMC* já é suficiente para predispor à obesidade. Adicionalmente, Wang e colaboradores identificaram uma associação positiva do *rs1042571* com o IMC em americanos europeus, de forma que a presença do alelo mutante *T* aumenta a expressão de *POMC*, favorecendo a sensação de saciedade. Este trabalho sugere ainda mais quatro

mutações (c.432 G>T, c.609 C>T, c.969 C>G e c.1187 A>G) que predispõem ao sobrepeso e obesidade (Wang *et al.*, 2012).

Portanto, sugere-se que o genótipo *TT* do *rs934778*, possa conferir uma perda de função à proteína POMC e, com isso, predisponha estes indivíduos à OBM. Tal dado vem a somar-se com os resultados de Speliotes *et al* (2010), que identificaram um novo *loci* em *POMC* associado ao IMC (*rs713586*), reforçando seu papel neuroendócrino no controle do balanço energético.

Em contraste, o *rs6545975* apresentou-se com uma OR de 0,543 para o genótipo homozigoto mutante (*CC*), o que sugere um fator de risco diminuído para a OBM. Logo, é provável que este perfil possa contribuir para melhor funcionamento anorexígeno da POMC. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para confirmar esta suposição.

Foi encontrado apenas um trabalho que utilizou os *rs934778* e *rs6545975* em condições de obesidade (Ternouth *et al.*, 2011). As frequências genótípicas observadas foram semelhantes à encontrada neste estudo, no entanto, Ternouth e colaboradores (2011) não identificaram relação significativa entre tais polimorfismos e a obesidade. Sendo assim, este é o primeiro trabalho a demonstrar uma frequência tão relevante para a susceptibilidade à OBM. Um dos motivos pelo qual nossos resultados demonstraram-se tão relevantes seja devido a um possível viés de seleção da amostra, uma vez que casos e controles foram recrutados de locais distintos, com heranças genéticas diferenciadas. Além disso, vale recordar que ambos os nossos *tagSNPs* estavam fora do EHW. Portanto, para ratificação dos nossos resultados, seria interessante genotipar controles selecionados na mesma região que os obesos mórbidos.

Feitas as análises de frequência e estimativas de risco, nós selecionamos os *tagSNPs* que apresentaram valor de $p < 0,05$ — *rs1536057* (*FOXO3a*), *rs1036851* (*AMPK*), *rs3813498* e *rs1935952* (*POMC*) —, e, comparamos as diferenças dos perfis genóticos somente dentro do grupo dos obesos mórbidos com os parâmetros alterados (IMC, circunferência abdominal e glicemia). Com isso, nossa intenção era verificar se, neste grupo, estes marcadores predispunham para uma maior ou menor alteração dos parâmetros avaliados.

Nossos resultados não evidenciaram nenhuma diferença significativa entre os genótipos e os parâmetros analisados dos obesos mórbidos. Portanto, sugere-se

que estes polimorfismos não alteram os valores de IMC, circunferência abdominal e glicemia na OBM. Isto pode ser explicado pela pequena variação destes parâmetros nos obesos mórbidos. Logo, seria interessante que esta análise fosse feita incluindo com indivíduos com $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, para que fosse possível observar como estes *tagSNPs* se comportam nos diferentes graus de obesidade (grau I: IMC entre 30 - 34,99 kg/m^2 ; grau II: IMC entre 35 - 39,99 kg/m^2 ; grau III: $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$). Porém, nós não dispusemos de um número suficiente de indivíduos para esta comparação.

Há algum tempo a análise de haplótipos tem contribuído eficazmente para a identificação de genes associados a doenças com heranças tanto mendelianas quanto complexas (Gabriel *et al.*, 2002; *The International HapMap Consortium*, 2005). Como já abordado, um haplótipo pode ser definido como uma combinação de alelos em *loci* adjacentes, que se encontram em desequilíbrio de ligação e segregam juntos na divisão celular, como um bloco de genes. Desta forma, os padrões genotípicos se repetem dentro de um haplótipo devido à reduzida taxa de recombinação, descartando-se, assim, a necessidade de genotipar toda a região (Altshuler *et al.*, 2008), o que facilita a identificação do vínculo genético com a doença em questão.

Nossos resultados evidenciaram apenas a formação de dois blocos haplotípicos, ambos correspondentes ao gene *FOXO3a* (Figura 14). Isto indica que a combinação dos *rs1536057* e *rs2802292*, bem como dos *rs3813498* e *rs1935952*, segregam juntos na divisão celular e se repetem na população. Estes dados corroboram com o estudo de Magno e colaboradores (2011) que demonstraram os mesmos haplótipos para *FOXO3a* em uma população brasileira (Magno *et al.*, 2011).

Em nossas análises haplotípicas para *AMPK* não foi observada formação de blocos, vindo a somar-se aos dados de Sun e colaboradores (2006), que falharam em demonstrar formação de haplótipos em *AMPK* no grupo de indivíduos com diabetes tipo 2. Não obstante, ao realizar-se uma análise separadamente de casos e controles, foi possível notar a formação de haplótipo entre os *rs1442760*, *rs1036851* e *rs1348316* somente no grupo dos obesos mórbidos (Figura 15). Destes achados, pode-se concluir que o padrão de combinação entre os *tagSNPs*, repetindo-se apenas entre os casos, caracteriza/ identifica este grupo na população selecionada, o que reflete no vínculo deste haplótipo com a OBM.

Quanto ao gene da POMC, nenhum bloco haplotípico foi encontrado (Figura 16). Uma possível explicação para isso é que ambos os tagSNPs selecionados estavam fora do EHW, o que impossibilita a formação de haplótipo, uma vez que estes são formados quando há baixa taxa de recombinação na região e, um dos fatores que afeta o EHW é a presença de mutações/ recombinações (Ortiz *et al.*, 2000; Beiguelman, 2008).

No intuito de verificar se os genes escolhidos nesta pesquisa estariam relacionando-se entre si no controle da ingestão alimentar no hipotálamo, foi realizada uma análise de interação gene-gene (epistasia) com o programa MDR. Inicialmente, a hipótese era de que, como já é sabido, AMPK fosforila FOXO3a (Greer *et al.*, 2007), e este, por sua vez, poderia inibir a transcrição de POMC, para potencializar o aumento da ingestão alimentar. Contudo, não foi demonstrada interação entre esses genes na OBM, apenas uma redundância entre o *rs934778* de *POMC* e o *rs1036851* de *AMPK*. Isto é, a interação entre estes *tagSNPs* promove uma diminuição do poder de predição da doença, o que, geralmente, ocorre em casos de desequilíbrio de ligação. Vale recordar que, apesar do *rs934778* não apresentar-se em LD (Figura 16), o *rs1036851* demonstrou forte LD no grupo dos obesos mórbidos (Figura 15b), como observado na análise do *Haploview*.

Por fim, a análise do melhor modelo gerado pelo MDR, composto pelos *rs1036851*, *rs1935952* e *rs934778*, permite concluir que este modelo é capaz de determinar corretamente a ocorrência da OBM em até 57,24% dos casos. Contudo, este dado não se sustentou após o teste das mil permutações. Desta forma, não se pode afirmar que os genes selecionados apresentam relação de epistasia entre si, embora não seja indicado excluir totalmente uma possível interação entre os genes, visto que, apenas alguns polimorfismos foram estudados.

Embora resultados significativos tenham sido encontrados (antes das 1000 permutações), esta pesquisa apresenta algumas limitações. Primeiramente, o tamanho amostral poderia ser maior, dada a alta frequência da doença estudada. Seria interessante também estratificar a população de acordo com etnia, poder socioeconômico, escolaridade, fumantes/não fumantes e hábitos alimentares e etílicos para identificar relações mais pontuais com essas características. Além disso, experimentos em modelos animais, *knockout* e *knockdown*, poderiam ser uma alternativa para verificação da funcionalidade desses genes na OBM, assim como

outros marcadores poderiam ser levados em conta, a fim de cobrir uma maior parcela dos genes selecionados.

Assim sendo, dado o aqui exposto e considerando-se a elevada/crescente prevalência da OBM, seria interessante dar continuidade ao estudo de possíveis genes associados à doença, visando a uma melhor compreensão da sua fisiopatologia e implicações diagnósticas e terapêuticas.

Conclusão

A OBM tornou-se uma condição de alta prevalência na população, de incidência crescente, que acarreta onerosos custos sociais e econômicos. De origem multifatorial, a combinação de fatores ambientais e genéticos contribui para o desenvolvimento da doença. Apesar da forte influência ambiental, as variáveis genéticas são responsáveis em grande parte pelas variações fenotípicas apresentadas na OBM.

Até onde se sabe, este trabalho foi o primeiro a avaliar polimorfismos dos genes *FOXO3a*, *AMPK* e *POMC* em condições de OBM, contribuindo para melhor entendimento da genética desta doença. Em síntese, os quatro dos dez marcadores avaliados neste estudo (*rs1536057* para *FOXO3a*, *rs1036851* para *AMPK*, *rs934778* e *rs6545975* para *POMC*) apresentaram, inicialmente, relação com a susceptibilidade à OBM, que não se confirmou após os testes das 1000 permutações.

Referências bibliográficas

Ahn YJ, Kim H, Lim H, Lee M, Kang Y, Moon S, et al. AMP-activated protein kinase: implications on ischemic diseases. *BMB Rep* 2012 Sep;45(9):489-95.

Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008 Nov 7;322(5903):881-8.

Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004 Mar 26;279(13):12005-8.

Anselmi CV, Malovini A, Roncarati R, Novelli V, Villa F, Condorelli G, et al. Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study. *Rejuvenation Res* 2009 Apr;12(2):95-104.

Arden KC, Biggs WH, III. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch Biochem Biophys* 2002 Jul 15;403(2):292-8.

Banasik K, Ribel-Madsen R, Gjesing AP, Wegner L, Andersson A, Poulsen P, et al. The FOXO3A rs2802292 G-allele associates with improved peripheral and hepatic insulin sensitivity and increased skeletal muscle-FOXO3A mRNA expression in twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Jan;96(1):E119-E124.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. *Haploview*: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005 Jan 15;21(2):263-5.

Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 2002 Aug;3(8):589-600.

Bateson W. *Mendel's Principles of Heredity*. Cambridge University Press, Cambridge. 1909.

Beiguelman B. *Genética de populações humanas*. Ribeirão Preto:Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 239 p.

Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 2005 Mar;6(3):221-34.

Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (*Forkhead* box, class O) subfamily of *Forkhead* transcription factors. *Biochem Soc Trans* 2003 Feb;31(Pt 1):292-7.

Bland JM, Altman DG. Statistics notes. The odds ratio. *BMJ* 2000 May 27;320(7247):1468.

Bouchard C. Genetics of human obesity: recent results from linkage studies. *J Nutr* 1997 Sep;127(9):1887S-90S.

Brosens JJ, Wilson MS, Lam EW. FOXO transcription factors: from cell fate decisions to regulation of human female reproduction. *Adv Exp Med Biol* 2009;665:227-41.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a *Forkhead* transcription factor. *Cell* 1999 Mar 19;96(6):857-68.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000 Sep 22;289(5487):2122-5.

Butler AA, Cone RD. Knockout studies defining different roles for melanocortin receptors in energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 2003 Jun;994:240-5.

Cai G, Cole SA, Bastarrachea RA, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG. Quantitative trait locus determining dietary macronutrient intakes is located on human chromosome 2p22. *Am J Clin Nutr* 2004 Nov;80(5):1410-4.

Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene* 2008 Apr 7;27(16):2276-88.

Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, et al. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1997 Apr 1;145(7):614-9.

Carlsson B, Lindell K, Gabrielsson B, Karlsson C, Bjarnason R, Westphal O, et al. Obese (*ob*) gene defects are rare in human obesity. *Obes Res* 1997 Jan;5(1):30-5.

Cavalli SA, Otta MI, Hirata RDC, Nguyen NY, Hirata MH. Apolipoprotein E genotyping in Brazilian normocholesterolemic individuals. *Clin Chem* 1996;42:S298.

Chang SH, Beason TS, Hunleth JM, Colditz GA. A systematic review of body fat distribution and mortality in older people. *Maturitas* 2012;72:175-91.

Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 2009 May;101(5):251-62.

Chen Y, Snieder H, Wang X, Kaviya B, McCaffrey C, Spector TD, et al. Proopiomelanocortin gene variants are associated with serum leptin and body fat in a normal female population. *Eur J Hum Genet* 2005 Jun;13(6):772-80.

Chiacchiera F, Simone C. The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. *Cell Cycle* 2010 Mar 15;9(6):1091-6.

Chorev M, Carmel L. The function of introns. *Front Genet* 2012;3:55.

Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, et al. AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 2007 Aug;117(8):2325-36.

Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, et al. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest* 2001 Oct;108(8):1113-21.

Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahilly S. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Jun;89(6):2557-62.

Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, Mitchell BD, Mahaney MC, Dyer TD, et al. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nat Genet* 1997 Mar;15(3):273-6.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996 Feb 1;334(5):292-5.

Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet* 2009 Jun;10(6):392-404.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001 Aug;50(8):1714-9.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005 Mar 22;111(11):1448-54.

Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010. ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 3.ed. Itapevi, SP:AC Farmacêutica, 2009.

Droge W, Kinscherf R. Aberrant insulin receptor signaling and amino acid homeostasis as a major cause of oxidative stress in aging. *Antioxid Redox Signal* 2008 Apr;10(4):661-78.

Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 2008;66(2):87-98.

Dzamko N, van Denderen BJ, Hevener AL, Jorgensen SB, Honeyman J, Galic S, et al. AMPK beta1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. *J Biol Chem* 2010 Jan 1;285(1):115-22.

Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013 Jan 17;14(2):83-97.

Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S, et al. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes* 2006 Sep;55(9):2549-53.

Farooqi S, Rau H, Whitehead J, O'Rahilly S. ob gene mutations and human obesity. *Proc Nutr Soc* 1998 Aug;57(3):471-5.

Fausto B. História do Brasil. São Paulo: Edusp, 1999.

Fisher RA. The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans. R. Soc. Edinburgh* 1918;52: 399-433.

Folsom AR, Prineas RJ, Kaye SA, Munger RG. Incidence of hypertension and stroke in relation to body fat distribution and other risk factors in older women. *Stroke* 1990 May;21(5):701-6.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002 Jun 21;296(5576):2225-9.

Garrido Júnior AB, Barroso FL, Marchesini JB, Szegő T. *Cirurgia da obesidade*. São Paulo: Atheneu. 2002.

Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid Redox Signal* 2005 Jul;7(7-8):1021-31.

Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, et al. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem* 2007 Oct 12;282(41):30107-19.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT, Miller JH. *Introdução à Genética*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. xviii, 743 p.

Hagan MM, Rushing PA, Schwartz MW, Yagaloff KA, Burn P, Woods SC, et al. Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J Neurosci* 1999 Mar 15;19(6):2362-7.

Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, et al. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 1998 Nov;20(3):304-8.

Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 2003 Feb 12;19(3):376-82.

HapMap (*International HapMap Project*). Disponível no endereço eletrônico <<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

Hardie DG. AMP-activated protein kinase: the guardian of cardiac energy status. *J Clin Invest* 2004 Aug;114(4):465-8.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 Apr;13(4):251-62.

Haworth CM, Plomin R, Carnell S, Wardle J. Childhood obesity: genetic and environmental overlap with normal-range BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2008 Jul;16(7):1585-90.

Hoh J, Ott J. Genetic dissection of diseases: design and methods. *Curr Opin Genet Dev* 2004 Jun;14(3):229-32.

Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007 Aug 1;120(Pt 15):2479-87.

Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* 2003 Sep 19;278(38):35959-67.

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006 Dec 14;444(7121):840-6.

Katzmarzyk PT, Reeder BA, Elliott S, Joffres MR, Pahwa P, Raine KD, et al. Body mass index and risk of cardiovascular disease, cancer and all-cause mortality. *Can J Public Health* 2012 Mar;103(2):147-51.

Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1953 Jan 15;140(901):578-96.

Kim JR, Jung HS, Bae SW, Kim JH, Park BL, Choi YH, et al. Polymorphisms in FOXO gene family and association analysis with BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2006 Feb;14(2):188-93.

Kojima T, Norose T, Tsuchiya K, Sakamoto K. Mouse 3T3-L1 cells acquire resistance against oxidative stress as the adipocytes differentiate via the transcription factor FoxO. *Apoptosis* 2010 Jan;15(1):83-93.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000 Apr 6;404(6778):635-43.

Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, et al. *Forkhead* transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002 Sep 19;419(6904):316-21.

Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998 Jun;19(2):155-7.

Krude H, Biebermann H, Gruters A. Mutations in the human proopiomelanocortin gene. *Ann N Y Acad Sci* 2003 Jun;994:233-9.

Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991 Oct 11;19(19):5444.

Lee M, Kim A, Chua SC, Jr., Obici S, Wardlaw SL. Transgenic MSH overexpression attenuates the metabolic effects of a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 Jul;293(1):E121-E131.

Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, et al. Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Dec;25(12):2488-94.

Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2005 Feb;26(2):69-76.

Magno LA, Santana CV, Sacramento EK, Rezende VB, Cardoso MV, Mauricio-da-Silva L, et al. Genetic variations in FOXO3A are associated with Bipolar Disorder without conferring vulnerability for suicidal behavior. *J Affect Disord* 2011 Oct;133(3):633-7.

Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. "Sly as a FOXO": new paths with *Forkhead* signaling in the brain. *Curr Neurovasc Res* 2007 Nov;4(4):295-302.

Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. OutFOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol Med* 2008 May;14(5):219-27.

Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 2006 Jul 14;281(28):18933-41.

Matsumoto M, Poci A, Rossetti L, Depinho RA, Accili D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the *forkhead* transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab* 2007 Sep;6(3):208-16.

Meyre D, Lecoecur C, Delplanque J, Francke S, Vatin V, Durand E, et al. A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-q23.2. *Diabetes* 2004 Mar;53(3):803-11.

Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 2011 Sep;13(9):1016-23.

Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)* 2007;4:18.

Ministério da Saúde. Quase metade da população brasileira está acima do peso. Online. Disponível no endereço eletrônico <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4821/785/quase-metade-da-populacao-brasileira-esta-acima-do-peso.html>>. Acessado em 16 de dezembro de 2012.

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004 Apr 1;428(6982):569-74.

Misra A, Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition* 2003 May;19(5):457-66.

Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 1998 Feb;47(2):294-7.

Mizuno TM, Kelley KA, Pasinetti GM, Roberts JL, Mobbs CV. Transgenic neuronal expression of proopiomelanocortin attenuates hyperphagic response to fasting and reverses metabolic impairments in leptin-deficient obese mice. *Diabetes* 2003 Nov;52(11):2675-83.

Moll L, Schubert M. The Role of Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1/FoxO-Mediated Transcription for the Pathogenesis of Obesity-Associated Dementia. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2012;2012:384094.

Moore F, Weekes J, Hardie DG. Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem* 1991 Aug 1;199(3):691-7.

Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol* 2006 Jul 21;241(2):252-61.

Moore JH. Detecting, characterizing, and interpreting nonlinear gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Adv Genet* 2010;72:101-16.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006 Sep 21;443(7109):289-95.

Nakashima K, Yakabe Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007 Jul;71(7):1650-6.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001 Jan;409:194-8.

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Disponível no endereço eletrônico <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>.

Negrão AB. Variantes genéticas de risco para a dependência de crack/ cocaína: estudo de associação do tipo gene candidato e epistasia. 2012. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of *forkhead* proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 2002 Mar 29;295(5564):2450-2.

Ortiz MT, Taras L, Stavroulakis AM. The Hardy-Weinberg Equilibrium-Some Helpful Suggestions. *Am Biol Teach* 2000 Jan;62(1):20-2.

Pena SD, Di PG, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FS, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6(2):e17063.

Pereira-Lancha LO, Campos-Ferraz PL, Lancha AH, Jr. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2012;5:75-87.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003 May 29;423(6939):550-5.

Qin W, Zhao W, Ho L, Wang J, Walsh K, Gandy S, et al. Regulation of *forkhead* transcription factor FoxO3a contributes to calorie restriction-induced prevention of Alzheimer's disease-type amyloid neuropathology and spatial memory deterioration. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Dec;1147:335-47.

Ramos AV. A Contribuição dos polimorfismos (SNPs) do FTO e UCP-1 com a obesidade extrema e fatores de risco cardiovascular em indivíduos brasileiros. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Molecular). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Ramamurthy S, Ronnett G. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Energy-Sensing in the Brain. *Exp Neurobiol* 2012 Jun;21(2):52-60.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* (Silver Spring) 2006 Apr;14(4):529-644.

Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA* 1998 Dec 2;280(21):1843-8.

Ritchie MD. Using biological knowledge to uncover the mystery in the search for epistasis in genome-wide association studies. *Ann Hum Genet* 2011 Jan;75(1):172-82.

Rumel D. The "odds ratio": various considerations. *Rev Saude Publica* 1986 Jun;20(3):253-8.

Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002 Dec;16(4):623-37.

Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998 Aug;44(8 Pt 1):1748-50.

Santo MA, Cecconello I. Obesidade mórbida: controle dos riscos. *Arq Gastroenterol* 2008 Jan/Mar;45(1):1-2.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000 Apr 6;404(6778):661-71.

Schwartz MW, Porte D, Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 2005 Jan 21;307(5708):375-9.

Sikaris KA. The clinical biochemistry of obesity-more than skin deep. *Heart Lung Circ* 2007;16 Suppl 3:S45-S50.

Smart JL, Tolle V, Low MJ. Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J Clin Invest* 2006 Feb;116(2):495-505.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias: Detecção - Avaliação - Tratamento. Arq Bras Cardiol 1996;67:113-28.

Sorensen TI, Price RA, Stunkard AJ, Schulsinger F. Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. BMJ 1989 Jan 14;298(6666):87-90.

Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. Nat Genet 2010 Nov;42(11):937-48.

Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. Cell 2001 Feb 23;104(4):531-43.

Stahmann N, Woods A, Carling D, Heller R. Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. Mol Cell Biol 2006 Aug;26(16):5933-45.

Stram DO. Tag SNP selection for association studies. Genet Epidemiol 2004 Dec;27(4):365-74.

Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. N Engl J Med 1990 May 24;322(21):1483-7.

Sun MW, Lee JY, de Bakker PI, Burt NP, Almgren P, Rastam L, et al. Haplotype structures and large-scale association testing of the 5' AMP-activated protein kinase genes PRKAA2, PRKAB1, and PRKAB2 with type 2 diabetes. Diabetes 2006 Mar;55(3):849-55.

Sutton BS, Langefeld CD, Williams AH, Norris JM, Saad MF, Haffner SM, et al. Association of proopiomelanocortin gene polymorphisms with obesity in the IRAS family study. Obes Res 2005 Sep;13(9):1491-8.

Swinburn BA, Jolley D, Kremer PJ, Salbe AD, Ravussin E. Estimating the effects of energy imbalance on changes in body weight in children. Am J Clin Nutr 2006 Apr;83(4):859-63.

Tamas P, Hawley SA, Clarke RG, Mustard KJ, Green K, Hardie DG, et al. Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca²⁺ in T lymphocytes. *J Exp Med* 2006 Jul 10;203(7):1665-70.

Ternouth A, Brandys MK, van der Schouw YT, Hendriks J, Jansson JO, Collier D, et al. Association study of POMC variants with body composition measures and nutrient choice. *Eur J Pharmacol* 2011 Jun 11;660(1):220-5.

The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nat* 2005 Oct 27;437:1299-320.

Thornton C, Sardini A, Carling D. Muscarinic receptor activation of AMP-activated protein kinase inhibits orexigenic neuropeptide mRNA expression. *J Biol Chem* 2008 Jun 20;283(25):17116-22.

Trayhurn P. The biology of obesity. *Proc Nutr Soc* 2005 Feb;64(1):31-8.

Velloso LA. The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006 Apr;50(2):165-76.

Viollet B, Andreelli F. AMP-activated protein kinase and metabolic control. *Handb Exp Pharmacol* 2011;(203):303-30.

Vogler GP, Sorensen TI, Stunkard AJ, Srinivasan MR, Rao DC. Influences of genes and shared family environment on adult body mass index assessed in an adoption study by a comprehensive path model. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995 Jan;19(1):40-5.

Wang F, Nguyen M, Qin FX, Tong Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* 2007 Aug;6(4):505-14.

Wang F, Gelernter J, Kranzler HR, Zhang H. Identification of POMC exonic variants associated with substance dependence and body mass index. *PLoS One* 2012;7(9):e45300.

Wardlaw SL. Clinical review 127: Obesity as a neuroendocrine disease: lessons to be learned from proopiomelanocortin and melanocortin receptor mutations in mice and men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Apr;86(4):1442-6.

Weaver JU, Kopelman PG, McLoughlin L, Forsling ML, Grossman A. Hyperactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in obesity: a study of ACTH, AVP, beta-lipotrophin and cortisol responses to insulin-induced hypoglycaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993 Sep;39(3):345-50.

Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 1989 May 19;57(4):645-58.

World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível no endereço eletrônico <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acessado em 16 de dezembro de 2012.

Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 2001 Nov;74(4-5):683-701.

Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005 Jun;76(6):967-86.

Yang JY, Hung MC. Deciphering the role of *forkhead* transcription factors in cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2011 Aug;12(9):1284-90.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 1999 Sep;5(9):1066-70.

Yeo GS, Farooqi IS, Challis BG, Jackson RS, O'Rahilly S. The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models. *QJM* 2000 Jan;93(1):7-14.

Yeo GS, Heisler LK. Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat Neurosci* 2012 Oct;15(10):1343-9.

Yu C, Zhang S, Zhou C, Sile S. A likelihood ratio test of population Hardy-Weinberg equilibrium for case-control studies. *Genet Epidemiol* 2009 Apr;33(3):275-80.

Zabel BU, Naylor SL, Sakaguchi AY, Bell GI, Shows TB. High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Nov;80(22):6932-6.

Zeltser LM, Seeley RJ, Tschop MH. Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nat Neurosci* 2012 Oct;15(10):1336-42.

Zemva J, Schilbach K, Stohr O, Moll L, Franko A, Krone W, et al. Central FoxO3a and FoxO6 expression is down-regulated in obesity induced diabetes but not in aging. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012 Jun;120(6):340-50.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.

Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol* 2008 Jul;61(7):634-45.

Zintzaras E. Impact of Hardy-Weinberg equilibrium deviation on allele-based risk effect of genetic association studies and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2010 Ago;25(8):553-60.

Glossário

Desequilíbrio de ligação (LD): descreve uma situação em que algumas combinações de alelos ocorrem mais ou menos frequentes numa população do que seria esperado. Por exemplo, regiões cromossômicas muito próximas apresentam um grau de recombinação diminuto, dando margem à maior frequência de combinações não randômicas observadas nos haplótipos. Isto implica dizer que alelos em LD migram juntos na divisão celular (Ramos, 2011; Griffiths, 2008).

Epistasia: existem dois conceitos de epistasia postulados por diferentes pontos de vista: a epistasia biológica e a estatística. O primeiro deles foi introduzido por Bateson (1909) para explicar distorções da segregação mendeliana resultantes da interação entre biomoléculas (DNA, RNA, proteínas, etc.) a nível celular e individual (Bateson, 1909). O segundo conceito é apresentado por Fisher (1918) numa perspectiva estatística. Este tipo de epistasia ocorre a nível populacional e permite mensurar o quanto os fenótipos observados diferem dos fenótipos esperados pela ação dos genes em conjunto (Fisher, 1918). Atualmente, o conceito amplamente divulgado consiste na epistasia como uma modalidade de interação gênica, na qual o alelo de um *loci*, dito epistático, influencia na expressão de outro, hipostático, mascarando ou inibindo a expressão fenotípica deste último (Griffiths, 2008).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW): O EHW postula que, em uma população, na ausência de fatores evolutivos, as frequências gênicas permanecerão constantes e as proporções genotípicas atingirão um equilíbrio estável ao longo das gerações. As condições necessárias para a manutenção do EHW são: população grande e igualmente fértil, casamentos aleatórios, ausência de seleção natural, deriva genética, migração e mutação gerando novos alelos (Griffiths, 2008).

Haplótipos: são combinações particulares de alelos em dois ou mais loci, não necessariamente no mesmo cromossomo, que consistem em regiões herdadas sem recombinações substanciais ($< 0,05$) ao longo das gerações (Gabriel *et al.*, 2002).

MDR (*Multifactor Dimensionality Reduction*): *software* desenvolvido por Moore e colaboradores (2006), que se vale de um método de redução de complexidade dos dados (Cordell, 2009), com o objetivo de detectar, caracterizar e interpretar a

epistasia. O algoritmo do MDR realiza duas operações básicas (Hahn et al., 2003): cria modelos de interação por meio da redução das dimensões genóticas para uma única dimensão de alto/baixo risco e determina o modelo que exercerá a melhor predição para identificação dos casos através da validação cruzada (CV, cross-validation). Esta consiste em um conjunto de medidas para diagnosticar o desempenho de um determinado modelo, selecionando, dentre uma lista disponível, aquele mais adequado. Os critérios adotados na seleção do melhor modelo estão baseados nos valores máximos da consistência obtida na validação cruzada e do erro preditivo (acurácia) (Negrão, 2012). Mais detalhadamente, o MDR divide a amostra em 10 partes. Destas, 9/10 são utilizadas para redução das dimensões genóticas e a validação cruzada vai avaliar o desempenho preditivo com o 1/10 amostral restante. A CV gera duas medidas de avaliação do modelo: a acurácia e a consistência da validação cruzada. A primeira estima a média de todos os intervalos da CV e representa o erro preditivo do teste. Um modelo considerado interessante deve ter uma acurácia de, pelo menos, 0,55. Valores acima de 0,60 quase sempre possuem significância estatística e, normalmente, a acurácia não ultrapassa 0,70. A segunda é uma medida do número de vezes em que o modelo gerado pelo algoritmo é identificado em cada uma das 10 partes possíveis contendo 9/10 da amostra. Portanto, o valor máximo da consistência é de 10 em 10 (10/ 10) (Hahn *et al.*, 2003; Moore, 2010; Ritchie, 2011; Negrão, 2012).

tagSNP: representa polimorfismos de base única (SNPs) em uma região cromossômica com alto desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *linkage disequilibrium*), isto é, os SNPs desta região estão fortemente ligados, permanecendo juntos na divisão celular, em contradição com a Segunda Lei de Mendel, da segregação independente dos genes. Portanto, ao se estudar um *tagSNP* é possível contemplar todos os polimorfismos desta região, sem a necessidade de genotipar os SNPs separadamente (Stram, 2004).

Odds ratio (OR): medida de associação utilizada em estudos caso-controle para determinar em quantas vezes a prevalência do evento de interesse nos casos é maior que nos controles (Rumel, 1986; Bland & Altman, 2000). Neste caso, a OR

permite identificar uma possível relação causal entre o fator avaliado (neste estudo, o SNP) e a doença.

Regiões não traduzidas (UTRs): localizadas nas extremidades 3' e 5' do DNA, as UTRs exercem um papel fundamental no controle da expressão gênica. Elas regulam a síntese proteica através de mecanismos tais como alteração da estabilidade do RNA mensageiro, acessibilidade aos ribossomos e interação com a maquinaria de tradução. Com efeito, tal como em outras posições do gene, alterações genéticas nas UTRs podem alterar a função das proteínas e, desta forma, contribuir em processos patológicos, a exemplo do câncer de mama, Alzheimer, transtorno bipolar, disfunções cardíacas e imunológicas (revisado por Chatterjee & Pal, 2009).

Anexos



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE MESTRADO DE CINTHIA VILA NOVA SANTANA, n.º de registro 2011663959. No dia **dezoito de fevereiro de Dois mil e Treze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES FOXO3A, AMPK E POMC E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE MÓRBIDA”**; requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Marco Aurélio Romano Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marco Aurélio Romano Silva / orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof.ª Luciana Bastos Rodrigues	Instituição UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof.ª Débora Marques de Miranda	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2013.

Prof. Marco Aurélio Romano Silva / orientador [Assinatura]
Prof.ª Luciana Bastos Rodrigues [Assinatura]
Prof.ª Débora Marques de Miranda [Assinatura]

Prof.ª Débora Marques de Miranda / Sub-coordenadora [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof.ª Débora Marques de Miranda
Subcoordenação do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores: Prof. Marco Aurélio Romano Silva / orientador, Prof.^a Luciana Bastos Rodrigues, Prof.^a Débora Marques de Miranda - membros titulares, aprovou a defesa Dissertação de Mestrado de **CINTHIA VILA NOVA SANTANA**. A Dissertação foi intitulada: “**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES FOXO3A, AMPK E POMC E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE MÓRBIDA.**”; estando à mesma apta à obtenção do título de Mestrado em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2013.

Prof. Marco Aurélio Romano Silva / orientador

Prof.^a Luciana Bastos Rodrigues

Prof.^a Débora Marques de Miranda