

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAYZA DALCIN TEIXEIRA

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *FTO*, *ABCA1*,
ABCA7 E *ABCG1* COM MARCADORES DE OBESIDADE E PERFIL LIPÍDICO EM
MULHERES OBESAS

CURITIBA
2017

MAYZA DALCIN TEIXEIRA

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *FTO*, *ABCA1*,
ABCA7 E *ABCG1* COM MARCADORES DE OBESIDADE E PERFIL LIPÍDICO EM
MULHERES OBESAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lupe Furtado-Alle

Coorientadora: Dr^a Luciane Viater Tureck

CURITIBA
2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de mestrado de MAYZA DALCIN TEIXEIRA, intitulada: “Estudo da associação de polimorfismos dos genes *FTO*, *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* com marcadores de obesidade e perfil lipídico em mulheres obesas”, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVADA.

Curitiba, 31 de março de 2017


Doutora Jaqueline Carvalho de Oliveira
Membro Titular


Doutora Meire Silva Batistela
Membro Titular


Doutora Lupe Furtado Alle
Presidente

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Paulo e Auria, a quem dedico este trabalho. Me ensinam tanto, me incentivam a seguir meus sonhos, me mostraram o melhor caminho e sempre acreditaram em mim. Obrigada por sempre me apoiarem e darem todo o tipo de suporte que precisei. Meu irmão Leonardo que, do seu jeito, também sempre me incentivou, obrigada pela parceria! Agradeço também os demais familiares, em especial meu nono Nelson e minha nona Iva, por sempre se orgulharem das conquistas dos netos.

Agradeço a minha fiel companheira de laboratório Gabrielle, pela paciência e por tantos ensinamentos. Por me aguentar nos fins de semana, com as dúvidas mais básicas. Essa dissertação não seria a mesma sem você na minha vida. Da mesma forma, agradeço a minha co-orientadora Luciane, por toda amizade, paciência e exigência! Com certeza cresci muito cientificamente e este trabalho se deve a toda a ajuda que você me deu. Serei grata eternamente! Às demais amigas do Laboratório de Polimorfismos, em especial a Carla, Meire, Mabi, Sari e Nicoli, obrigada por todos os momentos de descontração e pela amizade. Aos demais amigos que fiz em Curitiba, principalmente a Carolini e a Érika, que me deram um lar sem nem me conhecer! Vou levar vocês para sempre no meu coração! E ao Eduardo que me tranquilizou nos momentos mais tensos, me incentivou, me fez pensar diferente e sempre acreditou na minha capacidade. Obrigada!

Agradeço a minha orientadora, Lupe, pela confiança e pela oportunidade de mostrar o meu potencial ao me aceitar como orientada. Além disso, agradeço também pela oportunidade de aprendizagem que tive nesses dois anos.

E, por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade e à CAPES pelo apoio financeiro para desenvolver este trabalho e possibilitar a realização deste sonho.

“A compreensão humana não é um exame desinteressado, mas recebe infusões da vontade e dos afetos; disso se originam as ciências que podem ser chamadas de “ciências conforme as nossas vontades”. Pois um homem acredita mais facilmente no que gostaria que fosse verdade. Assim, ele rejeita coisas difíceis pela impaciência de pesquisar; coisas sensatas, porque diminuem a esperança; as coisas mais profundas da natureza, por superstição; a luz da experiência, por arrogância e orgulho; coisas que não são comumente aceitas, por deferência a opinião do vulgo. Em suma, inúmeras são as maneiras, e as vezes imperceptíveis, pelas quais os afetos colorem e contaminam o entendimento.”

Francis Bacon, *Novum organon* (1620)

RESUMO

A maioria dos casos de obesidade e de dislipidemias possui origem complexa, pois é resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais. Diversos genes têm sido relacionados com a susceptibilidade a estas doenças, incluindo variantes alélicas dos genes *FTO*, *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1*. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi verificar se há influência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) destes genes em variáveis relacionadas à obesidade e ao perfil lipídico em mulheres obesas e avaliar o efeito destes SNPs na mudança destas variáveis em resposta a uma dieta de restrição calórica. Para isso, foi coletado sangue de 211 mulheres obesas para análises bioquímicas (níveis de triglicerídeos – TG, colesterol total – CT, HDL-c, LDL-c e VLDL) e genótípicas, além de medidas antropométricas (índice de massa corporal – IMC, circunferência da cintura – CC, e circunferência abdominal – CA), antes e depois de uma dieta com redução de 600Kcal por dia. As amostras foram genotipadas por ensaio de discriminação alélica TaqMan® e posteriormente foram feitas análises estatísticas. Como resultado, as mulheres portadoras do alelo A do SNP rs9939609 (*FTO*) apresentaram uma menor redução de CA e maior redução dos níveis de HDL-c em resposta à dieta. As portadoras do alelo A do SNP rs1800977 (*ABCA1*) perderam menos IMC após a intervenção do que as não portadoras. As portadoras do genótipo TT do SNP rs2230806 (*ABCA1*) reduziram mais seus níveis de CT em resposta a dieta do que as portadoras do genótipo GG. Além disso, o alelo T foi mais frequente que o alelo C no grupo de mulheres com níveis de HDL-c maiores e níveis de LDL-c menores. As portadoras do genótipo GG do SNP rs2279796 (*ABCA7*) apresentaram níveis de CT e LDL-c maiores. Além disso, o alelo G foi mais frequente no grupo de mulheres com nível de CT e LDL-c maiores. Na resposta a intervenção dietética, as portadoras do genótipo GG aumentaram os níveis de TG e VLDL. As portadoras do alelo G do SNP rs692383 (*ABCG1*) apresentaram IMC maior, menor redução da CA em resposta a dieta e, em contrapartida, níveis de TG e VLDL menores e uma redução menor nos níveis de HDL-c. As portadoras do alelo A do SNP rs3827225 (*ABCG1*) tiveram uma maior redução de CA que as não portadoras, porém apresentaram um aumento maior nos níveis de LDL-c após a intervenção dietética. Esses resultados são indicativos de que possivelmente o alelo T do SNP rs2230806 (*ABCA1*) está associado com o efeito de proteção contra doenças cardiovasculares, pelos seus efeitos nos níveis de lipídeos séricos. Outrossim, o alelo G do SNP rs2279796 (*ABCA7*) pode estar conferindo um risco para doenças cardiovasculares, assim como o alelo A do SNP rs9939609 (*FTO*) sobre uma maior dificuldade em reduzir a CA e pela maior perda de HDL-c.

Palavras-chave: Obesidade. Mulheres obesas. Intervenção dietética. Perfil lipídico. Gene *FTO*. Transportadores ABC. Estudo de associação.

ABSTRACT

Obesity and dyslipidemias, in the majority of cases, have complex origin, as they result from the interaction between genetic and environmental factors. Many genes have been related to the susceptibility for these diseases, including *FTO*, *ABCA1*, *ABCA7* and *ABCG1* gene variants. Thus, the aim of this study was to verify if single nucleotide polymorphisms (SNPs) of these genes influence variables related to obesity and lipid profile in obese women and evaluate the effect of these SNPs in the variation of the variables in response to a calorie restriction diet. Thereunto, blood of 211 obese women was collected for biochemical (triglycerides – TG, total cholesterol – TC, HDL-c, LDL-c and VLDL levels) and genotypic analyses, besides anthropometric measures (body mass index – BMI, waist circumference – WC and abdominal circumference – AC), before and after a dietetic intervention with reduction of 600kcal per day. The samples were genotyped by allelic discrimination assay TaqMan® and analyzed statistically. As result, women carrying rs9939609 SNP (*FTO*) allele A had a lower AC reduction and a greater reduction of HDL-c levels in response to diet. A allele carriers of rs1800977 SNP (*ABCA1*) lost less BMI after intervention than non-carriers. TT genotype carriers of rs2230806 SNP (*ABCA1*) reduced more their TC levels than GG genotype carriers in response to diet. In addition, the T allele was more frequent than C allele in the group of women with higher HDL-c levels and lower LDL-c levels. GG genotype carriers of rs2279796 SNP (*ABCA7*) had higher TC and LDL-c levels. In addition, the G allele was more frequent in the group of women with higher TC and LDL-c levels. In response to dietary intervention, GG genotype carriers increased TG and VLDL levels. G allele carriers of rs692383 SNP (*ABCG1*) had higher BMI and lower AC reduction in response to diet but, on the other hand, lower TG and VLDL levels and a lower reduction in HDL-c levels. A allele carriers of SNP rs3827225 SNP (*ABCG1*) had a greater reduction in AC than non-carriers, but they had a higher increase in LDL-c levels after dietary intervention. These results are indicative that possibly T allele of rs2230806 SNP (*ABCA1*) is associated with the protective effect against cardiovascular diseases by their effects on serum lipid levels. In addition, the G allele of rs2279796 SNP (*ABCA7*) possibly is conferring a risk for cardiovascular diseases, as well as the A allele of rs9939609 SNP (*FTO*) on a greater difficulty in reducing AC and the greater loss of HDL-c.

Keywords: Obesity. Obese women. Dietetic intervention. Lipid profile. *FTO* gene. ABC transporters. Association study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– ATIVAÇÃO DA LIPASE NO PROCESSO DE HIDRÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS.....	20
FIGURA 2	– METABOLISMO DOS LIPÍDEOS A PARTIR DE BIOMOLÉCULAS PROVENIENTES DA DIETA.....	23
GRÁFICO 1	– PREVALÊNCIA (%) DE EXCESSO DE PESO E OBESIDADE POR SEXO NO BRASIL.....	25
FIGURA 3	– LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GENE <i>FTO</i>	29
GRÁFICO 2	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS9939606 DO GENE <i>FTO</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	30
FIGURA 4	– LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GENE <i>ABCA1</i>	32
GRÁFICO 3	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS1800977 DO GENE <i>ABCA1</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	32
GRÁFICO 4	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS2230806 DO GENE <i>ABCA1</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	33
FIGURA 5	– LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GENE <i>ABCA7</i>	34
GRÁFICO 5	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS2279796 DO GENE <i>ABCA7</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	34
FIGURA 6	– LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GENE <i>ABCG1</i>	35
GRÁFICO 6	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS692383 DO GENE <i>ABCG1</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	36
GRÁFICO 7	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS3827225 DO GENE <i>ABCG1</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	36
GRÁFICO 8	– CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DO RISCO REPRESENTADO PELA PRESENÇA DO ALELO A DO SNP RS9939609 DO GENE <i>FTO</i> E DA VARIAÇÃO DE IMC NA DIMINUIÇÃO DE CA ABAIXO DA MEDIANA E NA DIMINUIÇÃO DE HDL-C ACIMA DA MEDIANA.....	52

- GRÁFICO 9 – CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS PARA O SNP RS2279796 DO –GENE ABCA7 E DOS VALORES DE IMC NO CT ANTES E NO CT DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....70
- GRÁFICO 10 – CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS PARA O SNP RS2279796 DO GENE ABCA7 E DOS VALORES DE IMC NO LDL-C ANTES E NO LDL-C DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....71

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	– CLASSIFICAÇÃO DA OBESIDADE EM ADULTOS DE ACORDO COM O IMC.....	26
QUADRO 2	– CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS DISLIPIDEMIAS.....	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– PREVALÊNCIA DE DÉFICIT DE PESO, EXCESSO DE PESO E OBESIDADE NA POPULAÇÃO COM 20 ANOS OU MAIS NO BRASIL.....	25
TABELA 2	– CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (PCR).....	45
TABELA 3	– COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS DE ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	47
TABELA 4	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS9939609 DO GENE <i>FTO</i>	48
TABELA 5	– COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO RS9939609 DO GENE <i>FTO</i> NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	49
TABELA 6	– COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO RS9939609 DO GENE <i>FTO</i>	50
TABELA 7	– ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP RS9939609 DO GENE <i>FTO</i>	51
TABELA 8	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS1800977 DO GENE <i>ABCA1</i>	55
TABELA 9	– COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS1800977 DO GENE <i>ABCA1</i> NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	56
TABELA 10	– COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS1800977 DO GENE <i>ABCA1</i>	57
TABELA 11	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS2230806 DO GENE <i>ABCA1</i>	59

TABELA 12	– COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS CC, CT E TT DO SNP RS22308066 DO GENE <i>ABCA1</i> ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	60
TABELA 13	– COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS CC, CT E TT DO SNP RS2230806 DO GENE <i>ABCA1</i> DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	61
TABELA 14	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS2279796 DO GENE <i>ABCA7</i>	64
TABELA 15	– COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS AA, AG E GG DO SNP RS2279796 DO GENE <i>ABCA7</i> ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	66
TABELA 16	– COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS AA, AG E GG DO SNP RS2279796 DO GENE <i>ABCA7</i> DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	67
TABELA 17	– COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS AA, AG E GG DO SNP RS2279796 DO GENE <i>ABCA7</i>	68
TABELA 18	– ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP RS2279796 DO GENE <i>ABCA7</i>	69
TABELA 19	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS692383 DO GENE <i>ABCG1</i>	73
TABELA 20	– COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO G DO SNP rs692383 DO GENE <i>ABCG1</i> NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	75
TABELA 21	– COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO G DO SNP RS692383 DO GENE <i>ABCG1</i>	76

TABELA 22	– ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP RS692383 DO GENE <i>ABCG1</i>	78
TABELA 23	– FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS3827225 DO GENE <i>ABCG1</i>	79
TABELA 24	– COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS3827225 DO GENE <i>ABCG1</i> NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.....	80
TABELA 25	– COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS3827225 DO GENE <i>ABCG1</i>	81
TABELA 26	– ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP rs3827225 DO GENE <i>ABCG1</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	– Cassete de ligação ao ATP
ATP	– Adenosina Trifosfatada
CA	– Circunferência Abdominal
CC	– Circunferência da Cintura
CT	– Colesterol Total
FTO	– <i>Fat-mass and Obesity Associated</i>
GWAs	– <i>Genome-wide association studies</i>
HDL	– Lipoproteína de alta densidade
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDL	– Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	– Índice de Massa Corporal
LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
SE	– Erro Padrão
SD	– Desvio Padrão
SMet	– Síndrome Metabólica
SNP	– Polimorfismo de nucleotídeo único
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	– Triglicerídeos
VIGITEL	– Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	– Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Metabolismo dos Lipídeos	19
2.1.1	Triglicerídeos	19
2.1.2	Colesterol	21
2.1.3	Lipoproteínas	22
2.2	Obesidade e Dislipidemias	24
2.2.1	Aterosclerose	28
2.3	Obesidade e Dislipidemias: polimorfismos em genes candidatos	29
2.3.1	Gene <i>FTO</i>	29
2.3.2	Gene <i>ABCA1</i>	31
2.3.3	Gene <i>ABCA7</i>	33
2.3.4	Gene <i>ABCG1</i>	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Delineamento do Estudo	38
4.2	Caracterização da Amostra	38
4.3	Intervenção Dietética	39
4.3.1	Pré-intervenção	39
4.3.2	Intervenção	39
4.3.3	Pós-intervenção	42
4.4	Variáveis Analisadas	42
4.4.1	Variáveis antropométricas	42

4.4.2 Variáveis Bioquímicas	42
4.5 Investigação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)	43
4.5.1 Obtenção do DNA das amostras	43
4.5.2 Escolha dos polimorfismos	43
4.5.3 Análises moleculares para identificação genotípica	44
4.6 Organização e delineamento das análises	45
4.7 Análises Estatísticas	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Análise descritiva e efeito da intervenção dietética	47
5.2 Polimorfismo rs9939609 do gene <i>FTO</i>	48
5.3 Polimorfismo rs1800977 do gene <i>ABCA1</i>	54
5.4 Polimorfismo rs2230806 do gene <i>ABCA1</i>	58
5.5 Polimorfismo rs2279796 do gene <i>ABCA7</i>	64
5.6 Polimorfismo rs692383 do gene <i>ABCG1</i>	73
5.7 Polimorfismo rs3827225 do gene <i>ABCG1</i>	79
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXO	89
APÊNDICE	91

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é, frequentemente, uma doença de origem complexa, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, caracterizada pelo depósito excessivo de gordura corporal, devido, principalmente, ao desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia (HENI *et al.*, 2014). O índice de massa corporal (IMC) é o método mais utilizado para seu diagnóstico (WHO, 2015).

Diversos genes e variantes alélicas específicas têm sido relacionadas com a susceptibilidade à obesidade, entre essas, variantes do gene *FTO* (*fat-mass and obesity associated*) já foram associadas ao aumento de peso (QI *et al.*, 2008). Sabe-se pouco sobre o papel fisiológico do produto codificado por esse gene, mas sua semelhança com a enzima AlkB de *Escherichia coli* sugere que a proteína FTO atua como agente desmetilante de DNA (FAWCETT *et al.*, 2010). Neste sentido, FTO pode estar regulando a expressão de genes envolvidos no metabolismo, e uma desregulação nesse processo pode levar à obesidade.

A obesidade pode desencadear um desequilíbrio no metabolismo energético, levando ao desenvolvimento da resistência insulínica, intolerância à glicose e dislipidemias (MARCELIN & CHUA, 2010). As dislipidemias são caracterizadas por níveis anormais de lipoproteínas, e constituem importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares (XAVIER *et al.*, 2013). Frequentemente, mas não necessariamente, as dislipidemias estão associadas a obesidade, sendo que sua etiologia também é na maioria das vezes complexa, existindo no entanto algumas formas de causa primariamente genética.

Neste contexto, fazem-se importantes os transportadores ABC (*ATP-Binding Cassete*), em especial ABCA1, ABCA7 e ABCG1, que são proteínas de membrana responsáveis por mediar o transporte dos lipídeos para dentro e para fora da célula (KAMINSKI *et al.*, 2000). Falhas no desempenho destes transportadores podem estar associadas a níveis plasmáticos anormais das lipoproteínas (LARGE *et al.*, 2004).

Diante da problemática apresentada, o objetivo deste trabalho é verificar em uma amostra de mulheres obesas a influência de variantes alélicas dos genes *FTO*, *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* nas variáveis antropométricas utilizadas como marcadores de obesidade, e nas variáveis bioquímicas utilizadas como indicadoras

do metabolismo lipídico, além de avaliar o efeito da possível interação entre essas variantes e um programa de intervenção dietética na mudança das variáveis analisadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo dos Lipídeos

Os lipídeos desempenham importantes funções no metabolismo, como a formação de depósitos energéticos, de membranas celulares, de cofatores, transportadores e hormônios (XAVIER et al., 2013). Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídeos mais importantes são os triglicerídeos (ou triacilglicerois) e o colesterol.

2.1.1 Triglicerídeos

Os triglicerídeos são formados por três moléculas de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol, constituindo a reserva energética mais importante do organismo, sendo depositada no tecido adiposo e muscular. Possuem duas origens: a dieta e a síntese *de novo*, que ocorre no fígado e no tecido adiposo. Da dieta são provenientes ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, enquanto que os sintetizados são compostos de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados que são metabolizados a partir de componentes da dieta, principalmente os carboidratos. Para que os triglicerídeos provenientes da dieta sejam absorvidos pelo intestino, precisam ser dispersos no formato de micelas, e isso ocorre através da ação dos sais biliares. Os sais biliares atuam metabolizando os triglicerídeos em mono ou diacilglicerois, ou ainda em ácidos graxos e glicerol livres. Essa hidrólise também ocorre nas células adiposas, de maneira semelhante (JEFFCOAT, 2007).

Os triglicerídeos são sintetizados na maioria dos tecidos, mas especialmente no fígado e no tecido adiposo. A síntese de triglicerídeos ocorrida no fígado é regulada por modificações nutricionais e hormonais. O hormônio insulina, produzido no pâncreas, estimula a lipogênese, sendo liberado após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos, principalmente a glicose. Logo após a ingestão destes alimentos, o organismo inicia uma série de processos biossintéticos que abrangem a reposição das reservas energéticas, incluindo a formação de triglicerídeos. O estímulo do hormônio insulina sobre essa formação ocorre pelo fato de que a

entrada de glicose na célula, mediada pelo mesmo, aumenta a disponibilidade de substâncias precursoras dos componentes dos ácidos graxos e de glicerol. Esses triglicerídeos sintetizados no fígado, em sua maioria, são liberados incorporados às lipoproteínas plasmáticas, que fazem a distribuição destes compostos para todo o corpo (MARZZOCO; TORRES, 1999).

O tecido adiposo é responsável, além da síntese, pelo armazenamento e hidrólise dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos para uso intracelular ou para ser utilizado em outros tecidos e órgãos. De forma antagônica à insulina, o hormônio glucagon atua inibindo a lipogênese e estimulando a lipólise. O glucagon é produzido no pâncreas principalmente sob o estímulo da hipoglicemia e seus efeitos metabólicos são de ativação da degradação de substâncias, tais como glicogênio, proteínas e lipídeos. Nos adipócitos, a lipase, ativada indiretamente pelo glucagon, hidrolisa os triglicerídeos e libera ácidos graxos livres e glicerol para a corrente sanguínea, sendo os primeiros enviados para os demais tecidos e utilizados como fonte de energia (MARZZOCO; TORRES, 1999; JEFFCOAT, 2007). A Figura 1 ilustra o processo de ativação da lipase.

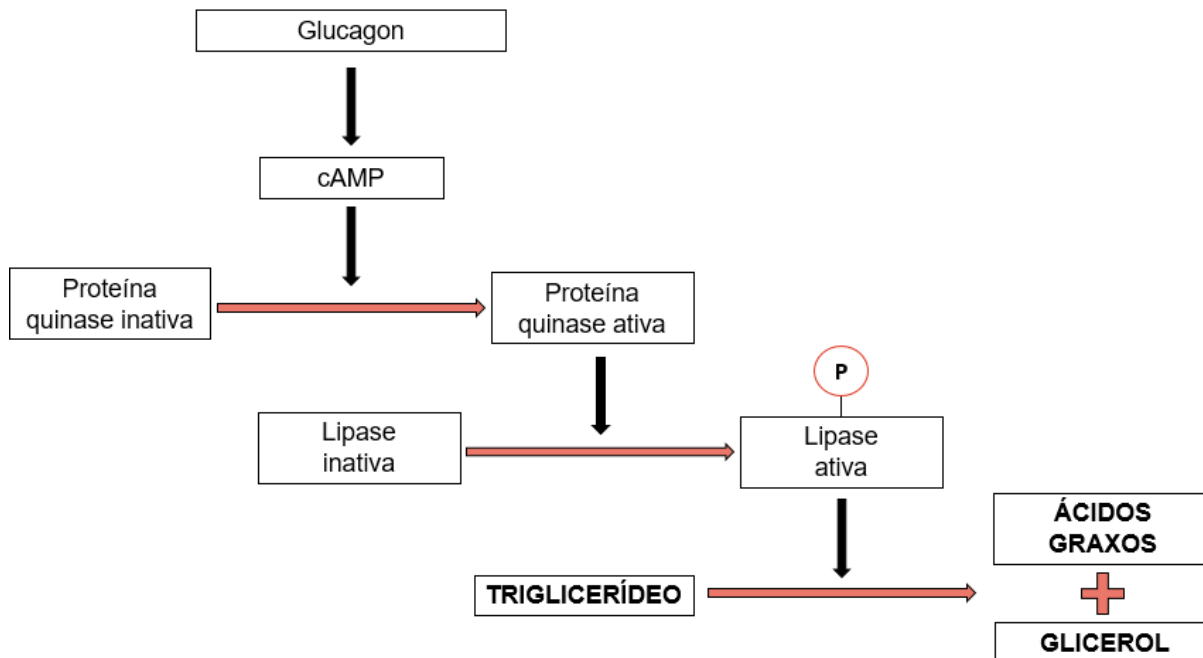


FIGURA 1 – ATIVAÇÃO DA LIPASE NO PROCESSO DE HIDRÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS. O glucagon é liberado pelo pâncreas em situações de baixa glicemia. Este hormônio ativa a adenil ciclase (não mostrada na figura) que é responsável por transformar ATP (adenosina trifosfato) em cAMP (adenosina monofosfato cíclica). A proteína quinase é cAMP-dependente e quando é ativada, fosforila a lipase. A lipase, portanto, é uma enzima sujeita a regulação hormonal, e quando fosforilada, hidrolisa os triglicerídeos a ácidos graxos e glicerol.

FONTE: Adaptada de MARZZOCO & TORRES (1999).

2.1.2 Colesterol

O colesterol é precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D, além de fazer parte das membranas celulares, junto com os fosfolípidos. (TARLING & EDWARDS, 2012). Os principais hormônios esteroides são os corticosteroides e os hormônios sexuais. Os corticosteroides são produzidos nas glândulas suprarrenais e fazem a regulação do metabolismo de proteínas, carboidratos e eletrólitos. O cortisol é um exemplo de hormônio corticosteroide que atua como anti-inflamatório. Os hormônios sexuais esteroides são a testosterona, os estrógenos e as progesteronas, que são importantes no controle da diferenciação sexual (testosterona em homens; estrogênio e progesterona em mulheres) (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Os sais biliares são produzidos no fígado a partir do colesterol, armazenados na vesícula biliar e secretados no duodeno, onde possuem a função de emulsificação e solubilização dos lipídeos e vitaminas lipossolúveis, facilitando a digestão e absorção destas substâncias pelo intestino. A maior parte dos sais biliares é reabsorvido e retorna ao fígado para atuar em novos ciclos de secreção, e a parte que não é reabsorvida é excretada junto com as fezes. Esta é uma importante via de secreção de colesterol e é utilizada no tratamento clínico para reduzir os níveis de colesterol plasmático. Esses tratamentos são feitos por meio de drogas que aumentam a conversão de colesterol em sais biliares por consequência da inibição da reabsorção dos mesmos pelo intestino (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Cerca de 30% do colesterol é proveniente da alimentação, enquanto o restante é sintetizado no fígado e no intestino. A maior parte do colesterol produzido é exportado na forma de sais biliares (JEFFCOAT, 2007). Da mesma forma que nos triglicerídeos, a síntese de colesterol é regulada pela insulina e pelo glucagon, sendo que o controle desta síntese ocorre principalmente sobre a reação catalisada pela enzima HMG-CoA redutase (importante enzima da cascata de reações de produção de colesterol), através de alterações na atividade e concentração desta enzima. No controle da atividade, a insulina promove a ativação por desfosforilação da HMG-CoA redutase e o glucagon inativa a mesma por fosforilação. Além disso, no controle da concentração da enzima, altas concentrações de colesterol intracelular são detectadas e inibem a tradução do RNA mensageiro da HMG-CoA redutase e aumentam a velocidade de degradação da mesma, pois não há a necessidade de

síntese de colesterol (MARZZOCO; TORRES, 1999). A regulação da homeostase do colesterol é extremamente controlada e isso se deve a sua importância para o funcionamento normal e saudável da célula e do organismo (TARLING; EDWARDS, 2012).

2.1.3 Lipoproteínas

As gorduras absorvidas da dieta ou aquelas produzidas pelo organismo precisam ser transportadas entre outros tecidos e órgãos, mas como são moléculas de natureza hidrofóbica, não se dissolvem no plasma sanguíneo. Desse modo, para que possam ser transportadas pelo sangue, precisam ser incorporadas a outras moléculas hidrossolúveis, que são as lipoproteínas (XAVIER *et al.*, 2013).

As lipoproteínas são compostas por lipídeos (colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos) e proteínas chamadas de apolipoproteínas. A estrutura básica das lipoproteínas é comum a todas, variando o tamanho e a proporção entre seus componentes. De acordo com as suas características físico-químicas, são divididas em quilomícron, VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), IDL (lipoproteína de densidade intermediária), LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) (XAVIER *et al.*, 2013).

Os quilomícrons são lipoproteínas grandes formadas a partir dos ácidos graxos livres, provenientes da ação dos sais biliares sobre os triglicerídeos ingeridos na dieta. Eles são absorvidos pela mucosa intestinal e enviados para o fígado, onde ocorre a formação de acilglicerois e, posteriormente, de VLDLs. As VLDLs também são lipoproteínas grandes, cuja função é transportar o colesterol e os triglicerídeos produzidos no fígado para os tecidos periféricos, para serem estocados ou utilizados como fonte de energia. Nesse transporte são formadas, a partir de parte das VLDLs, as IDLs, que são removidas rapidamente do plasma. Tanto as VLDLs quanto as IDLs são precursoras das LDLs (XAVIER *et al.*, 2013).

As LDLs possuem apenas conteúdo residual de triglicerídeos, sendo compostas principalmente de colesterol e apolipoproteínas (XAVIER *et al.*, 2013). Elas são responsáveis pela maior parte do transporte de colesterol para locais onde ele exerce funções fisiológicas, como para a produção de esteroides. Já as HDLs são partículas pequenas que fazem o chamado transporte reverso do colesterol, levando-o dos tecidos periféricos até o fígado, para ser eliminado através do sistema biliar. As HDLs são produzidas no fígado, intestinos e na corrente sanguínea e

possuem importante papel na proteção do leito vascular contra a formação de placas ateroscleróticas (ROSENSON *et al.*, 2015). Existe associação entre altos níveis de colesterol HDL (HDL-c) plasmáticos e a redução do risco de desenvolver doenças coronarianas, devido ao já citado transporte reverso do colesterol, realizado pelo HDL-c. A Figura 2 ilustra o metabolismo dos lipídeos e a atuação das lipoproteínas.

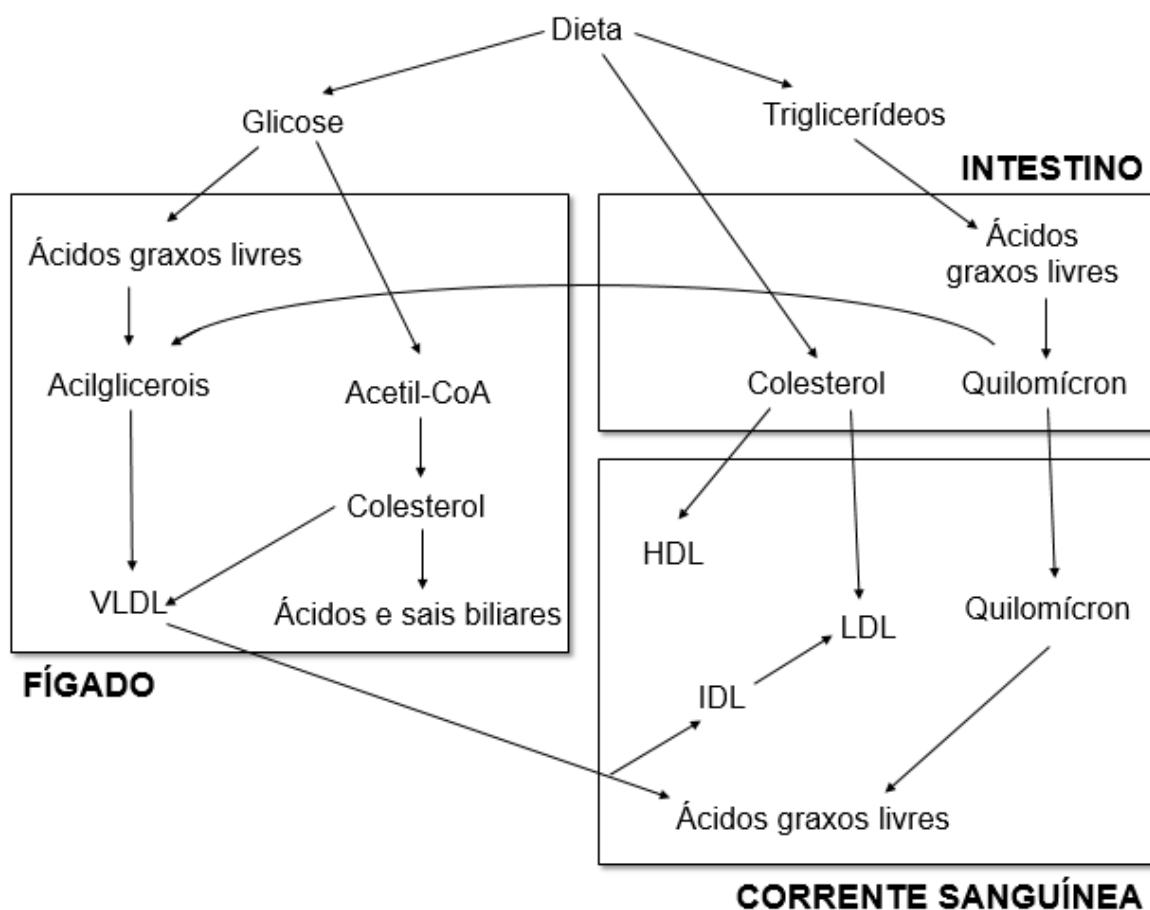


FIGURA 2 – METABOLISMO DOS LIPÍDEOS A PARTIR DE BIOMOLÉCULAR PROVEINENTES DA DIETA. Da dieta são provenientes diversas biomoléculas, dentre elas a glicose, os triglicerídeos e o colesterol. As moléculas de glicose que excedem as necessidades energéticas do organismo são convertidas, no fígado, em ácidos graxos livres e/ou acetil-CoA. Vários ácidos graxos livres podem juntar-se com gliceróis e formar os acilgliceróis, que darão origem às VLDLs. As VLDLs vão para a corrente sanguínea. O acetil-CoA é a molécula precursora do colesterol, que também será incorporado às VLDLs ou será liberado pelo fígado como ácidos e sais biliares, para fazer a digestão de gorduras no intestino. Os triglicerídeos provenientes da dieta são logo separados em ácidos graxos livres, no intestino, e se juntam formando quilomícrons. Na corrente sanguínea os quilomícrons podem ser quebrados liberando ácidos graxos livres. O colesterol proveniente da dieta é absorvido pelo intestino e, na corrente sanguínea, se junta às VLDLs e forma as LDLs e HDLs. Na corrente sanguínea as lipoproteínas exercem as suas funções (LARGE *et al.*, 2004). NOTA: VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária. LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteínas de alta densidade.
FONTE: O autor (2016).

O transporte dos lipídeos para formação das lipoproteínas, não ocorre passivamente pela membrana celular e, portanto, há a necessidade do intermédio de proteínas de membrana. Os transportadores ABC (sigla para *ATP-Binding Cassette* ou cassete de ligação ao ATP) formam uma superfamília de proteínas altamente conservadas envolvidas no transporte de diversas substâncias, como íons, açúcares, aminoácidos, proteínas, vitaminas e hormônios esteroides pelas membranas celulares (KAMINSKI *et al.*, 2000; WILKENS, 2015).

Em humanos, a superfamília ABC é composta por 48 proteínas transportadoras, que são subdivididas filogeneticamente em 7 subfamílias, denominadas de A à G (WILKENS, 2015). Estas proteínas são muito específicas para seus respectivos substratos e necessitam de energia proveniente da hidrólise de ATP para efetuar esse transporte. Segundo LARGE e colaboradores (2004), falhas no desempenho destes transportadores, especialmente aqueles que fazem o transporte de lipídeos, podem estar associadas a diversos distúrbios metabólicos, como resistência insulínica, diabetes, dislipidemias e obesidade, podendo levar, inclusive, a doenças cardiovasculares.

2.2 Obesidade e Dislipidemias

A obesidade é um distúrbio metabólico, na maioria dos casos de etiologia complexa, que envolve aspectos sociais, psicológicos e biológicos. Nas últimas três décadas, segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), o número de obesos aumentou significativamente, sendo que, desde 1980, o número de pessoas obesas no mundo mais do que dobrou, chegando em 2014 a 600 milhões de obesos (13% da população mundial de adultos com 18 anos ou mais) e 1,9 bilhões de adultos com sobrepeso (WHO, 2015). No ano de 2003, no Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 40% da população com 20 anos ou mais estava com excesso de peso, como pode ser visto na Tabela 1. Já em 2014, a prevalência de excesso de peso chegou a 52,2%, enquanto que a obesidade atingiu 17,9% da população, como mostrado no Gráfico 1 (VIGITEL, 2014).

TABELA 1 — PREVALÊNCIA DE DÉFICIT DE PESO, EXCESSO DE PESO E OBESIDADE NA POPULAÇÃO COM 20 ANOS OU MAIS NO BRASIL EM 2003

	Déficit de peso (%)	Excesso de peso (%)	Obesidade (%)
Sexo			
Masculino	2,8	41,1	8,9
Feminino	5,2	40,0	13,1

NOTA: Déficit de peso $IMC \leq 19,9$ Kg/m²; excesso de peso $25 \leq IMC \leq 29,9$ Kg/m²; obesidade $30,0 \leq IMC \leq 39,9$ Kg/m².

FONTE: IBGE (2003)

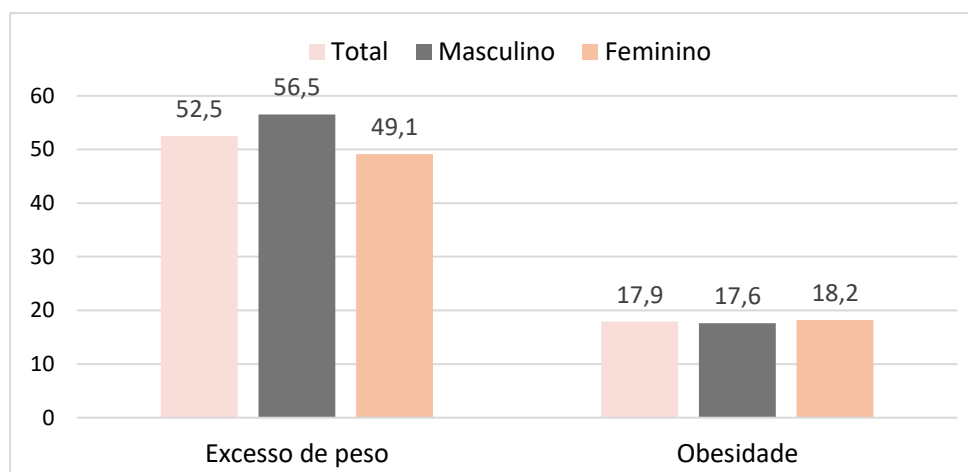


GRÁFICO 1 — PREVALÊNCIA (%) DE EXCESSO DE PESO E OBESIDADE POR SEXO NO BRASIL

FONTE: VIGITEL (2014)

O aumento mundial da prevalência e incidência da obesidade tem a ver com as mudanças ambientais e sociais sofridas pela sociedade humana, que aumentou a ingestão de energia. Ao mesmo tempo que a industrialização facilitou a produção e o acesso aos alimentos processados ricos em gordura, açúcar e sal, ocorreu uma redução na prática de atividades físicas, em consequência da sedentarização das formas de trabalho, mudanças nas formas de locomoção e aumento da urbanização (HENI *et al.*, 2014).

Existe associação entre sobrepeso, obesidade e o aumento do risco em desenvolver doenças crônicas silenciosas, como diabetes tipo II, câncer, doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (HERRERA *et al.*, 2011), sendo, essas últimas, as maiores causas de morte no ano de 2012, em todo o mundo (WHO, 2014). Além dessas, hipertensão e aterosclerose também são comorbidades, sendo a última a maior causa de mortes em países desenvolvidos (SCHMIDT, 2010).

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura na forma de triglicerídeos no tecido adiposo (HERRERA *et al.*, 2011). O índice de massa corporal

(IMC), determinado pelo peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado (Kg/m^2), é o parâmetro mais utilizado para avaliar o perfil antropométrico dos indivíduos adultos de ambos os sexos (WHO, 2015) e a sua classificação está no Quadro 1. Convém ressaltar que valores idênticos de IMC, no entanto, podem não corresponder ao mesmo grau de gordura corporal em indivíduos diferentes, fato que deve ser levado em consideração no diagnóstico de obesidade.

Classificação	IMC
Saudável	Entre 20 e 24,9 Kg/m^2
Excesso de peso	Entre 25 e 29,9 Kg/m^2
Obeso	Entre 30,0 e 39,9 Kg/m^2
Obeso-mórbido	Maior que 40 Kg/m^2

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DA OBESIDADE EM ADULTOS SE ACORDO COM O IMC.
 FONTE: OMS (2015)

Além do acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo, a maior circulação de energia em obesos pode resultar no acúmulo de gordura em outros tecidos, como no fígado, rins e pâncreas. O excesso de lipídeos acumulado nesses tecidos está diretamente relacionado com resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemias e hipertensão (MARCELIN & CHUA, 2010).

Pelo fato da maioria dos casos de obesidade ser resultante da interação entre o ambiente e fatores genéticos, a relação entre ingestão e gasto calórico depende dos fatores genéticos individuais. A influência dos genes e de seus polimorfismos nessa relação pode ser maior ou menor, de acordo com os fatores ambientais aos quais o indivíduo está submetido.

Já as dislipidemias correspondem a um amplo espectro de distúrbios caracterizados por níveis anormais de lipoproteínas ou por anormalidades na estrutura dessas macromoléculas (XAVIER *et al.*, 2013). O Quadro 2 mostra a classificação fenotípica das dislipidemias.

Classificação da dislipidemia	Alteração
Hipercolesterolemia isolada	LDL \geq 160 mg/dL
Hipertrigliceridemia isolada	TG \geq 150 mg/dL
Hiperlipidemia mista	LDL \geq 160 mg/dL e TG \geq 150 mg/dL
HDL baixo	< 40 mg/dL (homens) e < 50 mg/dL (mulheres)

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS DISLIPIDEMIAS.
 FONTE: XAVIER *et al.* (2013)

A hipertrigliceridemia é causada pelo acúmulo de quilomícrons e/ou VLDL. Esse acúmulo pode ser devido a diversos fatores relacionados com ao aumento da síntese e/ou diminuição da hidrólise dos triglicerídeos destas lipoproteínas, como por exemplo variantes genéticas que resultem em enzimas e apolipoproteínas desta via que não exerçam seus papéis de forma ideal. Já a hipercolesterolemia é causada pelo acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol, como as LDLs. Esse acúmulo excessivo pode ter causas monogênicas, mas a grande maioria dos casos é de origem complexa (XAVIER *et al.*, 2013).

Os parâmetros alterados de perfil lipídico são considerados de risco para o surgimento de aterosclerose, acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana, que é responsável por um terço de todas as mortes de pessoas com mais de 35 anos. O tratamento mais comum e eficiente para reduzir LDL é a administração de atovastatina, mas as respostas ao medicamento dependem de fatores genéticos individuais (AKAO *et al.*, 2014).

Fatores ambientais e sociais, como a cultura, *status* social e dieta tem muita influência no aumento, gravidade e consequências das dislipidemias. Além disso, aspectos genéticos também estão associados com a maior predisposição ao aumento dos níveis de lipídeos do soro e, conseqüentemente, para acidentes vasculares cerebrais (PU *et al.*, 2015). A investigação destes fatores é importante no momento do diagnóstico, tratamento e até mesmo prevenção de dislipidemias. Variantes alélicas de genes relacionados com as vias de metabolismo do colesterol, como por exemplo os genes *APOB*, *LDLRAP* e *PCKS9*, já foram associados com hipercolesterolemia de origem monogênica, porém, mais comumente, as dislipidemias são resultado da interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (XAVIER *et al.*, 2013; CARTIER; GOLDBERG, 2016).

2.2.1 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que ocorre em resposta a agressão ao endotélio de artérias de médio e grande calibres e está intimamente relacionada com excesso de peso, obesidade e dislipidemias. Esses são fatores de risco, pois fazem com que o endotélio dos vasos fique mais permeável às lipoproteínas, favorecendo a retenção das mesmas (XAVIER *et al.*, 2013). Estas lipoproteínas retidas, especialmente as LDLs, sofrem oxidação, o que leva a uma resposta inflamatória. Células do sistema imune como linfócitos e monócitos (que depois se diferenciam em macrófagos) são recrutados e acabam aumentando a inflamação, o que leva ao estímulo de migração de células musculares lisas. Estas células musculares lisas secretam matriz extracelular e isso leva a formação de uma capa fibrosa, constituindo, desta forma, os ateromas, ou placas ateroscleróticas (XAVIER *et al.*, 2013).

As placas ateroscleróticas desenvolvidas possuem em sua composição elementos celulares, componentes de matriz extracelular e um núcleo lipídico e necrótico (com células mortas). As placas causam um estreitamento dos vasos, podendo levar à oclusão dos mesmos. Esta oclusão pode levar ao bloqueio da irrigação sanguínea e, conseqüentemente, bloqueio do aporte de oxigênio, podendo levar à morte do tecido. Além disso, as placas ateroscleróticas instáveis (com atividade inflamatória intensa) podem romper-se e liberar material altamente trombogênico, levando a formação de trombos sobrejacentes. As conseqüências da aterosclerose incluem infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e embolia pulmonar (MARZZOCO; TORRES, 1999; XAVIER *et al.*, 2013).

Existe uma correlação inversa ao surgimento de placas ateroscleróticas com os níveis de HDL-c, devido a sua função: a de fazer o transporte reverso do colesterol, retirando o excesso do mesmo das células e o levando para o fígado, onde pode ser excretado como sais biliares (MARZZOCO; TORRES, 1999). Desta forma, níveis elevados de HDL-c no plasma sanguíneo são recomendados.

2.3 Obesidade e Dislipidemias: polimorfismos em genes candidatos

A busca por variantes genéticas associadas a doenças complexas, como a obesidade e as dislipidemias, foi impulsionada pelos estudos de *Genome-wide association* (GWA), ou seja, estudos que buscam a identificação de associações entre vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do genoma e traços altamente variáveis entre os indivíduos (FAWCETT & BARROSO, 2010).

2.3.1 Gene *FTO*

O gene *FTO* (sigla para *Fat-mass and obesity associated*) localiza-se no cromossomo 16 na região 16q12.2 (Figura 3) e codifica para desmetilase 2-oxoglutaramo-dependente (WANG *et al.*, 2015), também chamada de proteína FTO.

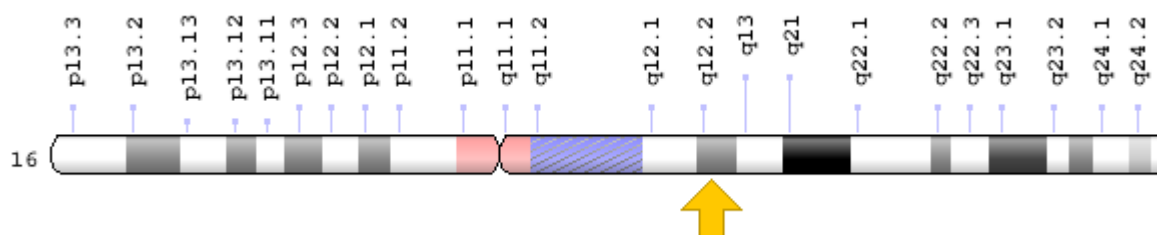


FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GENE *FTO*. Representação do cromossomo 16 e indicação da localização do gene pela flecha amarela (posição 16q12.2).
 FONTE: *Genetics Home Reference* (2017).

Foi descoberto em ratos e sabe-se que possui homólogos em outros vertebrados (de peixes a humanos) e em algas marinhas (WANG *et al.*, 2015). O seu produto está associado com a homeostase energética, mas as suas funções e vias fisiológicas não estão bem estabelecidas (BOISSEL *et al.*, 2009; JIA, *et al.*, 2011). Existem semelhanças entre a proteína FTO e a enzima AlkB de *Escherichia coli*, que repara erros de metilação, removendo grupos metil do DNA, o que sugere que a proteína FTO age, portanto, como agente desmetilante de DNA e RNA, preferencialmente em fita simples (FAWCETT *et al.*, 2010; JIA, *et al.*, 2011).

Esta função pode estar associada à regulação da expressão de genes e RNAs mensageiros envolvidos no metabolismo, e um desequilíbrio nesse processo pode levar à obesidade. Experimentos *in vivo* mostraram alta expressão deste gene

no cérebro e hipotálamo, sendo que essa alta expressão está associada com a redução do apetite e sensação de saciedade (FAWCETT *et al.*, 2010). Entretanto, WAHLÉN e colaboradores (2008) encontraram uma maior concentração de RNA mensageiro do gene *FTO* no tecido adiposo subcutâneo de mulheres obesas, comparadas às não-obesas, sugerindo que o efeito da alta expressão pode ser diferente, dependendo do tecido. HENI e colaboradores (2013) destacam que variantes do gene *FTO* estão associadas ao controle da ingestão de comida, mas não foram associados ao gasto energético. Experimentos com ratos com *FTO* nulo, no entanto, evidenciaram que estes ratos possuíam altas taxas de mortalidade pós-natal, tamanho reduzido e redução da gordura corporal, o que sugere uma relação direta de *FTO* com o desenvolvimento do tecido adiposo (STRATIGOPOULOS & LEIBEL, 2010).

O polimorfismo rs9939609 (A>T) é uma variante frequente em diversas populações, como pode ser visto no Gráfico 2, e está localizada no primeiro íntron do gene *FTO* na posição 16:53786615. Frayling e colaboradores (2007), por meio de estudos de *Genome-wide association*, encontraram uma forte associação do alelo A deste polimorfismo com diabetes tipo II e com IMCs mais altos, no entanto, verificou-se que esta associação com diabetes tipo 2 é intermediada por IMCs elevados. O alelo A, portanto, está possivelmente associado ao risco para a obesidade e a um elevado IMC, tanto em adultos quanto em crianças, além de uma maior circunferência de cintura em mulheres (FRAYLING *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2008). Curiosamente, o alelo A também já foi associado com o aumento da ingestão de comida, o que pode estar relacionado de forma direta com a susceptibilidade à obesidade (FAROOQI, 2011).

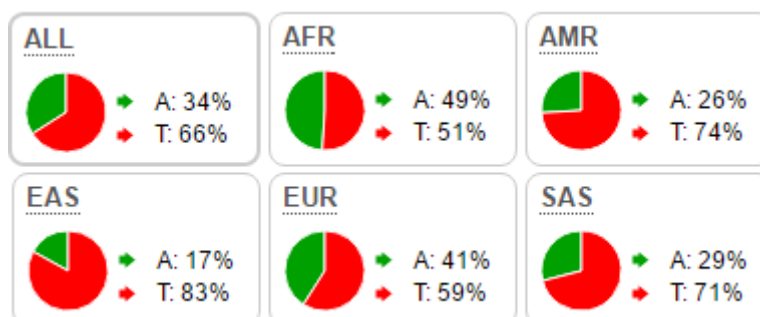


GRÁFICO 2 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9939606 DO GENE *FTO* EM DIFERENTES POPULAÇÕES. NOTA: ALL: todas as populações incluídas; AFR: Africanos; AMR: Americanos; EAS: Asiáticos do leste; EUR: Europeus; SAS: Asiáticos do sul. FONTE: 1000 Genomes Project (2015)

Indivíduos homozigotos AA apresentaram uma maior ingestão de comida e, em média, 3 Kg a mais que os portadores do alelo T (STRATIGOPOULOS & LEIBEL, 2010). Além disso, o genótipo AA foi associado com alterações na metilação de alguns genes, sendo alguns mais e outros menos metilados. Somente em indivíduos obesos com o genótipo AA foram observadas mudanças no padrão de metilação em 20 sítios (ALMÉN *et al.*, 2012), mas não se sabe, porém, se esta relação é de causa ou consequência da obesidade. Desta forma, *FTO* pode estar envolvido no controle de diversos genes, por vias epigenéticas. Esse controle pode ocorrer, inclusive, em genes que transcrevem para fatores de transcrição, o que engloba uma gama maior de genes controlados por *FTO*. Além disso, por agir em RNAs, pode estar associado com o processamento de pré-mRNAs e/ou outros RNAs (JIA, *et al.*, 2011). Ainda se sabe pouco sobre os efeitos de *FTO* e suas variantes no gasto de energia. O pouco que se sabe está relacionado com mudanças na expressão de *FTO* e sua influência no aumento de peso.

2.3.2 Gene *ABCA1*

O gene *ABCA1* está localizado no cromossomo 9 na posição 9q31.1 (Figura 4) e codifica para uma proteína de membrana de mesmo nome. *ABCA1* é expresso em diversos tecidos, mas em maior quantidade no fígado e nos macrófagos (GENETICS HOME REFERENCE, 2017). A proteína *ABCA1* faz a mediação do transporte de colesterol e fosfolípidos para fora da célula, onde são captados pela apolipoproteína A-I (apoA-I) e, juntos, formam partículas de HDL-c (AKAO *et al.*, 2014). Por este motivo, a proteína *ABCA1* participa de vias essenciais para a regulação do transporte de colesterol, biogênese do HDL e, por consequência, para o transporte reverso do colesterol, importante na prevenção da formação de placas ateroscleróticas (GENVIGIR *et al.*, 2008).

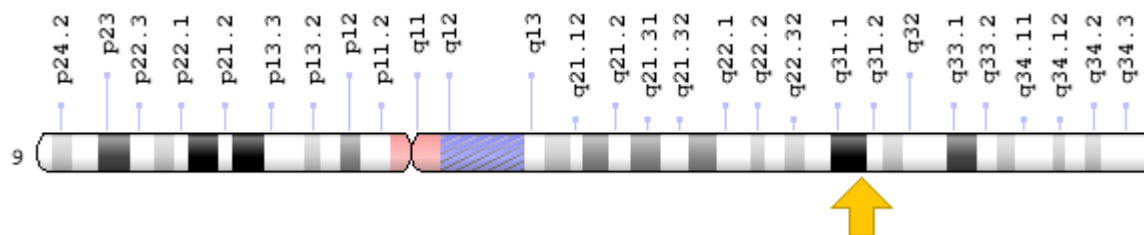


FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GENE *ABCA1*. Representação do cromossomo 9 e indicação da localização do gene pela flecha amarela (posição 9q31.1).
 FONTE: *Genetics Home Reference* (2017)

A modulação da expressão do *ABCA1* tem um forte impacto sobre o transporte de colesterol e fosfolípidos, tendo efeitos, inclusive, de inibição da lipogênese (MA et al., 2014). Outrossim, mutações raras neste gene causam as hipercolesterolemias monogênicas, como a doença de Tangier e a hipoalfalipoproteinemia. Nestas doenças a proteína *ABCA1* resultante não executa a sua função corretamente, levando à deficiência no efluxo do colesterol, redução dos níveis de HDL-c e aumentando, assim, o risco de desenvolver aterosclerose (GENVIGIR et al., 2007; PORCHAY-BALDÉRELLI, et al., 2008). Ademais, alguns polimorfismos comuns também têm sido associados com a diferentes níveis de lipídeos séricos.

O polimorfismo rs1800977 está localizado na posição 9:104928169 na região promotora 5' UTR do gene *ABCA1* e consiste em uma substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A). O alelo A deste polimorfismo já foi associado com aterosclerose e o aumento de risco de desenvolver doença arterial coronariana, mesmo sem alterar significativamente os valores de lipídeos séricos (GENVIGIR et al., 2008). No Gráfico 3 estão as frequências alélicas deste polimorfismo em diferentes populações do mundo.

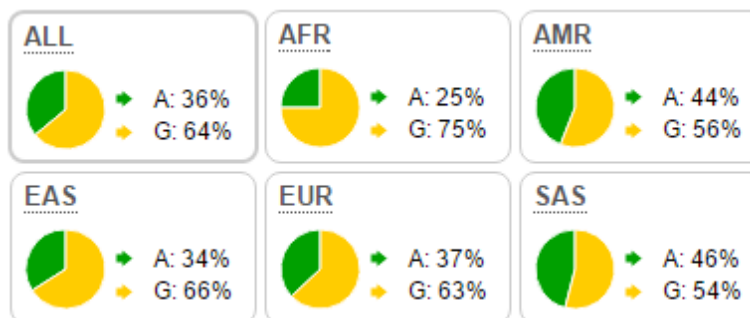


GRÁFICO 3 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1800977 DO GENE *ABCA1* EM DIFERENTES POPULAÇÕES. NOTA: ALL: todas as populações incluídas; AFR: Africanos; AMR: Americanos; EAS: Asiáticos do leste; EUR: Europeus; SAS: Asiáticos do sul.
 FONTE: *1000 Genomes Project* (2015)

O polimorfismo rs2230806 está localizado na posição 9:104858586 e consiste na substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) no exon 7 no gene *ABCA1*. Na proteína gerada há troca de sentido: enquanto o alelo C codifica para uma arginina, o alelo T codifica para uma lisina na região 219 da proteína (por este motivo, também é referenciado como polimorfismo R219K). O alelo T deste polimorfismo foi associado com efeito de proteção contra doença arterial coronariana, possivelmente pelo aumento dos níveis de HDL-c e redução dos níveis de triglicérides associados à sua presença. Há associação, também, dos genótipos heterozigoto e homozigoto TT com uma maior concentração de apoA-I em indivíduos normolipidêmicos e níveis mais baixos de VLDL-c e triglicérides em indivíduos hipercolesterolêmicos (GENVIGIR *et al.*, 2008). No Gráfico 4 estão as frequências alélicas deste polimorfismo em diferentes populações do mundo.

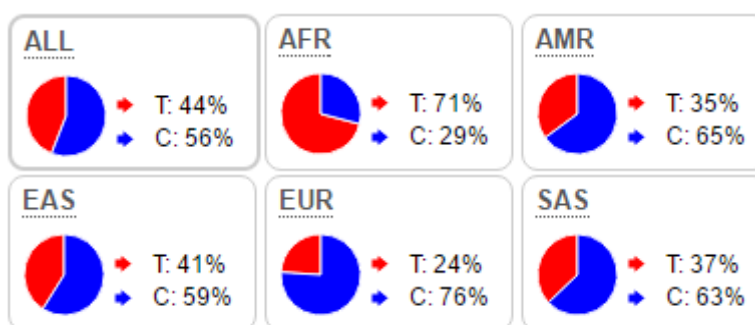


GRÁFICO 4 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2230806 DO GENE *ABCA1* EM DIFERENTES POPULAÇÕES. NOTA: ALL: todas as populações incluídas; AFR: Africanos; AMR: Americanos; EAS: Asiáticos do leste; EUR: Europeus; SAS: Asiáticos do sul. FONTE: *1000 Genomes Project* (2015)

2.3.3 Gene *ABCA7*

O gene *ABCA7* foi identificado no ano 2000 por KAMINSKI e colaboradores e está localizado no cromossomo 19 na posição 19p13.3 (Figura 5). Sua expressão é mais alta no tecido linfático, incluindo leucócitos, baço, linfonodos, medula e tecidos fetais (KAMINSKI *et al.*, 2000), podendo, desta forma, estar relacionado com o sistema imune. A proteína *ABCA7* possui alta homologia com o *ABCA1*, mas o seu perfil de expressão tecido-específica é muito diferente (DOHMAEA *et al.*, 2006). Em ratos com *ABCA7* nulo houve redução de 50% do tecido adiposo e HDL-c

significativamente menor que o tipo selvagem nas fêmeas, além de alta taxa de mortalidade fetal (DOHMAEA *et al.*, 2006). A proteína ABCA7, assim como ABCA1, está relacionada com o transporte de lipídeos e a formação de HDL mediado por apoA-I. Seus substratos primários, no entanto, são os fosfolipídeos, sendo o colesterol muito menos transportado por esta proteína (DOHMAEA *et al.*, 2006).

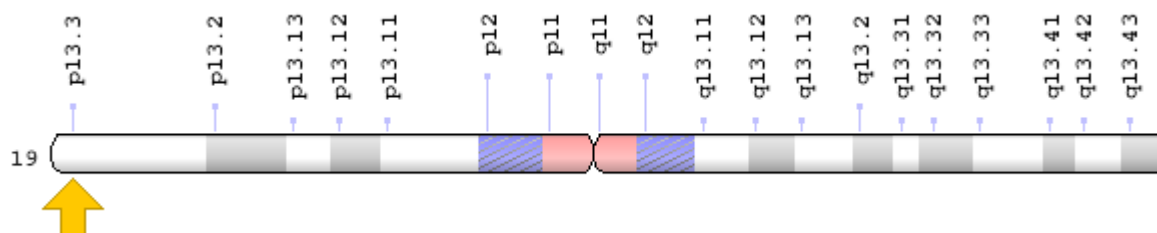


FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA DO GENE *ABCA7*. Representação do cromossomo 19 e indicação da localização do gene pela flexa amarela (posição 19p13.3). FONTE: Genetics Home Reference (2017).

O polimorfismo rs2279796 é uma variante intrônica de nucleotídeo único, de substituição de uma guanina (G) por uma adenosina (A) na posição 19:1059005 e existem poucos estudos sobre o efeito da mesma sobre marcadores de obesidade e níveis de lipídeos plasmáticos. No Gráfico 5 estão as frequências alélicas deste polimorfismo em diferentes populações do mundo.

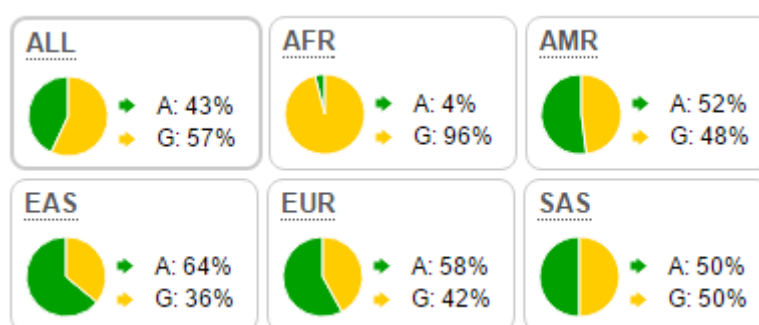


GRÁFICO 5 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2279796 DO GENE *ABCA7* EM DIFERENTES POPULAÇÕES. NOTA: ALL: todas as populações incluídas; AFR: Africanos; AMR: Americanos; EAS: Asiáticos do leste; EUR: Europeus; SAS: Asiáticos do sul. FONTE: 1000 Genomes Project (2015)

2.3.4 Gene *ABCG1*

O gene *ABCG1* está localizado no cromossomo 21, na região 21q22.3 (Figura 6) e também codifica para uma proteína de membrana, cuja função também está relacionada ao efluxo de lipídeos da célula, principalmente colesterol, e formação de HDL (LEGOFFA & THIEB, 2011). A sua ação, no entanto, é diferente de *ABCA1*. A proteína *ABCG1* não utiliza ApoA-I como receptor de colesterol. TARLING & EDWARDS (2012) sugerem que o efluxo de colesterol feito por *ABCG1* é independente de ligação com alguma proteína exógena específica. FRISDAL e colaboradores (2015) demonstraram que, nos adipócitos, a proteína *ABCG1* contribui para estocar triglicerídeos e, desta forma, sua alta expressão pode estar associada ao aumento de gordura corporal em indivíduos obesos. Alguns polimorfismos, portanto, podem estar associados com este fenótipo pela mudança na expressão que podem ser capazes de provocar. Mudanças na expressão de *ABCG1* foram verificadas na presença de aterosclerose e doença arterial coronariana, mas os mecanismos responsáveis por estas mudanças não estão claros (XU *et al.*, 2011).

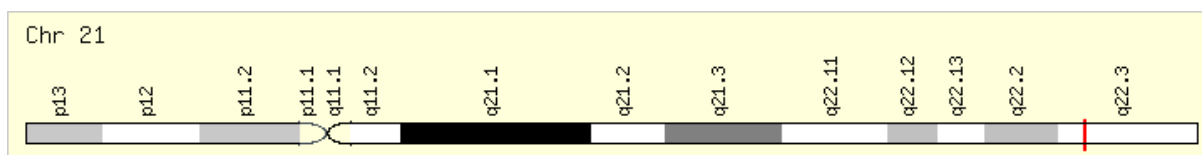


FIGURA 6 – LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO GENE *ABCG1*. Representação do cromossomo 21 e indicação da localização do gene pela linha vermelha (posição 21q22.3).

FONTE: *Gene Cards*® (2017)

O polimorfismo rs692383 é uma variante intrônica de nucleotídeo único, onde há a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A), na posição 21:42215064. Da mesma forma, o polimorfismo rs3827225 também é uma variante intrônica de nucleotídeo único de substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A), na posição 21:42230669. No Gráfico 6 e no Gráfico 7 estão as frequências alélicas dos polimorfismos rs692383 e rs3827225, respectivamente, em diferentes populações do mundo.

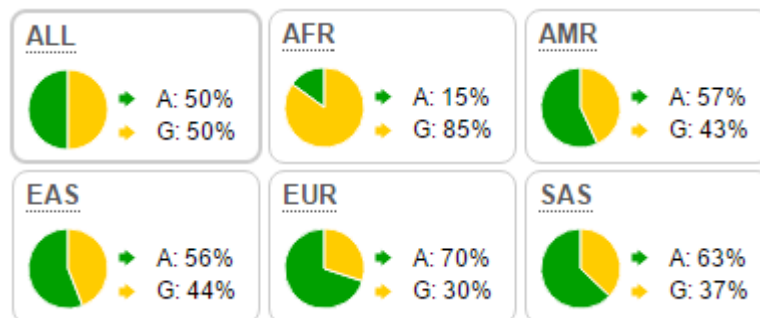


GRÁFICO 6 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs692383 DO GENE *ABCG1* EM DIFERENTES POPULAÇÕES. NOTA: ALL: todas as populações incluídas; AFR: Africanos; AMR: Americanos; EAS: Asiáticos do leste; EUR: Europeus; SAS: Asiáticos do sul.

FONTE: *1000 Genomes Project* (2015)

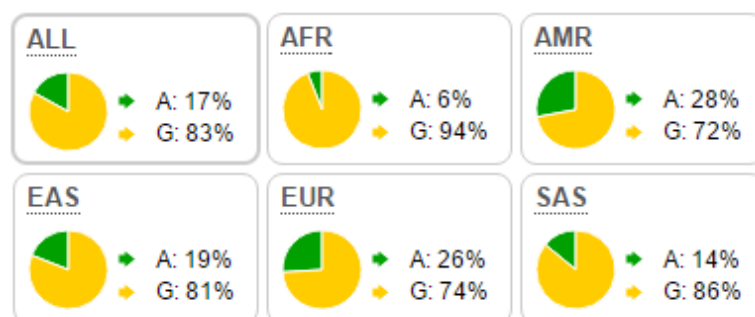


GRÁFICO 7 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3827225 DO GENE *ABCG1* EM DIFERENTES POPULAÇÕES. NOTA: ALL: todas as populações incluídas; AFR: Africanos; AMR: Americanos; EAS: Asiáticos do leste; EUR: Europeus; SAS: Asiáticos do sul.

FONTE: *1000 Genomes Project* (2015)

Por fim, alterações no metabolismo lipídico normal estão associadas com diversas doenças já citadas, as quais estão diretamente relacionadas com a perda de qualidade de vida e longevidade humana. Estudos sobre este tema e com este delineamento poderão contribuir para a compreensão sobre o efeito específico de dietas no controle do peso. Mais descobertas sobre esses efeitos podem culminar na mudança das abordagens tradicionais no tratamento da obesidade. Não obstante, estudos com variantes genéticas em doenças complexas permitem verificar associações entre os genes e os fenótipos. Estes estudos podem ser o começo para o desenvolvimento de estudos funcionais, sobre as rotas metabólicas envolvidas, a atuação de cada gene e o papel das variantes genéticas neste processo. Neste sentido, na busca pela qualidade de vida dos pacientes, tratamentos mais eficazes podem ser desenvolvidos, levando-se em consideração a interação destas variantes genéticas com os tratamentos de forma individualizada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar se variantes alélicas dos genes *FTO*, *ABCA1*, *ABCA7* e *ABCG1* estão relacionadas com a variação de marcadores antropométricos e bioquímicos de obesidade e dislipidemias em uma amostra de mulheres obesas, bem como verificar o possível efeito destas variantes alélicas sobre mudanças nas variáveis analisadas frente à aplicação de uma intervenção nutricional.

3.2 Objetivos Específicos

1) Verificar o efeito de cada um dos polimorfismos (rs9939609 do gene *FTO*; rs1800977 e rs2230806 do gene *ABCA1*; rs2279796 do gene *ABCA7* e rs692383 e rs3827225 do gene *ABCG1*) nas medidas antropométricas e nos níveis de lipídeos séricos (variáveis bioquímicas) no momento antes da intervenção dietética (análise transversal).

2) Analisar se os possíveis efeitos dos polimorfismos encontrados no momento antes permaneceram, e se surgiram outros efeitos após a intervenção dietética (análise transversal pós intervenção).

3) Analisar o efeito dos polimorfismos na variação (momento antes – momento depois) das medidas antropométricas e dos níveis de lipídeos séricos (variáveis bioquímicas) após a intervenção dietética (análise longitudinal).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

Foi realizada uma intervenção dietética com redução calórica em mulheres adultas obesas, com duração total de nove semanas. Foram analisados os parâmetros antropométricos e bioquímicos, coletados no momento pré e pós intervenção dietética, de acordo com SALIBA e colaboradores (2014), assim como polimorfismos de genes relacionados com o metabolismo energético e lipídico.

Para a implementação da intervenção foi necessário o treinamento de equipes de trabalho para atendimento, coleta de dados, recrutamento e seleção das participantes, além do processo de pré-intervenção, desenvolvimento e encerramento da intervenção, a fim de padronizar os procedimentos e estabelecer a qualidade dos dados coletados. As equipes contaram com graduandos dos cursos de Nutrição, Educação Física, Enfermagem, Biomedicina e Ciências Biológicas, além da orientação da pesquisadora responsável que era Nutricionista.

Este estudo contou com a parceria da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), a qual disponibilizou o espaço físico para a coleta das amostras, palestras e orientações que aconteceram entre outubro e dezembro de 2011.

4.2 Caracterização da Amostra

A amostra utilizada no presente trabalho é composta por 211 mulheres obesas ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$), sendo que deste total, 139 mulheres concluíram o programa de intervenção dietética.

Os critérios de inclusão no estudo foram os seguintes: ser do sexo feminino, possuir $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$, ter 20 anos ou mais, com saúde aparente, saber ler e escrever, estar em período anterior ao climatério, não ser gestante, não ser lactante e residir em Curitiba/PR e região metropolitana. Mulheres em tratamento dietoterápico e/ou medicamentoso para redução de peso, com hipotireoidismo,

diabetes tipo I, doença renal, hipertensão, que fizeram cirurgia de redução de estômago e/ou com hábito alimentar vegetariano, foram excluídas do estudo.

As mulheres que se enquadraram nos critérios da pesquisa foram esclarecidas sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todas as participantes leram e assinaram o TCLE. A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Parecer nº 0005306/11, em anexo).

4.3 Intervenção Dietética

A intervenção dietética com redução calórica contou com duração de nove semanas, sendo duas semanas de pré-intervenção e sete semanas de intervenção propriamente dita.

4.3.1 Pré-intervenção

A pré-intervenção abrangeu o cadastro das participantes, a coleta dos dados antropométricos, de sangue para análises bioquímicas e genótípicas, coleta de dados nutricionais e o agendamento para a intervenção. A coleta de dados nutricionais consistiu em um recordatório alimentar de 24h e após isso as mulheres foram encaminhadas para o agendamento do início da intervenção.

4.3.2 Intervenção

A intervenção dietética realizada teve três componentes: orientação dietética individual com dieta hipocalórica e lista de substituições de alimentos; orientação dietética em grupo e orientação para atividade física. Estas sessões ocorreram ao longo de um período de sete semanas.

As dietas hipocalóricas foram elaboradas pela Nutricionista responsável a partir do recordatório de 24h de cada uma das mulheres realizada durante a pré-intervenção, conforme a seguinte ordem:

1. Elaboração dos modelos de dieta e a lista de substituição de alimentos:

Foram elaborados modelos de dieta e lista de substituição de alimentos visando a máxima padronização em termos de calorias, macro nutrientes e quantidade de cálcio e de ferro. Estes modelos de dieta tinham cardápios de 24h que refletiam os hábitos culturais locais, que contemplavam as recomendações nacionais para alimentação saudável, com a identificação dos componentes dos cardápios que poderiam ser variados e desenvolvida uma lista de substituição de alimentos sem perda dos objetivos dietéticos. Além disso, foram consideradas as diferenças nas necessidades energéticas de cada participante, e foi aplicado um déficit calórico de 600 kcal, a partir do cálculo do gasto energético total. As dietas individuais, portanto, incluíram quatro refeições por dia (desjejum, almoço, lanche da tarde e jantar); três porções de frutas; três porções de hortaliças; no mínimo uma porção de carne; uma porção de leguminosa e três porções de laticínios; alimentos simples como pão francês, queijo mussarela, arroz, feijão, café, óleo de soja e margarina; uma opção de cereal integral, sendo representada pela aveia; última refeição com grande quantidade de vegetais, moderada de alimentos fontes de proteína (carne, frango ou queijo) e limitada de carboidratos (arroz ou pão) e quantidade reduzida de calorias quando comparada ao almoço; percentual energético recomendado proveniente dos macro nutrientes sendo o percentual de energia proveniente das gorduras entre 20% e 35%, de carboidratos entre 45% e 65% e de proteínas entre 10% e 35%; alimentos fontes de cálcio e ferro.

- 2. Cálculo do valor energético total:** Com os dados de peso, estatura e idade, a equipe de Nutrição calculou a taxa metabólica e depois o valor energético para cada participante pelas fórmulas:

$$\text{Taxa metabólica de repouso} = [10 \times \text{peso (kg)}] + [6,25 \times \text{altura (cm)}] - [5 \times \text{idade (anos)}] - 161$$

$$\text{Gasto energético total} = \text{taxa metabólica de repouso} \times 1,3$$

A este valor calculado de gasto energético total para cada participante foi aplicado o déficit de 600Kcal.

3. Definição do modelo de dieta para cada participante: A partir da definição do valor energético para cada participante, a equipe de Nutrição selecionou o modelo de dieta apropriado em termos calóricos e entre a opção de lanche ou jantar para a última refeição do dia. Para esta escolha, foi utilizada a informação do recordatório alimentar de 24h de cada participante, coletada na pré-intervenção. Após estas definições, as dietas foram preenchidas com o nome, identificação, peso e estatura das participantes.

4. Preenchimento da lista de substituição de alimentos: A partir da definição da dieta, a equipe de Nutrição fez o preenchimento das listas de substituição de alimentos. Para tanto, os campos das diferentes porções dos diferentes alimentos da lista foram preenchidos a partir dos alimentos da dieta de cada participante.

Após o término destas etapas, o passo seguinte foi a orientação dietética individual, o início da intervenção dietética para a perda de peso. De modo geral, as dietas variaram de 1000 a 2200 Kcal diárias.

As orientações dietéticas em grupo foram realizadas nas duas semanas subsequentes, na forma de palestras seguida de discussão, feitas pela nutricionista pesquisadora responsável em auditório apropriado para esta atividade. Tiveram os seguintes temas:

- **“Cores e Sabores com Poucas Calorias. Sugestões para Ajudar no Dia a Dia”.** Esta palestra foi desenvolvida com o objetivo de reforçar as informações da orientação individual; apontar opções saudáveis e com poucas calorias, isentas ou com baixo teor de sódio; indicar opções de doces com poucas calorias ou sobremesas sem açúcar, e esclarecer dúvidas identificadas pelas participantes no transcorrer de uma semana de intervenção.
- **“Rotulagem Nutricional: O que saber e como usar?”.** Esta palestra foi desenvolvida com o objetivo de esclarecer, conscientizar e promover autonomia às participantes na identificação das escolhas de alimentos industrializados mais saudáveis, em relação ao teor de gordura, sódio e calorias.

As participantes também receberam uma orientação para atividade física em um dos encontros do grupo. Esta orientação foi desenvolvida por uma professora mestra em Educação Física, e visou orientar e ensinar as participantes sobre atividades físicas simples que aumentam o gasto calórico. Não houve intervenção de exercício físico, apenas recomendações de atividades adaptadas para indivíduos com excesso de peso.

4.3.3 Pós-intervenção

Ao fim das nove semanas, as participantes compareceram para a realização da última etapa do estudo. Nesta etapa foram coletados novamente os dados antropométricos e o sangue para análises bioquímicas. Cada participante recebeu resultados das análises bioquímicas realizadas na pré-intervenção e foi realizado o agendamento para o recebimento dos resultados dos exames bioquímicos na pós-intervenção.

4.4 Variáveis Analisadas

4.4.1 Variáveis antropométricas

Foram obtidos os dados de massa corporal, estatura, circunferência da cintura (CC) e circunferência abdominal (CA). A partir da massa corporal e da estatura, o Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado. Para verificação de massa corporal foi utilizada balança marca Filizola, divisão 100 gramas, e para estatura foi utilizado estadiômetro da marca Seca. As medidas de CC e CA foram feitas com fita antropométrica marca Seca.

4.4.2 Variáveis Bioquímicas

Foram verificados os níveis de glicemia e perfil lipídico (colesterol total (CT), LDL-c, HDL-c, VLDL-c e triglicerídeos (TG)). Para a verificação dos dados bioquímicos foi coletado sangue com seringas plásticas e agulhas descartáveis e armazenado em tubos secos para análise posterior.

Nas mulheres que concluíram o programa de intervenção dietética as medidas das variáveis antropométricas e bioquímicas foram obtidas também ao término do mesmo, como descrito anteriormente.

4.5 Investigação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)

4.5.1 Obtenção do DNA das amostras

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue em tubos com EDTA, de cada uma das participantes. Estes tubos foram encaminhados ao Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, onde sofreram centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos, sendo separadas a parte figurada do sangue da fração plasmática. Na fração figurada foi aplicada a técnica de salting-out (LAHIRI & NURNBERGER, 1991), de extração de DNA. Após a extração do DNA, foram verificadas a concentração, a pureza e a contaminação pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Pelos valores de concentração foram feitos os cálculos para diluição. As amostras foram estocadas em diluições de 20 ng/μL, específica para técnica de genotipagem realizada posteriormente.

4.5.2 Escolha dos polimorfismos

Os polimorfismos selecionados para o estudo foram escolhidos por um ou mais dos critérios a seguir: (1) estudos de associação anteriores onde o polimorfismo demonstrou ter relação com alterações no perfil lipídico ou marcadores de obesidade (IMC, CC e/ou CA); (2) desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos de cada gene, análise realizada através da plataforma online HapMap; (3) posição do polimorfismo no gene e (4) frequência dos alelos do polimorfismo nas populações.

4.5.3 Análises moleculares para identificação genotípica

Foram genotipados os polimorfismos de nucleotídeo único rs9939609 do gene *FTO*, rs1800977 e rs2230806 do gene *ABCA1*, rs2279796 do gene *ABCA7* e rs692383 e rs3827225 do gene *ABCG1*. As genotipagens foram feitas através do ensaio de discriminação alélica TaqMan® utilizando o equipamento 7500™ *Real Time PCR System* e algumas foram feitas no equipamento *Step One Plus™ Real Time PCR System* (Applied Biosystems). A quantidade e concentração dos reagentes utilizada para cada reação de amplificação de PCR está descrita na TABELA 2. As condições para que ocorrem as reações de amplificação foram: 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; e 50 ciclos com a sequência de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 62°C; e, para finalizar, 2 minutos a 60°C. Posteriormente, foi realizada a análise das fluorescências (VIC® e/ou FAM®) emitidas por cada amostra no software TaqMan Genotyper® (Applied Biosystems) para determinação dos genótipos. Estes genótipos foram conferidos e confirmados no software *online* da ThermoFisher®, para descartar erros de genotipagem.

TABELA 2. CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (PCR)

Reagentes	Concentração	Quantidade por reação
Master Mix	1X* / 0,8X**	3,0 µL
Sonda + Primers	0,5X	0,3 µL
DNA	20 ng/µL	3,0 µL
H ₂ O destilada	-	1,7 µL
Volume final	-	8 µL

NOTA: * Master Mix da marca Life®, utilizada para a genotipagem dos polimorfismos rs9939609 do gene *FTO*, rs1800977 e rs2230806 do gene *ABCA1* e rs2279796 do gene *ABCA7*. ** Master Mix da marca Roche® utilizada para a genotipagem dos polimorfismos e rs692383 e rs3827225 do gene *ABCG1*.

4.6 Organização e delineamento das análises

O estudo contou com dois tipos de análises para verificar a existência de efeito dos polimorfismos genéticos nos níveis de cada variável: uma análise transversal e uma longitudinal, onde as variáveis independentes consideradas foram os genótipos e as variáveis dependentes consideradas foram as demais variáveis (antropométricas e bioquímicas). Para o estudo transversal foi feita a medição das variáveis no momento antes e no momento depois da intervenção dietética (exceto variáveis genéticas), a fim de descrever a existência de associação entre as variáveis dependentes e independentes nesses dois momentos. Já para o estudo longitudinal verificou-se a variação das variáveis (medida pela diferença entre os momentos) promovidas pela intervenção dietética.

4.7 Análises Estatísticas

Os dados foram tabulados e armazenados em planilhas do Excel®. O levantamento das frequências alélicas e genóticas para cada um dos polimorfismos foi realizado por contagem direta e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado com o teste de χ^2 .

Testes de contingência foram aplicados para verificar diferenças na frequência dos genótipos e/ou dos alelos entre os grupos acima e abaixo da mediana para cada variável quantitativa.

A normalidade da distribuição das variáveis contínuas foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. Devido ao fato das variáveis não apresentarem distribuição normal, as comparações de médias foram realizadas por meio dos testes Mann Whitney para amostras independentes e Wilcoxon para amostras pareadas.

Para as análises baseadas em estratificação genotípica (comparação entre genótipos) os modelos de interação alélica de dominância, recessividade e codominância foram testados para todos os polimorfismos e o modelo mais adequado para cada um foi escolhido para discussão, baseado na literatura ou de acordo com os resultados obtidos.

A análise de regressão múltipla foi utilizada para avaliar modelos de causalidade entre variáveis independentes (polimorfismos avaliados) e dependentes (variáveis antropométricas e bioquímicas). Além disso, para os polimorfismos que se mostraram fatores independentes na determinação dos níveis e medidas das variáveis, foram realizadas análises de regressão logística no Programa R® para predição do risco com a utilização do pacote PREDICTABEL®.

A significância estatística adotada para os testes de probabilidade foi de 0,05 (5%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise descritiva e efeito da intervenção dietética

Independentemente do genótipo, a dieta foi eficiente na redução de IMC, circunferência da cintura e circunferência abdominal ($p < 0,001$ para todos), assim como na redução do colesterol total ($p = 0,008$) (Tabela 3), o que demonstra a importância da alimentação na redução e manutenção do peso saudável. Além disso, houve uma indesejável redução de HDL-c ($p < 0,001$).

TABELA 3 – COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS DE ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Variáveis	N	Antes \pm SD	Depois \pm SD	p
IMC (Kg/m²)	134	35,06 \pm 5,30	34,17 \pm 5,33	<0,001
CC (cm)	131	95,78 \pm 9,87	92,42 \pm 11,38	<0,001
CA (cm)	134	109,46 \pm 11,59	102,33 \pm 11,03	<0,001
CT (mg/dL)	133	190,4 \pm 36,32	187,92 \pm 34,81	0,008
HDL-c (mg/dL)	129	52,12 \pm 12,93	47,56 \pm 10,94	<0,001
TG (mg/dL)	132	137,75 \pm 67,57	142,63 \pm 74,17	0,994
LDL-c (mg/dL)	134	110,71 \pm 29,36	111,83 \pm 28,89	0,527
VLDL (mg/dL)	132	27,55 \pm 13,51	28,53 \pm 14,83	0,989

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

Analisando as diferenças médias das variáveis entre o antes e depois da intervenção dietética, houve uma redução média de 2,33 \pm 2,97 Kg no peso, 0,9 \pm 1,19 Kg/m² no IMC, 3,93 \pm 4,04 cm de circunferência da cintura e 7,71 \pm 5,25 cm de circunferência abdominal. Nos dados bioquímicos, houve redução média de 4,3 \pm 21,67 mg/dL no colesterol total e 4,42 \pm 6,39 mg/dL no HDL-c. Os dados de glicemia foram retirados das análises devido a problemas técnicos durante a coleta das amostras de sangue.

5.2 Polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*

Para o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*, foram identificados os genótipos de 199 das 211 mulheres que faziam parte da amostra. Não foi possível identificar o genótipo de todas devido à não amplificação dos segmentos do gene na reação de PCR (o mesmo vale para os demais polimorfismos genotipados neste trabalho). As frequências genotípicas deste polimorfismo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com a Tabela 4, onde também estão as frequências alélicas.

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS9939609 DO GENE *FTO*.

N	Frequência Alélica (%)		Desvio padrão	Frequência Genotípica (%)			p
	A	T		AA	AT	TT	
199	47,5	52,5	0,00125	25	44	31	0,219

NOTA: Valores de p correspondem ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise transversal, foi testada a influência da presença do alelo A na variação dos parâmetros antropométricos e bioquímicos no momento inicial (antes da intervenção) e final (depois da intervenção) (Tabela 5). Não foi identificado efeito da presença do alelo A nessas variáveis em nenhum dos momentos do estudo. O efeito do genótipo pode não ter sido detectado devido ao pequeno número amostral, o que reduz o poder estatístico da amostra.

PETKEVICIENE e colaboradores (2016) destacam que o fato de nem todos os portadores do alelo A de *FTO* estarem com sobrepeso ou obesidade indica que existem interações genéticas e/ou ambientais ainda não consideradas que podem favorecer ou retardar o ganho de peso.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO RS9939609 DO GENE *FTO* NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Variáveis	Antes da intervenção					Depois da intervenção				
	AA + AT		TT		p	AA + AT		TT		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD		N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m²)	93	35,07 ± 4,52	36	35,13 ± 6,44	0,411	91	34,28 ± 4,81	35	33,96 ± 5,82	0,431
CC (cm)	93	95,7 ± 9,57	36	96,49 ± 10,2	0,797	92	92,5 ± 11,11	38	92,97 ± 11,7	0,879
CA (cm)	130	109,29 ± 11,18	36	109,9 ± 12,27	0,985	93	102,81 ± 11,1	38	101,49 ± 10	0,61
CT (mg/dL)	130	190,94 ± 36,63	59	193,2 ± 35,57	0,727	91	186,6 ± 33,49	37	196,24 ± 36,25	0,192
HDL-c (mg/dL)	130	53,07 ± 13,94	59	50,78 ± 10,7	0,42	91	47,25 ± 11,12	37	49,05 ± 10,91	0,312
TG (mg/dL)	130	136,75 ± 62,2	59	145,44 ± 81,39	0,412	91	146,49 ± 71,87	37	142,11 ± 84,21	0,63
LDL-c (mg/dL)	130	110,62 ± 28,98	59	113,04 ± 31,35	0,835	91	110,05 ± 26,98	37	118,77 ± 33,65	0,247
VLDL (mg/dL)	130	27,35 ± 12,44	59	29,09 ± 16,28	0,412	91	29,3 ± 14,37	37	28,42 ± 16,84	0,63

NOTA: CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

Foi realizada, então, uma análise longitudinal para verificar se o alelo A do polimorfismo investigado influenciou nas mudanças das variáveis analisadas frente à intervenção dietética. Nesta análise, as diferenças (valores antes – valores depois) médias destas variáveis foram comparadas entre as portadoras do alelo A e as não portadoras (modelo dominante) (Tabela 6). Observou-se que as portadoras do alelo A não se beneficiaram igualmente da intervenção dietética, pois perderam, em média, 2,7 cm a menos de circunferência abdominal, e reduziram, em média, 3,03 mg/dL a mais seus níveis de HDL-c, comparadas às não portadoras (TT).

TABELA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO RS9939609 DO GENE *FTO*

Variáveis	AA + AT		TT		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m ²)	91	-0,77 ± 1,13	35	-1,29 ± 1,28	0,103
CC (cm)	89	-3,44 ± 4,3	35	-5,02 ± 3,25	0,143
CA (cm)	90	-6,88 ± 4,63	35	-9,58 ± 6,48	0,040
CT (mg/dL)	89	-5,64 ± 21,61	37	-0,7 ± 23,6	0,482
HDL-c (mg/dL)	89	-5,38 ± 6,76	37	-2,35 ± 5,33	0,027
TG (mg/dL)	90	-3,87 ± 43,27	37	-3,13 ± 63	0,378
LDL-c (mg/dL)	89	-1,4 ± 20,37	37	1,02 ± 18,51	0,620
VLDL (mg/dL)	90	0,77 ± 8,65	37	0,63 ± 12,6	0,379

NOTA: O cálculo das diferenças foi feito pela subtração simples das medidas de depois e antes da intervenção dietética. SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicérides.

Para confirmar se as diferenças, induzidas pela intervenção dietética, sofreram influência do alelo A do polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*, foi realizada uma análise de regressão múltipla, onde um modelo de causalidade entre as variáveis analisadas foi testado: os valores das diferenças (antes – depois da intervenção) de circunferência de cintura e de HDL-c foram incluídas como variáveis dependentes do efeito independente do polimorfismo rs9939609 e dos valores das

diferenças de IMC. O efeito do polimorfismo nas mudanças dessas variáveis em resposta a intervenção dietética foi confirmado, como é apresentado na Tabela 7.

TABELA 7 – ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP RS9939609 DO GENE *FTO*

Variável dependente	Variáveis independentes consideradas	$\beta \pm SE$	p
Varição de CA	Genótipo	2,03 \pm 1,02	0,047
	IMC	1,27 \pm 0,38	0,001
Varição no HDL-c	Genótipo	-2,7 \pm 1,31	0,042
	IMC	1,27 \pm 0,5	0,012

NOTA: O modelo de interação alélica considerado foi o de dominância do alelo A. Sendo CA: circunferência abdominal; β : coeficiente angular; SE: erro padrão.

Buscou-se, além disso, avaliar o quanto a presença do alelo A e a variação nos valores de IMC representam de risco para uma menor perda de circunferência abdominal e uma maior perda de HDL-c em função da intervenção dietética.

Para isso, foram realizados testes de predição de risco, resultando nos Gráficos 8A (para a variação de circunferência abdominal) e 8B (para a variação de HDL-c) contendo a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

Quanto maior a precisão do modelo de risco (composto pelas variáveis independentes) para a ocorrência do fenótipo desfavorável (nesse caso, perdas na circunferência abdominal abaixo da mediana (6,9 cm), e perdas nos níveis de HDL-c acima da mediana (4 mg/dL)), maior é a medida de AUC (*Area Under the ROC Curve*), ou seja, maior é a área acima da reta ($0,5 < AUC < 1$).

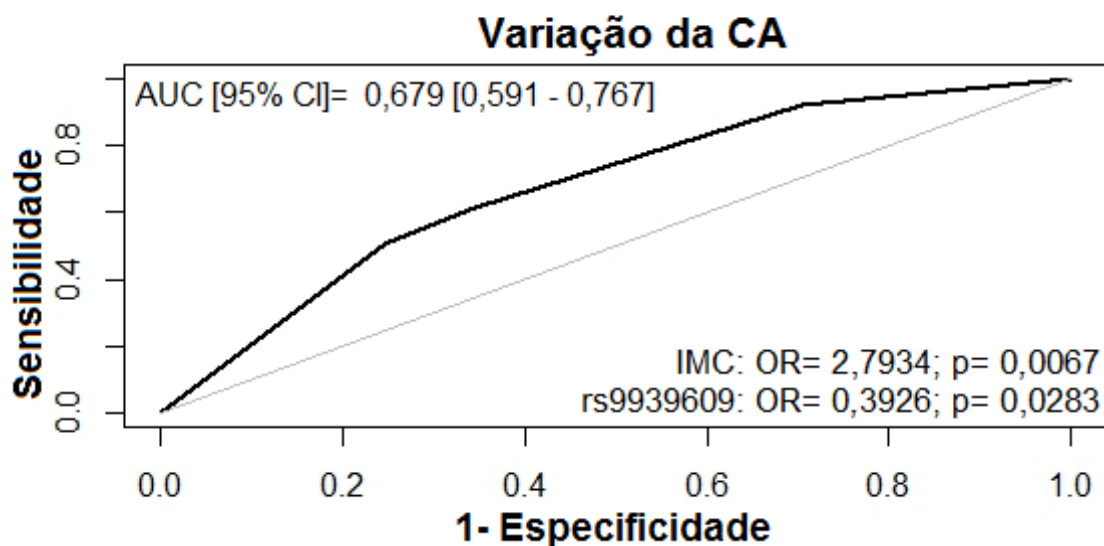
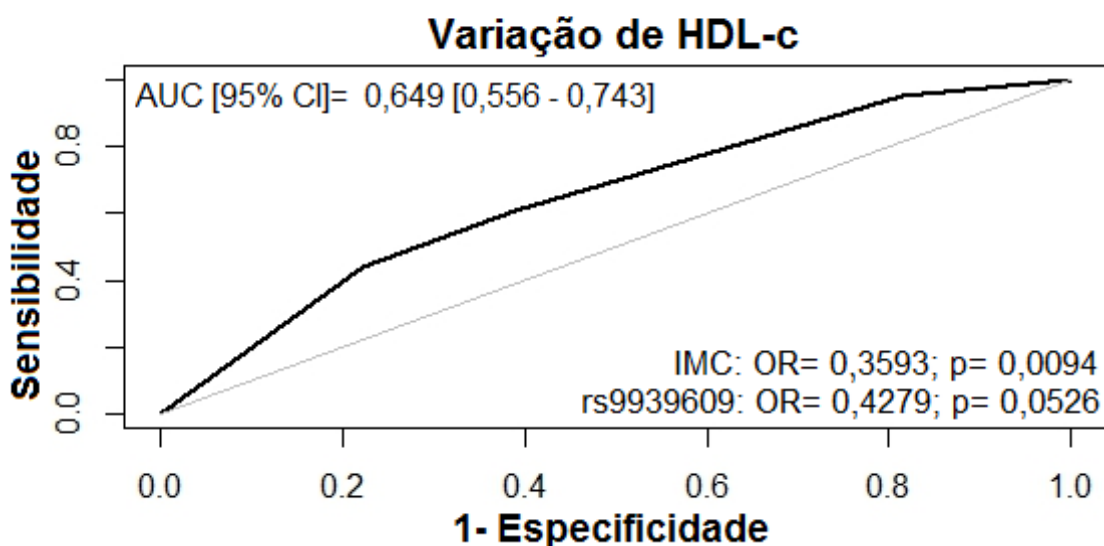
A**B**

GRÁFICO 8 – CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DO RISCO REPRESENTADO PELA PRESENÇA DO ALELO A DO SNP rs9939609 DO GENE *FTO* E DA VARIAÇÃO DE IMC NA DIMINUIÇÃO DE CA ABAIXO DA MEDIANA (A) E NA DIMINUIÇÃO DE HDL-C ACIMA DA MEDIANA (B). Sendo CA: circunferência abdominal; IMC: índice de massa corporal; CI: intervalo de confiança; OR: odds ratio.

Desta forma pode-se observar que a presença do alelo A conferiu um risco maior para a menor redução das medidas de circunferência abdominal (OR= 0,3926; p= 0,0283), assim como o mesmo alelo representou risco maior para a redução maior nos níveis de HDL-c (OR= 0,4279; p= 0,0526).

Segundo LIGUORI e colaboradores (2014), a função biológica no gene *FTO* em humanos não está totalmente esclarecida, mas existem fortes evidências sugerindo que ele influencia no comportamento alimentar. MARTINS e

colaboradores (2016) e RAUHIO e colaboradores (2013) encontraram em mulheres grávidas e mulheres não grávidas, respectivamente, associação do alelo A com um maior IMC. Na amostra deste estudo, porém, não foi confirmada associação do alelo A com um maior IMC. Esse fato pode ter sido influenciado pela composição da amostra que contou apenas com mulheres de IMC maior que 30Kg/m², restringindo os valores de IMC a uma faixa de variação pequena. Além disso, para checar tal associação seria também necessário comparar as frequências do alelo encontradas em nossa amostra com uma amostra de mulheres com valores de IMC dentro das faixas de normalidade.

A menor perda de circunferência abdominal estimulada pela intervenção dietética verificada entre as portadoras do alelo A pode ter sido causada, dentre outros possíveis fatores, pela associação deste alelo com maior ingestão de comida e redução da saciedade (FAROOQI, 2011; PETKEVICIENE *et al.*, 2016). Desta forma, as portadoras do alelo A podem ter ingerido mais energia do que as recomendações da dieta, prejudicando a perda de circunferência abdominal. Corroborando essa hipótese, LIVINSTONE e colaboradores (2015) encontraram, em uma meta-análise, que adultos portadores do alelo A ingerem significativamente mais gordura e proteínas.

Outrossim, podem haver mecanismos de atuação do *FTO* no tecido adiposo, os quais podem prejudicar a perda de peso e medidas mesmo durante uma dieta de restrição calórica. WAHLÉN e colaboradores encontraram uma atividade lipolítica 30% maior em mulheres saudáveis portadoras do genótipo TT do que nas portadoras do alelo A, independentemente do IMC. Além disso, KRING e colaboradores (2008) encontraram, em homens, associação do genótipo homocigoto AA com um maior depósito de gordura abdominal, além de mais gordura periférica. Destacam, porém, que esse aumento de gordura associado com *FTO* é devido a um aumento total da massa adiposa e não somente ao acúmulo de gordura abdominal. Em homens, aparentemente, a associação de *FTO* com o IMC está mais bem esclarecida do que em mulheres (RAUHIO *et al.*, 2013). Isso pode ser devido às modificações hormonais ocorridas ao longo da vida nas mulheres, que podem estar interagindo com o efeito deste gene e seus polimorfismos.

O fato das portadoras do alelo A apresentarem uma menor redução de circunferência abdominal após a intervenção dietética torna-se especialmente importante devido aos riscos associados ao acúmulo de gordura abdominal,

principalmente a visceral, em mulheres. As mulheres em menopausa possuem um aumento do acúmulo de gordura nessa região, comparadas as mulheres que não estão na menopausa, independentemente da quantidade de massa adiposa corporal. Esse aumento de gordura é devido, principalmente, à redução dos níveis de hormônios esteroides, particularmente o estrogênio, um importante fator de redistribuição de gordura por todo o corpo (TOTH *et al.*, 2000; KANALEY *et al.*, 2001). Desta forma, novas investigações são necessárias para verificação da existência de um maior acúmulo de gordura abdominal influenciada pelo alelo A do polimorfismo rs9939609 do gene *FTO* em mulheres pré e pós-menopausa, a fim de identificar possíveis interações hormonais com o efeito deste polimorfismo.

O fato das portadoras do alelo A perderem mais HDL-c do que as não portadoras e a confirmação de que o mesmo confere um risco maior para isso, corrobora o que LIGOURI e colaboradores (2014) encontraram em uma população obesa do sul da Itália, onde o polimorfismo rs9939609 foi associado com o aumento do risco em desenvolver doenças cardiovasculares e Síndrome Metabólica (SMet), uma complicação da obesidade, já que baixas concentrações de HDL-c constituem um fator de risco para estas doenças.

A SMet é caracterizada por hipertensão, hipertrigliceridemia, hiperglicemia, baixos níveis de HDL-c e obesidade. AL-ATTAR e colaboradores (2008) encontraram um aumento do risco de desenvolver a SMet em indivíduos não caucasianos portadores do alelo de risco (A), principalmente associado a baixos níveis de HDL-c. Os resultados encontrados neste trabalho reforçam a associação do polimorfismo rs9939609 com a obesidade e suas complicações. Estudos funcionais, porém, devem esclarecer as rotas metabólicas de atuação de *FTO*, a fim de se entender como atua este gene no desenvolvimento e propensão à obesidade e suas comorbidades.

5.3 Polimorfismo rs1800977 do gene *ABCA1*

Para o rs1800977 do gene *ABCA1* foram identificados os genótipos de 209 das 211 mulheres que faziam parte da amostra. As frequências genótípicas deste polimorfismo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como apresentado na Tabela 8, onde também estão as frequências alélicas.

TABELA 8 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS1800977 DO GENE *ABCA1*

N	Frequência Alélica (%)		Desvio padrão	Frequência Genotípica (%)			p
	A	G		AA	AG	GG	
209	37,3	62,7	0,01144	13,4	47,8	38,8	0,947

NOTA: Valores de p correspondem ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As médias das variáveis estratificadas pelo genótipo foram comparadas numa análise transversal, nos momentos antes e depois da intervenção dietética, para verificar a existência de diferenças entre portadoras e não portadoras do alelo A. Como pode ser visto na Tabela 9, não houveram diferenças significativas entre as portadoras e não portadoras do alelo A em nenhum dos momentos do estudo.

TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS1800977 DO GENE *ABCA1* NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Variáveis	Antes da intervenção					Depois da intervenção				
	AA + AG		GG		p	AA + AG		GG		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD		N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m²)	86	34,96 ± 5,36	52	35,21 ± 5,25	0,794	83	34,33 ± 5,52	52	33,91 ± 5,06	0,567
CC (cm)	86	95,64 ± 9,74	52	96,01 ± 10,18	0,956	86	92,49 ± 11,2	53	92,3 ± 11,76	0,695
CA (cm)	86	109,76 ± 11,54	52	108,97 ± 11,76	0,527	87	102,51 ± 11,12	53	102,03 ± 10,99	0,723
CT (mg/dL)	121	190,1 ± 35,88	77	190,3 ± 37,49	0,89	84	190,13 ± 32,78	52	184,35 ± 37,92	0,117
HDL-c (mg/dL)	121	52,04 ± 13,41	77	52,36 ± 12,37	0,380	84	48,07 ± 11,81	52	46,73 ± 9,41	0,814
TG (mg/dL)	121	136,37 ± 61,7	77	138,9 ± 76,47	0,944	84	143,28 ± 82,62	52	141,58 ± 58,72	0,418
LDL-c (mg/dL)	121	110,9 ± 29,33	77	109,93 ± 29,79	0,939	84	113,4 ± 28,97	52	109,3 ± 28,85	0,254
VLDL (mg/dL)	121	27,27 ± 12,34	77	27,78 ± 15,29	0,944	84	28,66 ± 16,52	52	28,31 ± 11,74	0,418

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicédeos.

Quando analisados os valores das diferenças das variáveis em função da intervenção aplicada, entretanto, houve diferença significativa entre as portadoras e as não portadoras do alelo A no IMC (Tabela 10).

TABELA 10 – COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS1800977 DO GENE *ABCA1*

Variáveis	AA + AG		GG		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m ²)	82	-0,66 ± 1,16	52	-1,3 ± 1,14	0,001
CC (cm)	81	-3,76 ± 4,37	51	-4,28 ± 3,47	0,662
CA (cm)	83	-7,82 ± 4,87	51	-7,53 ± 5,87	0,74
CT (mg/dL)	82	-3,55 ± 20,13	51	-5,98 ± 24	0,546
HDL-c (mg/dL)	83	-4,46 ± 6,17	51	-4,35 ± 6,78	0,978
TG (mg/dL)	83	4,69 ± 50,66	51	3,84 ± 42,9	0,97
LDL-c (mg/dL)	83	0,1 ± 18,55	51	-2,4 ± 20,44	0,503
VLDL (mg/dL)	83	0,94 ± 10,13	51	0,77 ± 8,58	0,951

NOTA: O cálculo das diferenças foi feito pela subtração simples das medidas de depois e antes da intervenção dietética. SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicédeos.

As portadoras do alelo A perderam, em média, 0,64 Kg/m² a menos de IMC do que as não portadoras. Não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos nos níveis de lipídeos séricos. GENGIVIR e colaboradores (2008) e PORCHAY-BALDÉRELLI e colaboradores (2008) também não encontraram diferenças significativas nos níveis de lipídeos séricos entre as portadoras do alelo A e não portadoras, em amostras da população brasileira e francesa, respectivamente.

PORCHAY-BALDÉRELLI e colaboradores (2009) encontraram, no entanto, uma frequência menor do genótipo AA em pacientes que sofreram infarto do miocárdio, ou seja, esse alelo pode estar associado a um efeito de proteção contra esta doença, mesmo sem alterar os níveis de lipídeos séricos. Controversamente, o

alelo A foi associado com infarto cerebral em uma amostra da população japonesa (YAMADA *et al.*, 2008).

O infarto cerebral é comumente causado pela deposição de placas ateroscleróticas (YAMADA *et al.*, 2008), sendo a sua etiologia semelhante a do infarto do miocárdio. A atuação da proteína ABCA1 nesse processo é a de proteção do leito vascular contra a aterosclerose, pois está diretamente relacionada com a formação de HDL-c, lipoproteína que realiza o transporte reverso do colesterol. O mecanismo que leva a esta associação encontrada por YAMADA e colaboradores (2008), porém, não está bem claro, portanto, essa associação pode ser devido a outros fatores que não a mudança dos níveis de lipídeos séricos.

Meta-análises podem ajudar na elucidação destes resultados controversos, pois conseguem fazer análises com um número maior de indivíduos, a partir de pesquisas já publicadas. Na meta-análise realizada por YIN e colaboradores (2015), foi encontrado que o risco de desenvolver aterosclerose em portadores do alelo A é 1,14 vezes maior do que em não portadores.

O fato da amostra estudada neste trabalho não apresentar diferenças significativas nos níveis de lipídeos séricos está de acordo com a literatura, pois, aparentemente, este polimorfismo não causa alterações nestas variáveis. Considerando a associação do alelo A com o risco aumentado em desenvolver aterosclerose (YIN *et al.*, 2015), os resultados encontrados para peso e IMC podem ajudar a elucidar essa questão. Obesos possuem uma maior circulação de energia, isso pode resultar no acúmulo de gordura em outros tecidos e este acúmulo está diretamente relacionado com dislipidemias, fator de risco para aterosclerose (MARCELIN; CHUA, 2010). A associação do alelo A com a aterosclerose pode ser devido a uma maior dificuldade na perda de peso e, conseqüentemente, menor redução do IMC em seus portadores, mesmo frente a uma intervenção dietética de redução calórica.

5.4 Polimorfismo rs2230806 do gene *ABCA1*

Para o polimorfismo rs2230806 do gene *ABCA1*, foram identificados os genótipos de 205 das 211 mulheres que faziam parte da amostra. As frequências genotípicas deste polimorfismo não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, de

acordo com a Tabela 11, onde também estão as frequências alélicas. Possíveis erros técnicos que resultassem no desequilíbrio das frequências foram descartados.

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS2230806 DO GENE *ABCA1*

N	Frequência Alélica (%)		Desvio padrão	Frequência Genotípica (%)			p
	C	T		CC	CT	TT	
205	60,0	40,0	0,01185	45,8	28,3	25,9	< 0,001

NOTA: O valor de p corresponde ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise transversal do momento antes da intervenção dietética, não foram identificadas diferenças significativas nas variáveis entre os três genótipos (Tabela 12). No momento depois da intervenção, por outro lado, houve diferença significativa entre os genótipos CC e TT nos níveis de colesterol total (Tabela 13). As portadoras do genótipo TT, ao fim da intervenção dietética, estavam com, em média, 14,17 mg/dL de colesterol total a menos que as portadoras do genótipo CC.

TABELA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS CC, CT E TT DO SNP RS22308066 DO GENE *ABCA1* ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Antes da intervenção									
Variáveis	CC		CT		TT		CC x CT	CC x TT	CT x TT
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	N	Média ± SD	p	p	p
IMC (Kg/m ²)	64	34,91 ± 5,13	38	34,36 ± 5,72	34	36,35 ± 5,15	0,582	0,114	0,07
CC (cm)	64	95,9 ± 9,53	38	94,8 ± 9,93	34	97,19 ± 10,61	0,714	0,609	0,367
CA (cm)	64	109,36 ± 10,81	38	107,99 ± 12,39	34	111,78 ± 12,26	0,535	0,389	0,243
CT (mg/dL)	89	191,09 ± 37,06	55	191,07 ± 39,04	50	185,52 ± 33,02	0,789	0,499	0,857
HDL-c (mg/dL)	89	51,0 ± 12,29	55	52,16 ± 12,94	50	53,48 ± 14,33	0,669	0,219	0,484
TG (mg/dL)	89	140,03 ± 80,99	55	137,78 ± 61,26	50	129,74 ± 46,54	0,882	0,928	0,802
LDL-c (mg/dL)	89	112,03 ± 30,49	55	111,35 ± 31,02	50	106,09 ± 25,89	0,617	0,342	0,686
VLDL (mg/dL)	89	28,01 ± 16,2	55	27,5564 ± 12,25	50	25,95 ± 9,31	0,882	0,928	0,802

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

TABELA 13 – COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS CC, CT E TT DO SNP RS2230806 DO GENE *ABCA1* DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Depois da intervenção									
Variáveis	CC		CT		TT		CC x CT	CC x TT	CT x TT
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	N	Média ± SD	p	p	p
IMC (Kg/m ²)	64	34,18 ± 5,09	37	33,37 ± 5,91	33	35,19 ± 5,11	0,376	0,271	0,081
CC (cm)	68	92,72 ± 10,94	37	91,45 ± 11,84	33	93,18 ± 12,04	0,562	0,957	0,564
CA (cm)	69	102,45 ± 11,2	37	100,57 ± 10,37	33	104,44 ± 11,29	0,54	0,413	0,184
CT (mg/dL)	66	190,62 ± 31,37	37	191,81 ± 41,82	31	176,45 ± 32,13	0,804	0,048	0,21
HDL-c (mg/dL)	66	46,57 ± 10,32	37	49,94 ± 11,42	31	45,84 ± 10,59	0,126	0,76	0,144
TG (mg/dL)	66	145,42 ± 80,72	37	145,94 ± 78,09	31	131,74 ± 55,28	0,904	0,668	0,693
LDL-c (mg/dL)	66	114,96 ± 28,96	37	112,67 ± 33,34	31	104,26 ± 22,43	0,364	0,079	0,385
VLDL (mg/dL)	66	29,08 ± 16,14	37	29,19 ± 15,62	31	26,35 ± 11,05	0,904	0,668	0,693

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

As portadoras do genótipo TT beneficiaram-se mais da dieta do que as portadoras do genótipo GG para redução dos níveis de colesterol total. Enquanto que a perda de colesterol nas portadoras do genótipo GG não foi significativa ($p=0,239$), as portadoras do genótipo TT perderam 9,07 mg/dL ($p=0,011$). Esses resultados demonstram o possível efeito de proteção do genótipo TT contra altos níveis de colesterol. Este efeito nos níveis de colesterol não foi encontrado numa amostra de homens (KITJAROENTHAM *et al.*, 2007), no entanto, os níveis de HDL-c foram significativamente menores em obesos do que nos indivíduos controle (eutróficos) portadores do alelo T (genótipos TT e CT). As diferenças nos níveis de HDL-c em obesos encontrada por estes pesquisadores pode ser devido a comparação entre os níveis de lipídeos entre obesos e não-obesos, pois já esperase que os primeiros possuam níveis de HDL-c menores, influenciados pelo IMC alto.

Para verificar se o alelo T é mais frequente no grupo de mulheres com valores abaixo ou mais frequente no grupo de mulheres com valores acima da mediana das variáveis, foi feito um teste de contingência. Neste teste foram identificadas as medianas de cada variável, e contabilizados os alelos T e C em cada grupo (abaixo e acima da mediana), partindo daí para a comparação de suas frequências entre esses grupos, tanto para o momento antes quanto para depois da intervenção.

No momento antes da intervenção dietética, o alelo T foi mais frequente do que o alelo C no grupo de mulheres com valores de IMC maiores que a mediana ($34,16 \text{ Kg/m}^2$) ($p=0,029$). Este resultado é controverso, pois indica uma possível associação do alelo T com um maior IMC, mas explica o fato das frequências genóticas da amostra serem diferentes das esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde foi encontrada uma frequência do genótipo TT maior do que a esperada para o equilíbrio (observado= 53; esperado= 32,8; $\chi^2= 12,5562$).

O alelo T também foi mais frequente do que o alelo C no grupo de mulheres com valores de HDL-c maiores que a mediana (49,5 mg/dL) ($p=0,017$). Este resultado corrobora a relação deste alelo com efeito protetivo contra doenças cardiovasculares, já que concentrações maiores de HDL-c estão associadas a esse efeito. Se a presença do alelo T está possivelmente associada a maiores concentrações de HDL-c sérico, esse alelo está, então, provavelmente associado com a proteção contra doenças cardiovasculares, considerando que HDL baixo (<50 mg/dL para mulheres) é uma dislipidemia de risco para doenças cardiovasculares.

Estes resultados estão de acordo com o que WANG e colaboradores (2010) encontraram, e reforçam a hipótese de efeito protetivo do alelo T contra doença arterial coronariana. Esses autores encontraram em uma amostra da população chinesa que portadores do genótipo TT possuíam níveis maiores de apoA-I e uma tendência ($p= 0,06$) de níveis menores de triglicerídeos comparados aos portadores do alelo C. A apoA-I é a proteína receptora de lipídeos, sendo boa parte destes transportados para fora da célula por intermédio da proteína ABCA1 e formando, assim, partículas de HDL-c, ou seja, a apoA-I está associada a um efeito protetivo contra a formação de placas ateroscleróticas. Além disso, esses autores encontraram níveis de HDL-c maiores nas mulheres portadoras do alelo T do que nas não portadoras (genótipo CC), assim como maiores níveis de apoA-I.

O efeito protetivo do alelo T foi encontrado nesse estudo, no entanto, não é confirmado para todas as diferentes populações. PASDAR e colaboradores (2007), por exemplo, associaram o alelo T com níveis menores de triglicerídeos em indivíduos que sofreram isquemia cerebral, mas não nos controles. Essa relação encontrada nos indivíduos que sofreram isquemia, entretanto, pode não ser de associação direta com a doença, ou seja, ela pode ter sido causada por outros fatores não relacionados com o gene *ABCA1* nos pacientes.

No momento após a intervenção dietética a frequência do alelo T nos grupos abaixo e acima da mediana para o IMC e o HDL-c não diferiram significativamente das frequências do alelo C. As mulheres na amostra tiveram redução de IMC e HDL-c, independentemente do genótipo, sugerindo que o efeito do alelo C (de risco) pode ter sido atenuado pela dieta. Por outro lado, o alelo T foi mais frequente do que o alelo C no grupo de mulheres com valores de LDL-c menores que a mediana (110,7 mg/dL) ($p= 0,031$). Mesmo depois da intervenção dietética o efeito protetivo do alelo T se manteve e até ficou em maior evidência, pois o mesmo não foi encontrado para LDL-c no momento antes da dieta, ou seja, o benefício da dieta ficou mais evidente no grupo de mulheres portadoras do alelo T.

5.5 Polimorfismo rs2279796 do gene *ABCA7*

Das 211 mulheres que compunham a amostra, 201 tiveram seus genótipos identificados para o polimorfismo rs2279796 do gene *ABCA7*. As frequências genotípicas deste polimorfismo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com a Tabela 14, onde também estão as frequências alélicas.

TABELA 14 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS2279796 DO GENE *ABCA7*

N	Frequência Alélica (%)		Desvio padrão	Frequência Genotípica (%)			p
	A	G		AA	AG	GG	
201	46,0	54,0	0,01239	21,4	49,25	29,35	0,992

NOTA: Valores de p correspondem ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise transversal do momento antes da intervenção dietética (Tabela 15), houve diferença significativa nas variáveis de perfil lipídico quando o genótipo GG foi comparado com os genótipos AA e AG, separadamente. Na comparação entre os três genótipos, as portadoras do genótipo GG apresentaram uma média de colesterol total de 13,53 mg/dL a mais que as portadoras do genótipo AG e 22,5 mg/dL a mais que as portadoras do genótipo AA. Da mesma forma, as portadoras do genótipo GG apresentaram, em média, 11,77 mg/dL a mais de LDL-c que as portadoras do genótipo AG e 20,4 mg/dL a mais que as portadoras do genótipo AA. Estes resultados sugerem um efeito aditivo entre os alelos A e G, onde as portadoras do genótipo AA possuíam os menores níveis de colesterol total e LDL-c, as portadoras do genótipo AG possuíam níveis intermediários (porém não significativamente diferentes das portadoras do genótipo AA) e as portadoras do genótipo GG apresentaram os maiores níveis.

No momento depois da intervenção (Tabela 16), a diferença entre os genótipos AA e GG se manteve. As portadoras do genótipo AA apresentaram uma redução de 18,07 mg/dL a mais nos níveis de colesterol total e de 13,81 mg/dL a mais no LDL-c do que as portadoras do genótipo GG. Esse efeito pode ser devido ao fato de que a dieta não proporcionou redução significativa de colesterol total em nenhum dos genótipos separadamente (p= 0,052 para AA; p= 0,068 para AG e p=

0,188 para GG) (dados não apresentados), assim como não houve redução significativa nos níveis de LDL-c ($p= 0,379$ para AA; $p= 0,728$ para AG e $p= 0,603$ para GG) (dados não apresentados), mantendo as diferenças encontradas no momento antes da intervenção e, conseqüentemente, o efeito do genótipo.

Quando analisados os valores das diferenças das variáveis em função da intervenção aplicada, as diferenças encontradas no perfil lídico se mantiveram, mas em variáveis diferentes (Tabela 17). As portadoras do genótipo AA perderam triglicerídeos e VLDL, enquanto que as portadoras do genótipo AG e GG ganharam, em resposta a intervenção dietética. As portadoras do genótipo AA reduziram 10,83 mg/dL a mais seus níveis de triglicerídeos e 2,16 mg/dL a mais seus níveis de VLDL que as portadoras do genótipo AG ($p= 0,041$ e $p= 0,04$, respectivamente). Em comparação com o genótipo GG, as portadoras do genótipo AA apresentaram uma tendência de maior redução dos níveis de triglicerídeos e VLDL ($p= 0,079$ e $p=0,078$, respectivamente).

TABELA 15 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS AA, AG E GG DO SNP RS2279796 DO GENE *ABCA7* ANTES DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Antes da intervenção									
Variáveis	AA		AG		GG		AA x AG	AA x GG	AG x GG
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	N	Média ± SD	p	p	p
IMC (Kg/m ²)	33	34,74 ± 4,62	63	35,05 ± 5,32	37	35,87 ± 5,89	0,975	0,572	0,537
CC (cm)	33	94,3 ± 9,24	63	95,82 ± 9,31	37	97,5 ± 11,46	0,337	0,317	0,57
CA (cm)	33	107,72 ± 10,07	63	110,13 ± 11,39	37	110,59 ± 13,54	0,385	0,568	0,974
CT (mg/dL)	42	178,59 ± 35,26	92	187,56 ± 33,93	56	201,09 ± 36,75	0,163	0,002	0,017
HDL-c (mg/dL)	42	52,55 ± 14,69	92	51,01 ± 11,88	56	52,95 ± 12,25	0,992	0,57	0,441
TG (mg/dL)	42	130,93 ± 55,5	92	139,38 ± 73,29	56	140,59 ± 69,04	0,488	0,352	0,965
LDL-c (mg/dL)	42	99,86 ± 27,14	92	108,49 ± 27,28	56	120,26 ± 30,66	0,071	0,0002	0,013
VLDL (mg/dL)	42	26,18 ± 11,1	92	27,88 ± 14,66	56	28,12 ± 13,81	0,488	0,352	0,965

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

TABELA 16 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS AA, AG E GG DO SNP RS2279796 DO GENE *ABCA7* DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA.

Depois da intervenção									
Variáveis	AA		AG		GG		AA x AG	AA x GG	AG x GG
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	N	Média ± SD	p	p	p
IMC (Kg/m ²)	32	33,61 ± 4,79	62	34,19 ± 5,21	37	34,83 ± 5,87	0,675	0,52	0,803
CC (cm)	33	90,91 ± 11,51	62	92,53 ± 10,94	40	94,07 ± 12,3	0,409	0,251	0,51
CA (cm)	33	100,48 ± 10,46	63	102,51 ± 10,81	40	103,93 ± 12,07	0,373	0,218	0,586
CT (mg/dL)	33	178,39 ± 32,5	61	186,75 ± 33,62	37	196,46 ± 36,1	0,314	0,041	0,214
HDL-c (mg/dL)	33	47,27 ± 12,1	61	47,72 ± 9,58	37	47,57 ± 11,44	0,555	0,934	0,441
TG (mg/dL)	33	134,39 ± 90,09	61	139,61 ± 68,33	37	154,19 ± 72,03	0,342	0,103	0,281
LDL-c (mg/dL)	33	104,24 ± 28,47	61	111,11 ± 29,58	37	118,05 ± 25,56	0,193	0,023	0,21
VLDL (mg/dL)	33	26,88 ± 18,02	61	27,92 ± 13,67	37	30,84 ± 14,45	0,342	0,103	0,281

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

TABELA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS DOS GENÓTIPOS AA, AG E GG DO SNP RS2279796 DO GENE ABCA7

Variáveis	AA		AG		GG		AA x AG	AA x GG	AG x GG
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	N	Média ± SD	p	p	p
IMC (Kg/m ²)	32	-1,09 ± 0,74	62	-0,85 ± 1,09	37	-1,04 ± 1,3	0,076	0,652	0,435
CC (cm)	32	-3,85 ± 4,29	61	-3,52 ± 4,08	37	-4,39 ± 3,69	0,312	0,863	0,194
CA (cm)	32	-7,54 ± 5,47	62	-7,91 ± 5,22	36	-7,73 ± 5,41	0,552	0,694	0,696
CT (mg/dL)	33	-2,67 ± 21,12	59	-4,53 ± 16,68	36	-6,32 ± 29,34	0,864	0,944	0,928
HDL-c (mg/dL)	33	-4,52 ± 5,26	59	-4,66 ± 6,75	37	-4,51 ± 7,05	0,619	0,972	0,772
TG (mg/dL)	33	-3,25 ± 59,04	59	7,58 ± 40,33	37	6,65 ± 49,6	0,041	0,079	0,775
LDL-c (mg/dL)	33	2,7 ± 18,86	59	-1,38 ± 15,97	37	-3,49 ± 24,59	0,563	0,394	0,71
VLDL (mg/dL)	33	-0,65 ± 11,81	59	1,51 ± 8,07	37	1,33 ± 9,92	0,04	0,078	0,77

NOTA: O cálculo das diferenças foi feito pela subtração simples das medidas de depois e antes da intervenção dietética. SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

O teste de regressão múltipla considerando o colesterol total e o LDL-c como variáveis dependentes deste polimorfismo e dos valores de IMC confirmou os resultados encontrados no momento antes da intervenção dietética. Já no momento depois da intervenção, a regressão múltipla não confirmou o efeito dos genótipos sobre de LDL-c, porém mostrou uma tendência de associação dos genótipos com o colesterol total, como é apresentado na Tabela 18.

TABELA 18 – ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP RS2279796 DO GENE ABCA7

Variável dependente	Variáveis independentes consideradas	$\beta \pm SE$	p
CT 1	Genótipo	11,95 \pm 4,3	0,0063
	IMC 1	-1,66 \pm 0,59	0,006
LDL-c 1	Genótipo	9,85 \pm 3,53	0,0061
	IMC 1	2,44 \pm 0,49	0,0268
CT 2	Genótipo	8,18 \pm 4,21	0,054
	IMC 2	-0,81 \pm 0,56	0,152
LDL-c 2	Genótipo	5,7 \pm 3,54	0,11
	IMC 2	-0,45 \pm 0,48	0,34

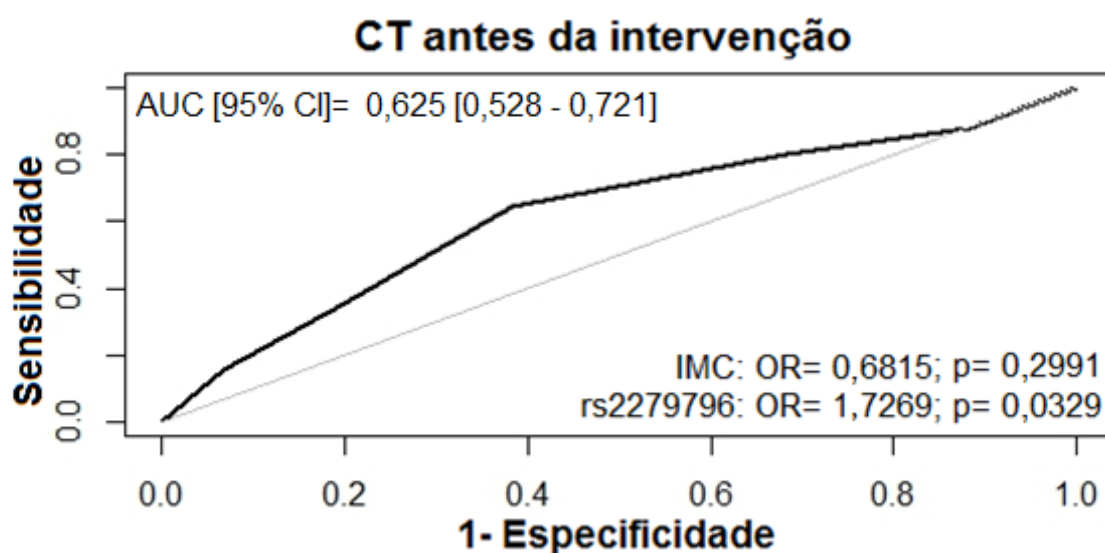
NOTA: O modelo de interação alélica considerado foi o de ausência de dominância. Os valores de CT 1, LDL-c 1 e IMC 1 correspondem aos valores do momento antes da intervenção dietética. Os valores de CT 2, LDL-c 2 e IMC 2 aos valores do momento depois da intervenção dietética. Sendo CT: colesterol total; IMC: índice de massa corporal; β : coeficiente angular; SE: erro padrão.

Para testar com que precisão pode-se afirmar que há influência dos genótipos e do IMC (variáveis independentes) sobre o colesterol total e LDL-c (variáveis dependentes) nos momentos antes e depois da intervenção, foram realizados testes de predição de risco, resultando nos Gráficos 9A (para o colesterol total antes da intervenção), 9B (para o colesterol total depois da intervenção), 10A (para LDL-c antes da intervenção) e 10B (para LDL-c depois da intervenção, que contém a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*)).

Quanto maior a precisão do modelo de risco (composto pelas variáveis independentes) para a ocorrência do fenótipo desfavorável (nesse caso, valores de CT antes acima da mediana (185 mg/dL); CT depois acima da mediana (187 mg/dL),

LDL-c antes maior que a mediana (106,2 mg/dL); LDL-c depois maior que a mediana (110,2 mg/dL)), maior é a medida de AUC (*Area Under the ROC Curve*), ou seja, maior é a área acima da reta ($0,5 < AUC < 1$).

A



B

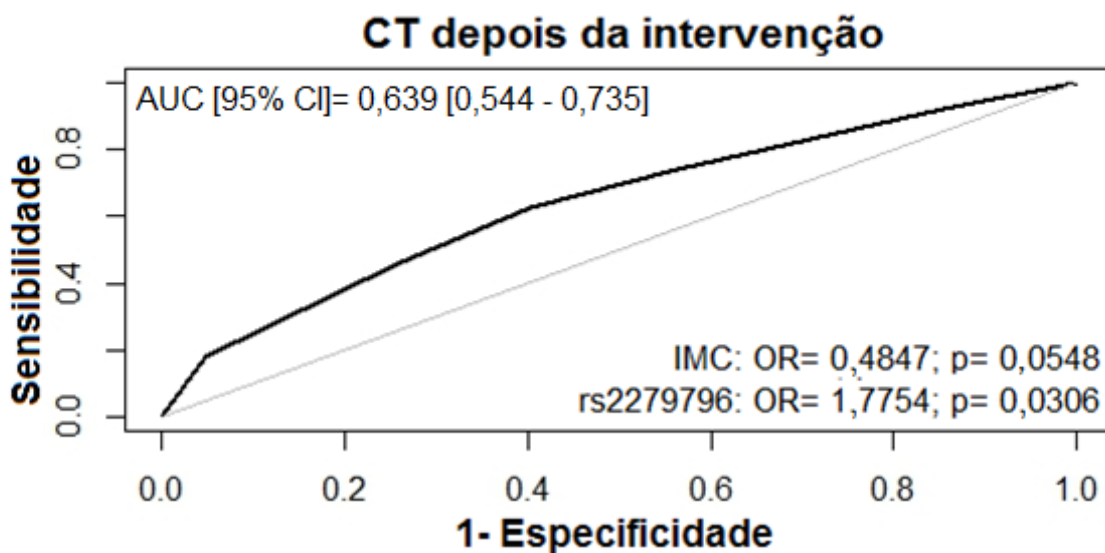
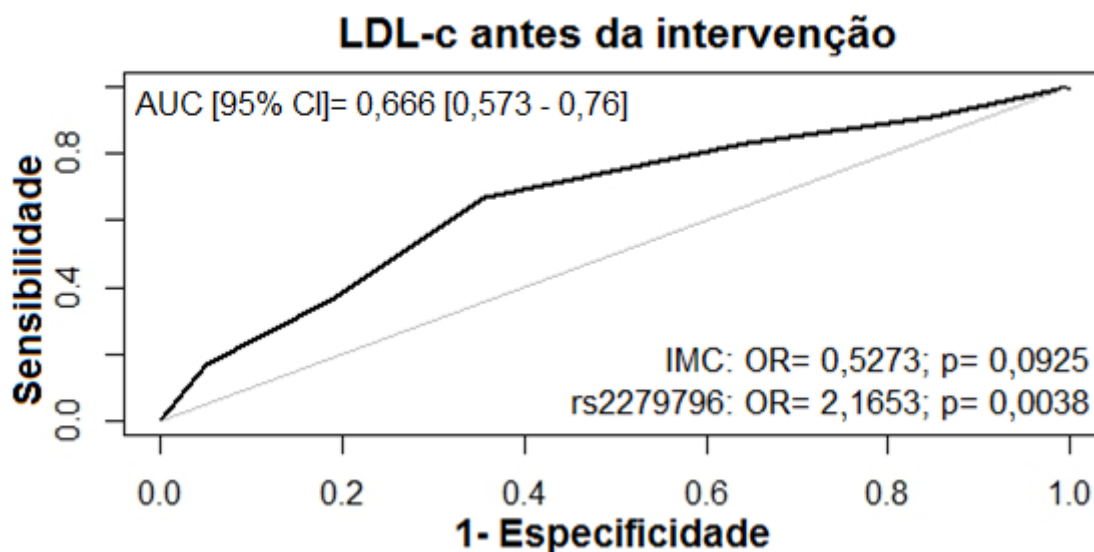


GRÁFICO 9 – CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS PARA O SNP rs2279796 DO GENE ABCA7 E DOS VALORES DE IMC NO CT ANTES (A) E NO CT DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA (B). Sendo: CT: colesterol total; IMC: índice de massa corporal; CI: intervalo de confiança; OR: *odds ratio*.

A



B

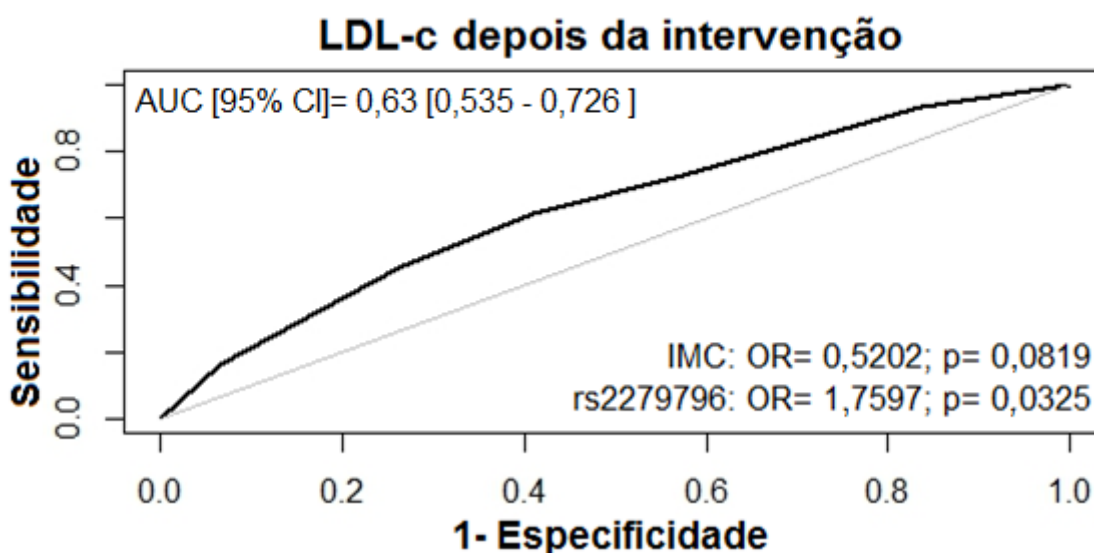


GRÁFICO 10 – CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DA PRECISÃO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS PARA O SNP rs2279796 DO GENE ABCA7 E DOS VALORES DE IMC NO LDL-C ANTES (A) E NO LDL-C DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA (B). Sendo: IMC: índice de massa corporal; CI: intervalo de confiança; OR: odds ratio.

Desta forma pode-se observar que o genótipo GG conferiu um risco de OR= 1,7269 ($p= 0,0329$) vezes maior de que as suas portadoras tivessem níveis de colesterol total maiores que a mediana (185,0 mg/dL) e um risco de OR= 2,1653 ($p= 0,0038$) de que suas portadoras tivessem níveis de LDL-c maiores que a mediana (106,2 mg/dL) no momento antes da dieta. No momento depois da intervenção dietética, também foi confirmado o risco de OR= 1,7754 ($p= 0,0306$) vezes maior de as portadoras do genótipo GG tivessem níveis de colesterol total maiores que a

mediana (187,0 mg/dL) e o risco de OR= 1,7597 ($p= 0,0325$) vezes maior de as portadoras deste genótipo tivessem níveis de LDL-c maiores que a mediana (110,2 mg/dL).

Para verificar se o alelo G é mais frequente no grupo de mulheres com valores abaixo ou acima da mediana das variáveis, foi feito um teste de contingência onde foram verificadas as medianas de cada variável, feito um levantamento da quantidade de alelos A e G nos grupos abaixo e acima da mediana e as frequências de cada grupo foram comparadas. No momento antes da intervenção dietética, o alelo G teve uma frequência maior do que o alelo A no grupo de mulheres com valores de colesterol total acima da mediana (185,0 mg/dL) ($p < 0,001$). Da mesma forma, no momento depois da intervenção dietética, o alelo G foi mais frequente do que o alelo A no grupo de mulheres com valores de LDL-c maiores que a mediana (110,2 mg/dL) ($p= 0,013$). Tendências de associação também foram encontradas para triglicerídeos e VLDL, onde o alelo G teve uma maior frequência no grupo de mulheres com níveis acima da mediana (121,0 mg/dL e 24,2 mg/dL, respectivamente) ($p= 0,083$ para ambas variáveis). Desta forma, o alelo G parece estar associado a maiores níveis de colesterol total, LDL-c, triglicerídeos e VLDL.

A proteína ABCA7 possui cerca de 60% de homologia com a proteína ABCA1, mas as suas funções de transporte são diferentes. WANG e colaboradores (2003) mostraram que, como ABCA1, a proteína ABCA7 também possui ligação com apoA-I e transporta, por mediação desta quando está com baixa concentração de lipídeos, fosfolipídeos para fora da célula. Entretanto, a proteína ABCA7, diferentemente da ABCA1, não promove efluxo de colesterol para apoA-I. Não obstante, foi verificado que em macrófagos a expressão do gene *ABCA7* é sensível aos níveis de colesterol dentro da célula, de forma que quanto maiores os níveis de colesterol, menores os seus níveis de expressão (KAMINSKI *et al.*, 2000). A indução da redução da expressão de *ABCA7* não resultou na alteração dos níveis de efluxo de lipídeos de macrófagos e isso faz com que o papel da proteína ABCA7 na regulação dos níveis de lipídeos séricos continue desconhecido.

Embora a contribuição de ABCA7 para o efluxo de lipídeos não pareça ser significativa, esta proteína pode estar desempenhando seu papel em microambientes de tecidos específicos. Considerando que os rins são um importante local de catabolismo de apoA-I e que a expressão de *ABCA7* já foi detectada nesse órgão, assim como de outros genes para transportadores ABC, a proteína ABCA7

pode estar atuando nos túbulos renais por modificações no HDL e em apolipoproteínas (LINSEL-NITSCHKE *et al.*, 2005). Desta forma, são necessários mais estudos sobre a atuação do gene *ABCA7* para explicar o efeito encontrado do polimorfismo rs2279796 sobre os níveis de colesterol e LDL-c nesta amostra de mulheres obesas.

5.6 Polimorfismo rs692383 do gene *ABCG1*

Para o polimorfismo rs692383 do gene *ABCG1*, foram identificados os genótipos de 209 das 211 mulheres que compunham a amostra. As frequências genotípicas deste polimorfismo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com a Tabela 19, onde também estão as frequências alélicas.

TABELA 19 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS692383 DO GENE *ABCG1*

N	Frequência Alélica (%)		Desvio padrão	Frequência Genotípica (%)			p
	A	G		AA	AG	GG	
209	56,9	43,1	0,01199	34,93	44,02	21,05	0,335

NOTA: Valores de p correspondem ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise transversal do momento antes da intervenção dietética, as portadoras do alelo G (genótipos AG e GG) apresentaram um IMC significativamente maior que as portadoras do genótipo homozigoto AA. As portadoras do alelo G apresentaram uma média de 2,28 Kg/m² a mais do que as não portadoras (p= 0,015). Já nos parâmetros bioquímicos, as portadoras do alelo G apresentaram níveis significativamente menores de triglicérides e VLDL, sendo uma diferença de 18,85 mg/dL e 3,77 mg/dL, respectivamente, comparadas às portadoras do genótipo homozigoto AA (p= 0,019 para ambos) (Tabela 20).

Na análise transversal do momento depois da intervenção dietética, as portadoras do alelo G comparadas às portadoras do genótipo AA mantiveram a diferença de IMC encontrada no momento antes da intervenção, com uma diferença média de 2,25 Kg/m² a mais (p= 0,023). Supõe-se que a intervenção dietética, não foi suficientemente eficiente em sustar o efeito aparente do alelo G sobre o IMC,

mantendo-o maior do que nas portadoras do genótipo homozigoto AA. Outrossim, a dieta também evidenciou uma possível associação do alelo G com uma circunferência abdominal maior nas portadoras desse alelo do que as homozigotas AA, com uma diferença média de 4,3 cm a mais ($p= 0,026$) (Tabela 20).

TABELA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO G DO SNP RS692383 DO GENE *ABCG1* NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Variáveis	Antes da intervenção					Depois da intervenção				
	AA		AG + GG		p	AA		AG + GG		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD		N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m²)	50	33,6 ± 4,69	88	35,88 ± 5,21	0,015	50	32,69 ± 4,41	85	35,04 ± 5,17	0,023
CC (cm)	50	94,17 ± 9,08	88	96,7 ± 9,64	0,164	49	90,46 ± 10,55	90	93,48 ± 11,22	0,133
CA (cm)	50	107,64 ± 10,35	88	110,5 ± 11,2	0,171	50	99,56 ± 10,47	90	103,86 ± 10,99	0,026
CT (mg/dL)	70	195,37 ± 40,24	128	187,34 ± 36,9	0,23	49	189,78 ± 38,86	87	186,87 ± 34,9	0,77
HDL-c (mg/dL)	70	52,47 ± 14,34	128	52,0 ± 12,58	0,867	49	46,02 ± 10,75	87	48,43 ± 10,75	0,19
TG (mg/dL)	70	149,54 ± 67,94	128	130,69 ± 60,39	0,019	49	156,73 ± 81,55	87	134,69 ± 77,38	0,136
LDL-c (mg/dL)	70	113,18 ± 32,78	128	109,06 ± 30,25	0,435	49	112,41 ± 32,79	87	111,51 ± 28,34	0,867
VLDL (mg/dL)	70	29,91 ± 13,59	128	26,14 ± 12,08	0,019	49	31,35 ± 16,31	87	26,94 ± 15,48	0,136

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

As diferenças (valores antes – valores depois da intervenção dietética) foram comparadas entre as portadoras e as não portadoras do alelo G para cada variável (Tabela 21). Do mesmo modo que a análise do momento depois da intervenção dietética mostrou, as portadoras do genótipo AA perderam, em média, 1,3 cm a mais de circunferência abdominal do que as portadoras do alelo G ($p= 0,033$). Dentre as variáveis bioquímicas, a redução dos níveis de o HDL-c foi menor nas portadoras do alelo G do que nas portadoras do genótipo homozigoto AA, sendo essa diferença média de 2,59 mg/dL ($p= 0,037$).

TABELA 21 – COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO G DO SNP RS692383 DO GENE ABCG1

Variáveis	AA		AG + GG		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m ²)	50	-0,84 ± 1,06	85	-0,9 ± 1,26	0,586
CC (cm)	48	-3,95 ± 3,72	85	-3,84 ± 4,23	0,764
CA (cm)	49	-8,5 ± 4,5	85	-7,2 ± 5,61	0,033
CT (mg/dL)	49	-9,0 ± 24,43	85	-2,93 ± 19,92	0,202
HDL-c (mg/dL)	49	-6,0 ± 7,67	85	-3,41 ± 5,31	0,037
TG (mg/dL)	49	-12,0 ± 45,01	85	6,0 ± 49,36	0,44
LDL-c (mg/dL)	49	-4,0 ± 23,63	85	-0,72 ± 16,37	0,624
VLDL (mg/dL)	49	-2,4 ± 9,0	85	1,2 ± 9,87	0,453

NOTA: O cálculo das diferenças foi feito pela subtração simples das medidas de depois e antes da intervenção dietética. SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

Juntamente com os resultados encontrados na análise transversal do momento antes da intervenção dietética para os triglicerídeos e o VLDL, o fato das portadoras do alelo G perderem menos HDL-c do que as não portadoras após a intervenção dietética, é um indicativo de que este alelo pode ter uma associação com menores níveis de triglicerídeos e LDL-c e de uma menor redução dos níveis de HDL-c e, conseqüentemente, esses fatores indicam que o alelo G pode ter um efeito de proteção contra doenças cardiovasculares. É necessário, no entanto, ter cautela na

análise exclusivamente do perfil lipídico, pois o alelo G também foi associado com uma circunferência abdominal maior após e uma menor redução em resposta a intervenção dietética. De fato, existe associação entre o acúmulo de gordura abdominal e o aumento do risco em desenvolver doenças cardiovasculares (TOTH *et al.*, 2000; KANALEY *et al.*, 2001), portanto, são necessárias novas investigações para elucidar os efeitos aparentemente contraditórios encontrados para este polimorfismo nesta amostra.

Analisando os resultados encontrados para o momento depois da intervenção, sugere-se que o efeito do alelo A sobre os níveis de triglicerídeos e LDL-c, encontrados no momento antes, pode ter sido neutralizado pela dieta, pois verificou-se uma redução da diferença entre as portadoras do alelo G e as portadoras do genótipo AA. De modo geral, sem considerar os genótipos, as mulheres reduziram os níveis de HDL-c após a intervenção dietética (de 52,17 mg/dL para 47,56 mg/dL; $p < 0,0001$), não obstante, ficou evidenciado que as portadoras do alelo G reduziram menos os seus níveis, o que fortalece a associação deste alelo com a proteção contra doenças cardiovasculares.

Ademais, no teste de contingência para verificar se as frequências dos alelos A e G eram diferentes nos grupos de mulheres com valores menores ou maiores que a mediana de cada variável, encontrou-se uma frequência do alelo G significativamente maior do que o alelo A no grupo de mulheres com níveis de triglicerídeos abaixo da mediana (129,5 mg/dL) ($p = 0,0329$) no momento antes da intervenção dietética, corroborando o possível efeito de proteção deste alelo. No momento depois da intervenção dietética, no entanto, o alelo G foi significativamente mais frequente do que o alelo A no grupo de mulheres com níveis de colesterol total acima da mediana (188,0 mg/dL) ($p = 0,015$). Quando comparados os níveis de colesterol total antes e depois da intervenção dietética dentro de cada grupo genotípico (análise entre amostras pareadas), as portadoras do genótipo AA tiveram uma redução significativa nos níveis desta variável (de 195,37 mg/dL para 189,78 mg/dL; $p = 0,0269$), enquanto que as portadoras do alelo G não tiveram ($p = 0,083$). Deste modo, as portadoras do genótipo AA, aparentemente, beneficiaram-se mais da intervenção dietética na redução de colesterol total do que as portadoras do alelo G e isso pode explicar o porquê da frequência do alelo G ser maior no grupo de mulheres com os níveis desta variável acima da mediana da amostra.

O teste de regressão múltipla considerando os níveis de triglicerídeos e VLDL no momento antes da intervenção dietética, confirmou o efeito de dependência entre estas variáveis e os genótipos, mas não entre os genótipos e os valores de IMC. Do mesmo modo, os níveis de HDL-c mostraram-se dependentes dos genótipos, mas não das medidas de IMC, como pode ser visto na Tabela 22.

Já nas variáveis antropométricas onde foram encontradas diferenças significativas no momento depois da intervenção dietética (IMC e circunferência abdominal) e nas diferenças entre antes e depois da intervenção (circunferência abdominal), não foi confirmada a dependência destas variáveis com os genótipos ($p > 0,05$) (dados não apresentados).

TABELA 22 – ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP RS692383 DO GENE *ABCG1*

Variável dependente	Variáveis independentes consideradas	$\beta \pm SE$	P
TG	Genótipo	-24,36 \pm 11,61	0,038
	IMC	-0,06 \pm 1,06	0,957
VLDL	Genótipo	-4,87 \pm 2,32	0,038
	IMC	-0,01 \pm 0,21	0,957
HDL-c	Genótipo	2,99 \pm 1,13	0,009
	IMC	0,91 \pm 0,46	0,052

NOTA: O modelo de interação alélica considerado foi o de dominância do alelo G. Os valores encontrados para TG e VLDL correspondem ao momento antes da intervenção dietética, assim como os valores de IMC utilizados no cálculo; os valores encontrados para HDL-c correspondem à variação entre o momento antes e o momento depois, assim como o valor de IMC utilizados no cálculo. Sendo TG: triglicerídeos; IMC: índice de massa corporal; β : coeficiente angular; SE: erro padrão.

A proteína *ABCG1*, assim como a proteína *ABCA1*, realiza o transporte de colesterol para fora da célula, porém não o faz por intermédio de apoA-I, transferindo o colesterol diretamente para moléculas de HDL. Desta forma, a redução da expressão de *ABCG1* também está relacionada com uma redução no efluxo do colesterol, no entanto, as consequências desta redução são contraditórias considerando seus efeitos sobre o risco de desenvolver aterosclerose (TAVOOSI, *et al.*, 2015; YANG; GELISSEN, 2017). TAVOOSI e colaboradores, no entanto, encontraram uma expressão de *ABCG1* cerca 75% menor em portadores de

síndrome metabólica do que em indivíduos saudáveis. Esses autores discutem que os fatores que caracterizam a síndrome metabólica (hiperglicemia, hiperlipidemia, baixos níveis de HDL-c e obesidade) podem estar levando a redução da expressão deste gene. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que diferentes polimorfismos nesse gene podem levar a diferenças na expressão e essa relação com a síndrome metabólica pode ser de causa e não de consequência. A possível associação do alelo A do polimorfismo rs692383 com maiores níveis de triglicerídeos e VLDL e com uma maior perda de HDL-c após a dieta precisa ser melhor estudada, a fim de desvendar a relação do gene *ABCG1* com os níveis de lipídeos séricos e como potencial alvo em estudos de associação com o desenvolvimento de aterosclerose.

5.7 Polimorfismo rs3827225 do gene *ABCG1*

Para o polimorfismo rs3827225 do gene *ABCG1*, foram identificados os genótipos de 207 das 211 mulheres que compunham a amostra. As frequências genotípicas deste polimorfismo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com a Tabela 23, onde também estão as frequências alélicas.

TABELA 23 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO SNP RS3827225 DO GENE *ABCG1*

N	Frequência Alélica (%)		Desvio padrão	Frequência Genotípica (%)			p
	A	G		AA	AG	GG	
207	22,5	77,5	0,00856	3,4	38,2	58,4	0,388

NOTA: Valores de p correspondem ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise transversal nos momentos antes e depois da intervenção dietética (Tabela 24), não houveram diferenças significativas entre as portadoras do alelo A e as portadoras do genótipo GG em nenhuma das variáveis.

TABELA 24 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS3827225 DO GENE *ABCG1* NOS MOMENTOS ANTES E DEPOIS DA INTERVENÇÃO DIETÉTICA

Variáveis	Antes da intervenção					Depois da intervenção				
	AA + AG		GG		p	AA + AG		GG		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD		N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m²)	55	35,46 ± 5,07	82	34,89 ± 5,42	0,369	53	34,67 ± 5,3	81	33,95 ± 5,4	0,268
CC (cm)	55	96,05 ± 9,87	82	95,82 ± 9,8	0,972	57	93,01 ± 11,29	81	92,21 ± 10,9	0,864
CA (cm)	55	111,53 ± 11,94	82	108,34 ± 11,06	0,101	57	103,92 ± 10,84	82	101,46 ± 10,52	0,25
CT (mg/dL)	83	188,71 ± 37,2	113	191,6 ± 36,17	0,923	56	187,3 ± 34,58	79	188,76 ± 35,91	0,83
HDL-c (mg/dL)	83	51,96 ± 12,59	113	52,25 ± 13,41	0,921	56	47,25 ± 10,84	79	47,82 ± 10,45	0,36
TG (mg/dL)	83	135,43 ± 66,63	113	138,84 ± 69,12	0,518	56	149,98 ± 72,02	79	138,0 ± 75,46	0,234
LDL-c (mg/dL)	83	109,82 ± 29,26	113	111,43 ± 29,78	0,832	56	110,06 ± 29,14	79	113,34 ± 32,06	0,804
VLDL (mg/dL)	83	27,09 ± 13,33	113	27,77 ± 13,82	0,518	56	29,99 ± 14,4	79	27,6 ± 15,09	0,234

NOTA: SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos.

A comparação entre as médias das diferenças dos valores de antes e depois da intervenção dietética (Tabela 25), no entanto, mostrou que as portadoras do alelo A perderam, em média, 3,47 cm a mais de circunferência abdominal do que as portadoras do genótipo GG. Quanto ao perfil lipídico, as portadoras do alelo A tiveram um aumento nos níveis de LDL-c ($p= 0,05$), enquanto que as portadoras do genótipo GG não aumentaram significativamente seus níveis após a intervenção dietética (dados não mostrados). Quando comparadas entre si, as portadoras do alelo A mostraram que tiveram um aumento de, em média, 1,33 mg/dL a mais nos níveis de LDL-c do que as portadoras do genótipo GG.

TABELA 25 – COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENÇAS MÉDIAS NAS MULHERES PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DO ALELO A DO SNP RS3827225 DO GENE *ABCG1*

Variáveis	AA + AG		GG		p
	N	Média ± SD	N	Média ± SD	
IMC (Kg/m ²)	53	-4,36 ± 3,98	81	-3,65 ± 4,1	0,71
CC (cm)	53	-8,95 ± 5,67	79	-6,91 ± 4,86	0,136
CA (cm)	53	-6,29 ± 17,69	80	-2,82 ± 24,28	0,046
CT (mg/dL)	56	-4,18 ± 5,95	77	-4,56 ± 6,75	0,42
HDL-c (mg/dL)	56	8,3 ± 44,6	77	1,64 ± 50,21	0,66
TG (mg/dL)	56	2,66 ± 9,22	77	3,78 ± 15,16	0,127
LDL-c (mg/dL)	56	1,66 ± 8,92	77	0,33 ± 10,04	0,033
VLDL (mg/dL)	56	-2,3 ± 2,48	77	-2,35 ± 3,28	0,123

NOTA: O cálculo das diferenças foi feito pela subtração simples das medidas de depois e antes da intervenção dietética. SD: desvio padrão; CC: circunferência de cintura; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; TG: triglicérides.

O teste de regressão múltipla mostrou que a variação entre o antes e depois da intervenção dietética nas medidas de circunferência abdominal é dependente dos genótipos e da variação no IMC, como pode ser visto na Tabela 26. Por outro lado, a dependência da variação nos níveis de LDL-c pelo genótipo e pela variação no IMC não foram confirmadas.

TABELA 26 – ANÁLISE POR REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA O SNP RS3827225 DO GENE *ABCG1*

Variável dependente	Variáveis independentes consideradas	$\beta \pm SE$	p
CA	Genótipo	2,11 \pm 0,87	0,0162
	IMC	1,49 \pm 0,36	<0,0001
LDL-c	Genótipo	5,31 \pm 3,51	0,133
	IMC	0,61 \pm 1,46	0,677

NOTA: O modelo de interação alélica considerado foi o de dominância do alelo A. Os valores encontrados para ambas variáveis dependentes correspondem à variação entre o momento antes e o momento depois, assim como os valores de IMC utilizados no cálculo. Sendo CA: circunferência abdominal; IMC: índice de massa corporal; β : coeficiente angular; SE: erro padrão.

Como para as análises dos demais polimorfismos estudados neste trabalho, todos os modelos de interação alélica foram testados. No caso do polimorfismo rs3827225 o modelo que mostrou resultados mais promissores para maiores investigações foi o de efeito aditivo. No entanto, essa amostra estudada possui uma frequência muito baixa do genótipo AA (algumas análises continham apenas três indivíduos), justamente o genótipo que foi associado com níveis de colesterol total, triglicerídeos e VLDL mais altos, comparados ao genótipo GG ($p= 0,034$; $p= 0,027$; $p= 0,027$, respectivamente). Portanto, para evitar associações espúrias pela baixa frequência do genótipo AA, optou-se pelo uso do modelo de dominância do alelo A, juntando os genótipos AA e AG para as análises. Os resultados das comparações entre as portadoras do alelo A e as portadoras do genótipo GG, podem ter mostrado, desta forma, apenas uma parte do potencial efeito do alelo A nessas e nas demais variáveis.

Pouco se sabe sobre a atuação do gene *ABCG1*, e da respectiva proteína, na modelagem dos níveis de lipídeos séricos. Tampouco há na literatura informações acerca do seu efeito sobre a variação das medidas antropométricas. Os resultados encontrados neste trabalho necessitam maiores investigações, em especial, sobre a atuação do genótipo AA isoladamente sobre os níveis de lipídeos e sua atuação no desenvolvimento de aterosclerose e potenciais doenças cardiovasculares associadas.

6 CONCLUSÕES

1. Independentemente do genótipo, a dieta foi eficiente na redução de IMC, circunferência da cintura, circunferência abdominal e do colesterol total. Além disso, houve uma indesejável redução de HDL-c.

2. As mulheres portadoras do alelo A do polimorfismo rs9939609 do gene *FTO* beneficiaram-se menos da intervenção dietética do que as não portadoras: tiveram uma menor redução da circunferência abdominal e maior redução dos níveis de HDL-c. Além disso, as portadoras do alelo A apresentaram um risco significativamente maior de reduzir menos suas medidas de circunferência abdominal e de reduzir mais seus níveis de HDL-c do que as não portadoras.

3. As portadoras do alelo A do polimorfismo rs1800977 do gene *ABCA1* perderam menos IMC após a intervenção do que as não portadoras. Não foram encontradas diferenças significativas entre as portadoras e não portadoras do alelo A na comparação entre os níveis de lipídeos séricos.

4. As portadoras do genótipo TT do polimorfismo rs2230806 do gene *ABCG1* beneficiaram-se mais da dieta do que as portadoras do genótipo CC na redução dos níveis de colesterol total, perdendo significativamente mais em resposta a dieta. Além disso, o alelo T foi mais frequente que o alelo C no grupo de mulheres com níveis de HDL-c maiores e níveis de LDL-c menores.

5. As portadoras do genótipo GG do polimorfismo rs2279796 do gene *ABCA7* apresentaram níveis de colesterol total e LDL-c maiores que as portadoras dos genótipos AG e AA. As portadoras do genótipo GG apresentaram um risco maior de apresentar níveis de colesterol total e LDL-c mais elevados. Além disso, o alelo G foi mais frequente no grupo de mulheres com nível de colesterol total e LDL-c maiores que a mediana. Na resposta a intervenção dietética, as portadoras do genótipo AA reduziram, enquanto que as portadoras dos genótipos AG e GG aumentaram, seus níveis de triglicerídeos e VLDL.

6. As portadoras do alelo G do polimorfismo rs692383 do gene *ABCG1* apresentaram IMC maior e níveis de triglicerídeos e VLDL menores que as não portadoras. No entanto, as portadoras do genótipo AA beneficiaram-se mais na redução nos níveis de colesterol total, que pode ter sido uma atenuação do efeito do alelo A pela dieta. Também em resposta a intervenção dietética, as portadoras do alelo G reduziram menos suas medidas de circunferência abdominal, no entanto tiveram uma redução menor nos níveis de HDL-c.

7. As portadoras do alelo A do polimorfismo rs3827225 do gene *ABCG1* tiveram uma redução de circunferência abdominal maior que as não portadoras, porém apresentaram um aumento maior nos níveis de LDL-c após a intervenção dietética.

8. Mais estudos são necessários para elucidar o real efeito destes polimorfismos nas variáveis antropométricas e bioquímicas, em especial o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*, e se sua relação com aumento da circunferência abdominal é devido ao acúmulo maior de gordura visceral, especialmente em mulheres; rs2279796 do gene *ABCA7*, que mostrou resultados consistentes, que não puderam ser confirmados na literatura, pela pouca existência de estudos com este polimorfismo em relação a estas variáveis; além disso, os polimorfismos do gene *ABCG1* também necessitam de maiores investigações para confirmação dos efeitos encontrados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1000 GENOMES PROJECT. EMBL-EBI 2008-2016. Disponível em <<http://www.internationalgenome.org/home>>.

AKAO, H. *ABCA1* gene variation and heart disease risk reduction in the elderly during pravastatin treatment. **Atherosclerosis**, 235, 176 – 181, 2014.

AL-ATTAR, S. A. *et al.* Association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-Causasian multi-ethnic sample. **Cardiovascular Diabetology** 2008, 7:5.

ALMÉN, M. S. *et al.* Genome wide analysis reveals association of a *FTO* gene variant with epigenetics changes. **Genomics**, 99, 132 – 137, 2012.

BOISSEL, S. *et al.* Loss-of-Function Mutation in the Dioxygenase-Encoding *FTO* Gene Causes Severe Growth Retardation and Multiple Malformations. **The American Journal of Human Genetics**, 85, 106 – 111, July 10, 2009.

CARTIER, J. L. GOLDBERG, A. C. Familial Hypercholesterolemia: Advances in Recognition and Therapy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, 59 (2016) 125–134.

DOHMAEA, S. A. UEDAB, K. YOKOYAMAA, S. *ABCA7*, a molecule with unknown function. **FEBS Letters**, 580, 1178 – 1182, 2006.

FAROOQI, I. S. *FTO* and obesity: The Missing Link. **Cell Metabolism**, 13, 2011.

FAWCETT, K. A. BARROSO, I. The genetics of obesity: *FTO* leads the way. **Trends in Genetics**, Vol. 26, No 6. 2010.

FRAYLING, T. M. *et al.* A Common Variant in the *FTO* Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. **Science**, Vol 316, 11 May 2007.

FRISDAL, E. *et al.* Adipocyte ATP-Binding Cassette G1 Promotes Triglyceride Storage, Fat Mass Growth, and Human Obesity. **Diabetes**, 64, 840 – 855, 2015.

GALEMA-BOERS, J. M. H., VAN LENNEP, J. E. R. Dyslipidemia testing: Why, for whom and when. **Maturitas**, 81, 442 – 445, 2015.

GENE CARDS. **Weizmann Institute of Science**, v4.4.1 Build 14. 2017.

GENETICS HOME REFERENCE. National Library of Medicine (NLM); National Institutes of Health; U.S. Department of Health and Human Services. 2017. Disponível em <<https://ghr.nlm.nih.gov/>>.

GENVIGIR, F. D. V. *et al.* Effects of *ABCA1* SNPs, including the C-105T novel variant, on serum lipids of Brazilian individuals. **Clinica Chimica Acta**, 389, 79 – 86, 2008.

- HENI, M. *et al.* Variation in the obesity risk gene *FTO* determines the postprandial cerebral processing of food stimuli in the pre-frontal cortex. **Molecular Metabolism**, 3, 109 – 113, 2014.
- HERRERA, B. M. KEILDSON, S. LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturita**, 69, 41 – 49, 2011.
- IBGE. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Brasil, 2003. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/defaulttab.shtm>>. Acesso em 20/09/2016.
- JEFFCOAT, R. Obesity – A perspective based on the biochemical interrelationship of lipids and carbohydrates. **Medical Hypotheses**, 68, 2007.
- JIA, G. *et al.* N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated *FTO*. **Nature Chemical Biology**, Vol 7. December 2011.
- KAMINSKI, W. E. *et al.* Identification of a Novel Human Sterol-Sensitive ATP-Binding Cassette Transporter (ABCA7). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 273, 532 – 538, 2000.
- KANALEY, J. A. *et al.* Abdominal Fat Distribution in Pre- and Postmenopausal Women: The Impact of Physical Activity, Age, and Menopausal Status. **Metabolism**, Vol 50, No 8 (August), 2001: 976-982.
- KITJAROENTHAM, A. *et al.* R219K Polymorphism of ATP Binding Cassette Transporter A1 Related with Low HDL in Overweight/Obese Thai Males. **Archives of Medical Research**, 38 (2007) 834 – 838.
- KRING, S. *et al.* *FTO* Gene Associated Fatness in Relation to Body Fat Distribution and Metabolic Traits throughout a Broad Range of Fatness. **Plos One**. August 2008, Volume 3, Issue 8.
- LAHIRI D. K. & NURNBERGER J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res** 19:5444. 1991.
- LARGE, V. PERONI, O. LETEXIER, D. RAY, H. BEYLOT, M. Metabolism of lipids in human White adipocyte. **Diabetes Metab**, 30, 294 – 309, 2004.
- LEGOFFA, W. THIEB, G. M. D. *ABCG1*: Not as good as expected? **Atherosclerosis**, 219, 393 – 394, 2011.
- LIGUORI, R. *et al.* The *FTO* gene polymorphism (rs9939609) is associated with metabolic syndrome in morbidly obese subjects from southern Italy. **Molecular and Cellular Probes** 28 (2014) 195-199.
- LINSEL-NITSCHKE, P. *et al.* Potential role of ABCA7 in cellular lipid efflux to apoA-I. **Journal of Lipid Research**. Volume 46, 2005.

LIVINSTONE, K. M. *et al.* Associations between *FTO* genotype and total energy and macronutrients intake. A systematic review and meta-analysis. **Abstract/Appetite** 91 (2015) 431–439.

MA, D. *et al.* *ApoA-I* or *ABCA1* expression suppresses fatty acid synthesis by reducing 27-hydroxycholesterol levels. **Biochimie**, 103, 101 – 108, 2014.

MARCELIN, G. CHUA S. Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. **Current Opinion in Pharmacology**, 10, 588 – 593, 2010.

MARTINS, M. C., TRUJILLO, J. FARIAS, D. R. STRUCHINER, C. J. KAC, G. Association of the *FTO* (rs9939609) and *MC4R* (rs17782313) gene polymorphisms with maternal body weight during pregnancy. **Nutrition** 32 (2016) 1223–1230.

MARZZOCO, A. TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 2ª Edição. **Ed. Guanabara Koogan**. São Paulo, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diet, Nutrition and the Prevention Of Chronic Diseases. **WHO Media Centre**. January 2015. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.

PETKEVICIENE, J. *et al.* Physical activity, but not dietary intake, attenuates the effect of the *FTO* rs9939609 polymorphism on obesity and metabolic syndrome in Lithuanian adult population. **Public Health**, 135 (2016) 23 – 29.

PORCHAY-BALDÉRELLI, I. *et al.* Relationships between common polymorphisms of adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 and high-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in a population with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism Clinical and Experimental** 58 (2009) 74–79.

PU, J. *et al.* Dyslipidemia in Special Ethnic Populations. **Cardiol Clin**, 33, 325 – 333, 2015.

QI, L. *et al.* Fat Mass – and Obesity-Associated (*FTO*) Gene Variant Is Associated With Obesity. Longitudinal Analyses in Two Cohort Studies and Functional Test. **Diabetes**, Vol. 57, November 2008.

RAUHIO, *et al.* Association of the *FTO* and *ADRB2* genes with body composition and fat distribution in obese women. **Maturitas** 76 (2013) 165– 171.

ROSENSON, R. S. *et al.* Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. **Nat. Rev. Cardiol.** September 2015.

SALIBA, L. F. *et al.* Obesity-related gene *ADRB2*, *ADRB3* and *GHRL* polymorphisms and the response to a weight loss diet intervention in adult women. **Genetics and Molecular Biology**, 37, 1, 15–22, 2014.

SCHMIDT, R. F. Genetic variation in the *ABCA1* gene, HDL cholesterol, and risk of ischemic heart disease in the general population. **Atherosclerosis**, 208, 2010.

STRATIGOPOULOS, G. LEIBEL, R. L. *FTO* gains function. **Nature Genetics**, Vol. 42, Nº 12. December 2010.

TARLING, E. J. EDWARDS, P. A. Dancing with the sterols: Critical roles for *ABCG1*, *ABCA1*, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1821, 386 – 395, 2012.

TAVOOSI, Z. *et al.* Cholesterol Transporters ABCA1 and ABCG1 Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Metabolic Syndrome. **Cholesterol**. Volume 2015, 2015.

TOTH, M. J. TCHERNOF, A. SITES, C. K. POEHLMAN, E. T. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. **International Journal of Obesity** (2000) 24, 226-231.

VIGITEL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL). Brasil, **Ministério da Saúde** 2014.

XAVIER H. T. *et al.* V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Volume 101, Nº 4, Outubro 2013.

XU, Y. *et al.* A polymorphism in the *ABCG1* promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. **Atherosclerosis**, 219, 648 – 654, 2011.

WAHLÉN, K. SJOLIN, E. HOFFSTEDT. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene *FTO* is related to fat cell lipolysis. **J. Lipid Res.** 2008. 49: 607–611.

WANG, C. Y. SHIE, S. S., HSIEH, I. C. TSAI, M. L. WEN, M. S. *FTO* modulates circadian rhythms and inhibits the CLOCK-BMAL1-induced transcription. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 464, 2015.

WANG, N. *et al.* ATP-binding Cassette Transporter A7 (ABCA7) Binds Apolipoprotein A-I and Mediates Cellular Phospholipid but Not Cholesterol Efflux. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 278, No. 44, Issue of October 31, pp. 42906–42912, 2003.

WANG, N. *et al.* The R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 gene has a protective effect on atherothrombotic cerebral infarction in Chinese Han ethnic population. **Neurobiology of Aging**, 31 (2010) 647–653.

WILKENS, S. Structure and mechanism of ABC transporters. **F1000Prime Reports** 2015, 7:14.

YIN, Y-W. *et al.* ATP-binding cassette transporter 1 C69T and V825I polymorphisms in the development of atherosclerosis: A meta-analysis of 18,320 subjects. **Thrombosis Research** 135 (2015) 130–136.

YANG, A. GELISSEN, I. C. ABC-Transporter Mediated Sterol Export from Cells Using Radiolabeled Sterols. **Methods in Molecular Biology**, vol. 1583, 2017.

ANEXO

Parecer Consubstanciado de Protocolo de Pesquisa



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0005306/11**Protocolo CEP Nº **6307**

Título do projeto **EFETO DE UMA INTERVENÇÃO DIETÉTICA PARA REDUÇÃO DE PESO EM MULHERES OBRAS PORTADORAS DE VARIANTES DOS GENES ADRB2, ADRB3, BCHE, GHRL, PLIN4 E ADIPOQ: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Grupo
Versão **1**

Protocolo CONEP **0339.0.084.000-11**Pesquisador responsável **Louise Farah Saliba**Instituição **PUCPR****Objetivos**

OBJETIVO(S) GERAL(IS)

- Investigar o efeito de uma intervenção dietética para redução de peso em mulheres adultas obesas portadoras de variantes dos genes ADRB2, ADRB3, BCHE, GHRL, PLIN4 e ADIPOQ.

OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S)

- Identificar a presença dos polimorfismos Gln27Glu do gene ADRB2; Trp64Arg do gene ADRB3; -G116A, A539T(K), A1914G do gene BCHE; R51Q e L72M do gene GHRL; G11482A do gene PLIN4; G276T do gene ADIPOQ em mulheres adultas obesas submetidas a intervenção dietética para redução de peso com orientação dietética.
- Analisar a atividade da BChE nas mulheres adultas obesas antes e após intervenção dietética.
- Comparar a intervenção dietética para a redução de peso sobre variáveis antropométricas (peso, estatura, IMC, circunferência da cintura), clínicas (pressão arterial) e bioquímicas (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos, glicemia de jejum e atividade da BChE) em relação aos variantes dos genes ADRB2, ADRB3, BCHE, GHRL, PLIN4 e ADIPOQ.
- Investigar o papel do loco CHE2 na resposta à intervenção dietética em mulheres adultas obesas.

Comentários e considerações

Projeto de pesquisa do tipo ensaio clínico randomizado duplo-cego, com duração de 12 semanas, sendo 8 semanas no período de intervenção, uma semana na pré-intervenção e três semanas de acompanhamento após a intervenção. A amostra será composta por cerca de 300 mulheres e a pesquisa pretende verificar se a intervenção dietética para redução de peso pode ter diferentes efeitos sobre parâmetros antropométricos e bioquímicos em portadoras de variantes genéticas previamente associadas à obesidade. O cronograma, descrição de riscos e benefícios, critérios de inclusão e exclusão bem como o orçamento estão claramente expostos e adequados.

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

Dentro dos critérios de informação clara e compreensível para o sujeito de pesquisa e com o cumprimento das exigências técnicas formais.

Conclusões

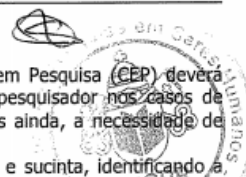
Projeto que atende as exigências para garantia da ética em pesquisa.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **14/09/2011**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a



- parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.
- Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 14 de Setembro de 2011.


17/ **Prof. MSc. Naim Akel Filho**
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUC PR



APÊNDICE

Artigo submetido para publicação

O seguinte artigo foi escrito com os resultados parciais desta dissertação em conjunto com os resultados, também parciais, da dissertação de Gabrielle Araujo do Nascimento, mestranda deste mesmo programa de pós-graduação.

COVER LETTER

To: A. Giaccari, Editor-in-Chief, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases

Dear Editor,

We are submitting the manuscript “***FTO* SNP influences the response to dietary intervention but not to physical exercise program**” by Gabrielle Araujo do Nascimento*; Mayza Dalcin Teixeira*; Luciane Viater Tureck; Ricardo Rodrigues Lehtonen de Souza; Louise Farah Saliba; Neiva Leite; Lupe Furtado-Alle.

*Authors contributed equally to this article.

Summary of the manuscript’s content and results: This study evaluated the interaction of *FTO* SNP rs9939609 with the anthropometric responses to a physical exercise program and to a dietary intervention in two independent samples: overweight and obese children and adolescents submitted to physical exercises and obese women submitted to dietary intervention. The rs9939609 affected the response to dietary intervention in obese women, since A-allele carriers had less reduction in abdominal circumference than homozygous TT. No SNP effect was observed in response to physical exercise in overweight and obese children and adolescents.

All authors have seen and approved the study and have no conflicts of interest to declare. This manuscript contains original unpublished material that has been submitted solely to Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, is not under simultaneous review by any other publication, and will not be submitted elsewhere until a decision has been made concerning its suitability for publication.

Yours sincerely,

Luciane Viater Tureck – Corresponding author

Federal University of Paraná (UFPR)

Genetics Department

PO Box 19071 Centro Politécnico –Setor de Ciências Biológicas- Departamento de

Genética- Curitiba – PR – Brazil, 81531 980

Phone 55 41 3361-1554; FAX 55 41 3266-2042

luviater@gmail.com

Title

FTO SNP influences the response to dietary intervention but not to physical exercise program

Authors

Nascimento, G. A.^{a, d}

Teixeira, M. D.^{a, d}

Tureck, L.V.^a

Souza, R. R. L.^a

Saliba, L. F.^b

Leite, N.^c

Furtado-Alle, L.^a

^aDepartment of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

^bDepartment of Nutrition, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

^cDepartment of Physical Education, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^dAuthors contributed equally to this article.

Corresponding author:

Luciane Viater Tureck

Polymorphism and Linkage Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Brazil

Adress: Francisco H dos Santos, 210. Centro Politécnico/ Setor de Ciências Biológicas/ Departamento de Genética. Jardim das Américas, CEP 81531-970 Curitiba-Paraná

Tel: +55 041 3361-1730

E-mail: luviater@gmail.com

Abstract

Background and Aims

The fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene is highly expressed in hypothalamus and it is evolved in energy homeostasis. The A-allele of the rs9939609 single nucleotide polymorphism (SNP; A>T) is associated with obesity and higher food intake, while its effect in energy expenditure is unclear. The aim of this study is to evaluate the interaction of the rs9939609 with the anthropometric responses to a physical exercise program and to a dietary intervention.

Methods and Results

We studied two independent samples. The first was composed by children and adolescents in which overweight and obese individuals were submitted to a physical exercise program (N = 136) and normal weight served as a control group (N = 172). The second sample was composed by obese women submitted to a hypocaloric dietary intervention (N = 126). Physical exercise and dietary intervention were effective, independently of genotype. We found no association of *FTO* rs9939609 with obesity in children and adolescents ($p = 0.67$). The rs9939609 affected the response to dietary intervention in obese women: A-allele carriers reduced 2.7cm less of abdominal circumference (AC) than homozygous TT ($p = 0.04$), while no effect was observed in response to physical exercise in overweight and obese children and adolescents.

Conclusion

Obese women exhibited resistance to abdominal circumference reduction in function of the A-allele presence. The same allele did not show interaction with the exercise program applied, which suggests that the *FTO* rs9939609 influence on energy expenditure may be small, or dependent of other factors such as sex and age.

Keywords

FTO, rs9939609 SNP, obesity, dietary intervention, physical exercise, obese women, childhood obesity.

Introduction

The common obesity, whose prevalence has been increasing worldwide, has a complex etiology, that result of interactions from the endogenous (genetic) and exogenous (lifestyle) factors [1]. It is well established the role of healthy feeding and lifestyle in the prevention and treatment of common obesity, but the impact of genetic factors in this context is still not well understood. In this sense, many research studies are conducted seeking to identify genetic variants in genome that contribute to phenotypes associated with obesity, such as variants that contribute to the BMI increase [2–4].

In addition to this identification, it is necessary to analyze the effect of variants in specific contexts in order to identify the interaction factors (genotype-environment) and the direction of these interactions, which may contribute to the predisposition and the response to obesity treatments [5,6].

The fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene seems to be an excellent candidate gene, since it has been related to weight gain [2]. *FTO* gene product is a 2-oxoglutarate dependent nucleic acid demethylase [7] and has more affinity for single strand DNA/RNA [7,8]. *FTO* is expressed in the whole body, especially in the hypothalamus, which is involved in regulation of energy balance [2,9]. Stratigopoulos et al. [10] found that fasted mice had a reduced *FTO* expression in hypothalamus compared to fed mice. This result suggests that the variation in *FTO* levels in hypothalamus can be a signal to promote feeding [9].

FTO rs9939609 single nucleotide polymorphism (SNP) (A>T) is localized in the first intron of the gene, and the risk allele (A-allele) is associated with a higher body mass index (BMI) and increased food intake [2,11,12].

Thus, with the objective of adding efforts in the elucidation of the genotype x environment interactions that predispose and/or interfere in therapeutic approaches of obesity, this study verified the *FTO* rs9939609 SNP interactions with two

interventions: physical exercise in overweight and obese children and adolescents and hypocaloric dietary intervention in obese women.

Methods

Study Design

This study presents the analysis of interaction of the same anthropometric and genetic variables in two independent sample groups, which were structured and submitted to interventions at different times. The experimental design in each sample group was longitudinal.

In total, 434 individuals were analyzed, 308 of which constituted one sample (children and adolescents), and 126 constituted another independent sample (obese women). Thus, the analyzes were concentrated in each group, and not between them, due to the differences between the applied interventions, and the participants profile. However, both samples were composed of individuals from Curitiba and neighboring cities, Brazil, with predominantly Euro-Brazilian ancestry.

The studies were approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná (UFPR) (Protocol number 2460.067/2011) and Pontifical Catholic University of Parana's Institutional Ethics Board (IEB approval number: 0005306/11). Informed Consent was obtained from every participant.

Sample Groups and Interventions

Children and adolescents group – Physical exercise program

This group was composed of 308 children and adolescents of both sexes (204 boys and 104 girls), of which 172 had normal weight and 136 were overweight or obese (31 overweight and 105 obese; according to parameters defined by WHO). The mean overall age was 13.55 ± 2 years old (aged 8-17 y).

They were recruited in public schools of the state of Paraná, Brazil. The inclusion criteria in this group were: medical liberation for practicing physical exercise and do not use drugs that could interfere on weight control and/or lipid levels. Those who were in agreement with the established criteria were invited to participate in this

research, and those who accepted, with the legal responsible consent, had the free and informed consent term signed by them. The blood samples were collected and BMI Z-score, waist circumference (WC) and abdominal circumference (AC) measured.

The 136 overweight or obese children and adolescents were subjected to physical exercises composed of four different types of training. The 172 children and adolescents with normal weight were included in some analyzes as a reference group.

The physical exercises were conducted by Physical Education professionals, and applied three times a week during 12 weeks on students in their home schools.

Four kinds of physical exercise were conducted: terrestrial aerobic, high intensity interval training (HIIT), combined training and swimming. However, for the statistical analyzes the physical exercise groups were analyzed together, since there was no significant impact of the different trainings in the analyzed variables. Details of the applied exercises are in the supplemental material.

After the conclusion of the exercise program, the anthropometric data were collected again. It was not possible to obtain AC and WC data from all individuals who completed the program (n=136), therefore the analyzes of these variables count with a smaller number of individuals (n=94 for AC and n=58 for WC).

Obese women – Dietetic intervention

This group was initially constituted by 199 obese women (BMI \geq 30, according to parameters defined by WHO). At the end of the study 126 women completed the hypocaloric dietary intervention. Only this group was statistically analyzed.

The women that participated of this study were invited to participate by local radio and television, aiming to reduce weight. The inclusion criteria in this group were: to be obese, woman, have 20 years or more, being in reproductive period (not in menopause), not pregnant and not breastfeeding. Women in drug treatment for weight control, with hypothyroidism, type I diabetes, kidney disease, hypertension or who have undergone stomach reduction surgery were excluded from the study.

Those who were in agreement with the established criteria were invited to participate in this research, and those who accepted signed the free and informed consent term.

The nutritional intervention design, and the application of the same, counted with a multidisciplinary team of professionals and postgraduates of the Nutrition Department of the Pontifical Catholic University of Paraná. Psychologists, nutritionists, nurses and genetic postgraduate collected preliminary information from women who fit in the study. The blood samples were collected and BMI, AC and WC were measured. A questionnaire containing eating habits was also applied to provide the basis for the elaboration of a personalized diet.

Then, the dietetic intervention was started, which had two components: (1) a group nutritional intervention with two sessions, one consisted in readings about choosing healthy foods and one workshop about food labels in the third and fifth week, and (2) an individual dietetic intervention with three sessions. The five sessions occurred during seven weeks.

The individual dietetic intervention was performed by a nutritionist and consisted in a hypocaloric diet based on estimates of their daily energy needs (total energy expenditure) with a deficit of 600 Kcal/per day. Because of this, the diets ranged between 1000 and 2200 Kcal/per day, and had two options for dinner (salad, bread and cheese or salad, rice, beans and chicken). The dinner options were based on previously reported dietary habits. The sessions of individual dietetic intervention occurred in the second, fourth and sixth weeks, changing foods of the diet to avoid food monotony [13].

After the seven weeks of intervention, the anthropometric data were collected again. It was not possible to obtain AC and WC data from all individuals who completed the program (n=126), hence the analyzes of these variables count with a smaller number of individuals (n=125 for AC and n=124 for WC).

The experimental procedure applied in all the sample groups is demonstrated in Figure 1.

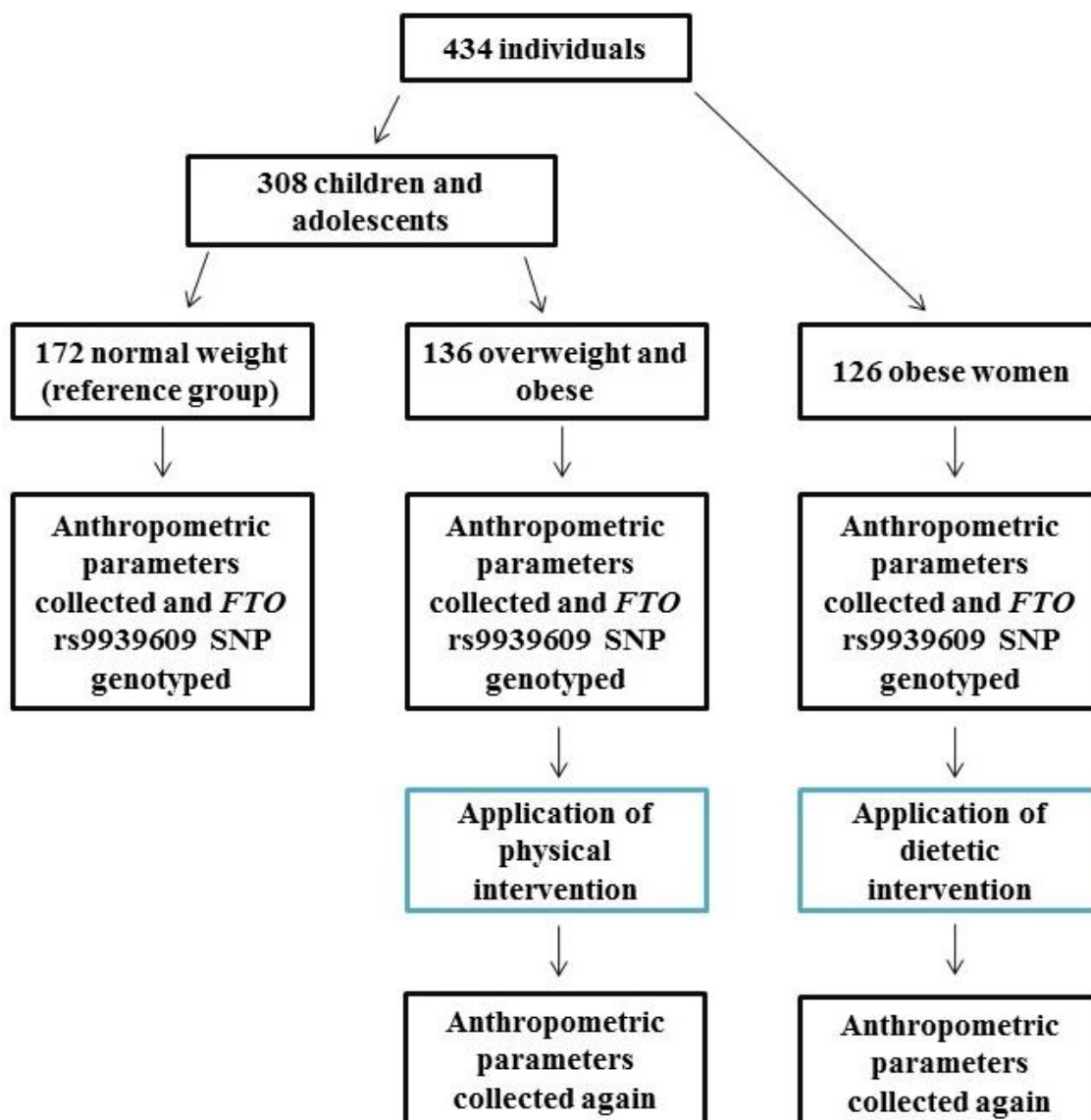


Figure 1. Study design.

Anthropometric variables

The anthropometric variables were collected according to the Anthropometric Indicators Measurement Guide [14], with the individuals wearing light clothes and without shoes.

Three measurements were obtained and the median between them was considered. The children and adolescents were considered overweight when their BMI Z-score was between +1 and +2, and obese when their BMI Z-score was more than +3. Women were classified as obese when BMI \geq 30 [15].

DNA extraction and genotyping

The DNA was extracted from peripheral blood according to the salting-out technique Lahiri and Nurnberger [16], and then diluted to 20ng/μl. The *FTO* rs9939609 SNP was genotyped with a TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems). The reactions were done using the following conditions: 60°C for 30s, 95°C for 10min, 50 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min, and 60°C for 30s. Three previously sequenced control samples, representative of each of the possible genotypes, were included in each reaction.

Statistical analysis

The frequencies of genotypes and alleles were obtained by direct counting and, regarding children and adolescents, compared between the group of overweight/obese and normal weight by chi-square test. The Hardy-Weinberg equilibrium was verified, also using the chi-square test.

The continuous variables were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction. The initial and final mean of the variables (before and after the interventions) were compared by paired parametric or non parametric tests (t test paired or Wilcoxon test, respectively).

The recessive, dominant and co-dominant models of allelic interaction were tested. The dominant model fitted our results, and henceforth adopted for analyzes that involved the sample stratification by rs9939609 SNP genotype. Independent comparison tests of mean were used to evaluate the mean differences (initial – final) in the anthropometric parameters between genotypes (Parametric – t test or nonparametric – Mann Whitney). Multiple regression analyzes were also applied. Statistical significance adopted for the tests was 0.05 (5%).

Results

The physical exercise and dietary intervention promoted changes in anthropometric variables of overweight/obese children and adolescents and obese women, respectively (Table 1A and 1B).

The physical exercise contributed to reduction of 0.23kg/m² in BMI Z-score ($p = 10^{-4}$) in overweight/obese children and adolescents (Table 1A). The means of the variables analyzed in the normal weight group served as reference in order to check whether variables that initially were different between overweight/obese and normal weight groups had become similar due to the physical exercise program. However, all anthropometric measures that initially were different between these groups remained higher in overweight/obese (Table 1A).

Similar to the exercise effect, the diet was also effective: reduction of 0.9kg/m² in BMI ($p = 10^{-4}$), 7.04cm in AC ($p = 10^{-4}$) and 3.28cm in WC ($p = 10^{-4}$) was found in obese women (Table 1B).

Table 1A. Comparisons of initial and final means of anthropometric variables (before and after physical exercise) in overweight and obese children and adolescents, and their comparisons with means of anthropometric variables of normal weight children and adolescents.

Children and adolescents								
Variables	Overweight and obese				Normal weight			
	N	Initial mean \pm SD	Mean after 12 weeks \pm SD	p	N	Mean \pm SD	p*	p**
BMI Z-score (kg/m ²)	136	2.88 \pm 1.09	2.80 \pm 1.08	0.0008	172	-0.21 \pm 0.83	10⁻⁴	10⁻⁴
AC (cm)	83	96.84 \pm 12.19	96.05 \pm 12.62	0.29	129	67.63 \pm 6.35	10⁻⁴	10⁻⁴
WC(cm)	55	93.31 \pm 10.99	92.84 \pm 11.38	0.22	58	67.30 \pm 5.74	10⁻⁴	10⁻⁴

BMI: Body mass index; AC: Abdominal circumference; WC: Waist circumference; SD: Standard deviation; p: comparison between the initial and after 12 weeks means of physical exercise in overweight and obese children and adolescents; p*: comparison between the initial mean in the overweight and obese individuals and the mean in normal weight individuals; p**: comparison between the mean after 12 weeks in the overweight and obese individuals and the mean in the normal weight individuals.

Table 1B. Comparison of initial and final means of anthropometric variables (before and after dietetic intervention) in obese women.

Obese women				
Variables	N	Initial mean \pm SD	Mean after 7 weeks \pm SD	p
BMI (kg/m ²)	126	35.11 \pm 5.15	34.19 \pm 5.09	10⁻⁴
AC (cm)	125	109.44 \pm 11.56	101.88 \pm 10.49	10⁻⁴
WC(cm)	124	95.91 \pm 9.77	92.08 \pm 10.93	10⁻⁴

BMI: Body mass index; AC: Abdominal circumference; WC: Waist circumference; SD: Standard deviation; p: comparison between the initial and after 7 weeks means of nutritional intervention in obese woman.

The allele and genotype frequencies of rs9939609 SNP in children and adolescents (overweight/obese and normal weight groups) and in obese women are shown in table 2. The rs9939609SNP genotypes distribution are in Hardy-Weinberg equilibrium in all sample groups ($p>0.05$).

Table 2. Genotype and allele frequencies of *FTO* rs9939609 SNP in overweight and obese children and adolescents, in normal weight children and adolescents, and in obese women.

Children and adolescents - Overweight and obese				
Genotype	N	%	Allele	% ± SE
TT	53	38.97	T	62.13 ± 0.01
AT	63	46.32		
AA	20	14.71	A	37.87 ± 0.01
Total	136	100		
Children and adolescents - Normal weight				
Genotype	N	%	Allele	% ± SE
TT	65	37.79	T	63.95 ± 0.01
AT	90	52.33		
AA	17	9.88	A	36.05 ± 0.01
Total	172	100		
Obese Women				
Genotype	N	%	Allele	% ± SE
TT	35	27.78	T	50.4 ± 0.01
AT	55	43.65		
AA	36	28.57	A	49.6 ± 0.01
Total	126	100		

SE: Standard error.

The risk allele (A-allele), frequently associated with obesity, was found at similar frequency among overweight/obese group, compared to children and adolescents with normal weight ($p = 0.67$).

The rs9939609 A-allele effect on anthropometric variables was found only in interaction with dietary intervention. The A-allele carriers reduced on average 2.7cm less of AC than homozygous TT ($p= 0.04$) (figure 2B). No rs9939609 A-allele influence was observed in response to exercise in obese/overweight children and adolescents (figure 2A).

In transversal analyzes (at baseline and at the final moment), in both sample groups, no rs9939609 A-allele effect was found (analyses in supplemental material).

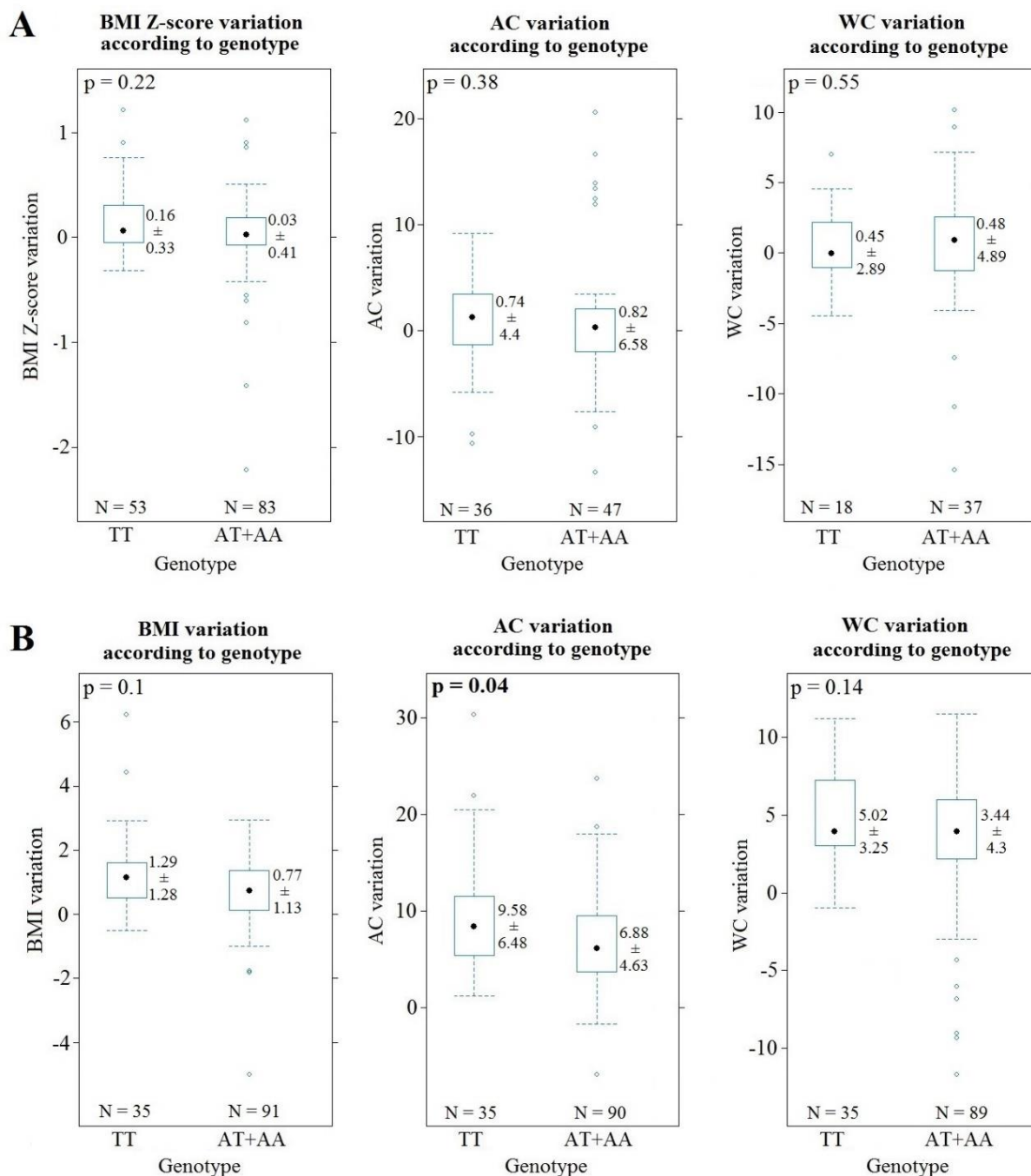


Figure 2. Comparisons of mean variation (\pm SD) of anthropometric variables between carriers and non-carriers of rs9939609 A-allele. (A) Overweight and obese children and adolescents subjected to physical exercises, mean variation in body mass index (BMI) Z-score, abdominal circumference (AC) and waist circumference (WC) according to genotype. (B) Obese woman subjected to dietary intervention, mean variation in BMI, AC and WC according to genotype.

Multiple regression analyzes were applied in models in which the dependence of variation of anthropometric measurements was evaluated as a function of possible independent variables in both sample groups. These analyzes confirmed the interaction between rs9939609 SNP and dietary intervention on AC change in obese women ($p = 0.047$) in a dominant model of A-allele (Table 3). The AC change was also dependent on the BMI variation ($p = 0.001$), which was expected because of the correlation between these variables. We found no relation between rs9939609 SNP and WC variation ($p = 0.16$). The change in this variable was only dependent of the BMI change ($p = 0.003$) in obese women.

The lack of rs9939609 SNP effect on physical exercise response in children and adolescents was also confirmed in obese/overweight children and adolescents, in whom the AC variation was dependent of the BMI variation only ($p = 0.001$) (Table 3).

Table 3. Models of multiple regression analysis in overweight and obese children and adolescents and in obese women.

Overweight and obese children and adolescents			
Dependent variable	Independent variables considered	$\beta \pm SD$	p
BMI Z-score variation	Genotype	0.06 \pm 0.08	0.46
	Age	0.05 \pm 0.08	0.52
	Sex	0.02 \pm 0.08	0.78
AC variation	Genotype	0.05 \pm 0.10	0.6
	BMI Z-score variation	0.35 \pm 0.10	0.001
	Age	0.17 \pm 0.10	0.11
	Sex	0.12 \pm 0.10	0.25
WC variation	Genotype	0.05 \pm 0.13	0.68
	BMI Z-score variation	0.20 \pm 0.13	0.14
	Age	0.03 \pm 0.13	0.8
	Sex	0.04 \pm 0.13	0.78
Obese women			
Dependent variable	Independent variables considered	$\beta \pm SD$	p
AC variation	Genotype	2.03 \pm 1.02	0.047
	BMI variation	1.27 \pm 0.38	0.001
WC variation	Genotype	0.12 \pm 0.09	0.160
	BMI variation	0.26 \pm 0.09	0.003

BMI: Body mass index; AC: Abdominal circumference; WC: Waist circumference; β : Regression coefficient; SD: Standard deviation. Genotypes: AT+AA and TT (dominant model).

Discussion

In the present study, it was possible to evaluate the interaction between *FTO* rs9939609 SNP and metabolic changes induced by dietary intervention or physical exercise, which were reflected in the anthropometric measures variation, in two independent samples.

It is known that in obesity, environmental factors such as diet and physical activity play an important role in its prevention and are widely used as treatment. The presence of specific genetic variants leads to individual variation in response to these approaches, which, in general, indicates that more individualized approaches could be more efficient.

In our study, although both interventions demonstrated beneficial effect on the anthropometric variables evaluated, obese women carriers of the A-allele appeared to benefit less from the applied diet compared to non-carriers obese women; while the same allele did not influence the variables change in children and adolescents submitted to physical exercise. This finding suggests that the A-allele, besides contributing negatively to the baseline anthropometric and metabolic profile [17–19], may also influence the results of obesity therapeutic approaches.

In our study, the A-allele carriers obese women decreased in mean 2.7cm less of abdomen circumference compared to non-carriers, submitted to the same calorie restriction orientation. This finding is interesting, since the *FTO* genotype did not influence the BMI reduction in response to diet, but specifically modified the fat central deposit response to it. The harmful effect of increased central fat deposition for whole metabolic health is well known. It has unique characteristics of development and function that differentiate it from the adipose tissue distributed in the rest of the body [20], and its accumulation is correlated with increased susceptibility to various metabolic complications [21–23]. In this context, the A-allele effect may be of particular importance in women, since postmenopausal women show an increase in visceral fat, compared to premenopausal women because of the decline in the estrogen protective effect [24,25], which may be aggravated by the presence of the rs9939609 risk allele.

Several studies demonstrate the association of the *FTO* rs9939609 SNP with obesity and metabolic disorder traits [26–28]. Because it is intronic, its functional role is not fully understood, but studies suggest that the risk allele is functional, and leads

to increased *FTO* expression [29]. Berulava and Horsthemke [29] found higher levels of primary *FTO* transcript from the risk allele, compared to levels obtained from the non risk allele in blood cells and skin fibroblasts. The association between the risk allele and increased *FTO* expression is consistent with the observed in *FTO* knockout mice, which presented less weight and less fat mass compared to wild-type [30].

It is not well established how the *FTO* overexpression affects the demethylase function of the encoded protein, and consequently, its physiological contribution to adiposity and associated metabolic disorders. However, Merkestein et al. [31] demonstrated that mice that overexpressed *FTO* exhibited altered expression of many genes previously associated with obesity. Among these genes, the adiponectin, leptin and adrenergic receptor beta 3 and beta 2, related to food intake control, inflammatory profile and energy expenditure, suggesting that the physiological effect of *FTO* overexpression may involve all these pathways.

In addition to the fact that the *FTO* mRNA is found at high levels in the hypothalamus, a region responsible for energy balance regulation [32], studies have associated the presence of the A-allele with the increase in food and fat intake [11,12,33].

Considering all the above mentioned studies, it is possible that the differential regulation of caloric restriction-responsive pathways have resulted in greater resistance to fat loss in the central area of the body in A-allele carriers. However, it is not possible to rule out the possibility that, in our study, the obese women carriers of the A-allele may have ingested a greater amount and more energetic foods, compared to A-allele non carriers, even with the same caloric restriction orientation, which reflected in lower abdominal circumference losses. To elucidate this issue, more studies involving dietary intervention are needed, as well as functional studies considering the energy pathways preferentially activated in function of *FTO* overexpression.

Despite the lack of interaction between A-allele and the metabolic changes stimulated by physical exercise in our study, it could be involved in energy expenditure front during physical activity due to its participation in the energy homeostasis regulation via hypothalamus. According to Merkestein et al. [31] this interaction may involve the exacerbated activation of anabolic pathways in white adipose tissue and skeletal muscles due to the *FTO* overexpression, which could

contribute to weight gain, and potentially negatively influence the response to physical exercise, since this route could be preferentially used in detriment of the catabolic pathway.

However, a pathway that clearly explains the effect of *FTO* gene variants on energy expenditure stimulated by physical exercise is unknown, which explains in part the controversial results of studies evaluating this relationship [34].

Our results agree with other studies that found no association of rs9939609 A-allele with energy expenditure [11,12,35]. However, these comparisons should be interpreted with caution, considering that such studies had different methodologies, some measuring basal energy expenditure, using calorimetric approaches [35], others assessed the physical activity level by questionnaires that allowed to classify the individuals of the sample in physically active or inactive [36]. Our study is one of the few that evaluates the interaction of the rs9939609 SNP with the practice of controlled physical exercise in terms of anthropometric profile changes in obese and overweight children and adolescents.

Other factors also contribute to the lack of consensus in the studies that evaluate the physical activity and rs9939609 SNP interaction, such as the ethnicity, gender and age of participants. Kilpeläinen et al. [37], in a meta-analysis, found that physical activity attenuates the odds ratio for obesity in 27% in adults with the A allele, but in children and adolescents this interaction was not observed.

Despite promising results, our work has some restrictions. The largest of these refers to the samples size, which generally affect the identification of minor effects. This restriction also influenced the analyzes performed in the obese children and adolescents group, which could not be stratified according to sex neither to specific age groups, which could be important for the identification of sex and age dependent *FTO* interactions.

Knowing the magnitude of contributing factors for obesity and associated co morbidities is extremely important, given the particularities of treatment and prevention that may arise from this knowledge. In this sense, we found that the obese women A-allele carriers, who composed our sample, were less benefited by applied dietary intervention, compared to non-carriers, being this difference represented by the smaller decrease in abdominal circumference, a characteristic that is of great importance in terms of metabolic health.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES and CNPq.

References

- [1] Heni M, Kullmann S, Veit R, Ketterer C, Frank S, Machicao F, et al. Variation in the obesity risk gene FTO determines the postprandial cerebral processing of food stimuli in the prefrontal cortex. *Mol Metab* 2014;3:109–13. doi:10.1016/j.molmet.2013.11.009.
- [2] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science* 2007;316:889–93.
- [3] Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal eighteen new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2011;42:937–48. doi:10.1038/ng.686.Association.
- [4] Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015;518:197–206. doi:10.1038/nature14177.
- [5] O’Rahilly S, Sadaf Farooqi I, Yeo GSH, Challis BG. Minireview: Human obesity - Lessons from monogenic disorders. *Endocrinology* 2003;144:3757–64. doi:10.1210/en.2003-0373.
- [6] Leońska-duniec A, Jastrzębski Z, Zarębska A, Maciejewska A, Ficek K, Ciężczyk P. Assessing effect of interaction between the FTO A/T polymorphism (rs9939609) and Physical Activity on Obesity-related traits. *J Sport Heal Sci* 2016;352. doi:10.1016/j.jshs.2016.08.013.
- [7] Gerken T, Girard CA, Tung Y-CL, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007;318:1469–72. doi:10.1126/science.1151710.
- [8] Jia G, Yang CG, Yang S, Jian X, Yi C, Zhou Z, et al. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett* 2008;582:3313–9. doi:10.1016/j.febslet.2008.08.019.

- [9] Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet* 2010;26:266–74. doi:10.1016/j.tig.2010.02.006.
- [10] Stratigopoulos G, Padilla S, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, et al. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Am J Physiol* 2010;294:R1185–96. doi:10.1152/ajpregu.00839.2007.Regulation.
- [11] Cecil JE, Tavendale R, Watt P, et al. An Obesity-Associated FTO Gene Variant and Increased Energy Intake in Children. *N Engl J Med* 2008;359:2558–66.
- [12] Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1961–5. doi:10.1038/oby.2008.318.
- [13] Saliba LF, Reis RS, Brownson RC, Hino AA, Tureck LV, Valko C, et al. Obesity-related gene ADRB2, ADRB3 and GHRL polymorphisms and the response to a weight loss diet intervention in adult women. *Genet Mol Biol* 2014;37:15–22. doi:10.1590/S1415-47572014000100005.
- [14] Cogill B. Anthropometric indicators measurement guide. *Food Nutr Tech Assist Proj* 2003; 8-92.
- [15] World Health Organization. Obesity and overweight. World Health Organization, 2016. <http://www.who.int/topics/obesity/en/>. 23/09/2017.
- [16] Lahiri DK, Numberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444.
- [17] Shahid A, Rana S, Saeed S, Imran M, Afzal N, Mahmood S. Common Variant of FTO Gene, rs9939609, and Obesity in Pakistani Females. *BioMed Research International* 2013;2013:1-7.
- [18] Muñoz-Yáñez C, Pérez-Morales R, Moreno-Macías H, Calleros-Rincón E, Ballesteros G, González RA, et al. Polymorphisms FTO rs9939609, PPARG rs1801282 and ADIPOQ rs4632532 and rs182052 but not lifestyle are associated with obesity related-traits in Mexican children. *Genet Mol Biol* 2016;553:547–53. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2015-0267.
- [19] Prakash J, Mittal B, Srivastava A, Awasthi S, Srivastava N. Association of FTO rs9939609 SNP with Obesity and Obesity- Associated Phenotypes in a North Indian Population. *Oman Med J* 2016;31:99–106. doi:10.5001/omj.2016.20.
- [20] White UA, Tchoukalova YD. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *BBA - Mol Basis Dis* 2014;1842:377–92.

- doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.006.
- [21] Smith SR, Lovejoy JC, Greenway F, Ryan D, Bretonne J De, Volafova J, et al. Contributions of Total Body Fat, Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue Compartments, and Visceral Adipose Tissue to the Metabolic Complications of Obesity. *Metabolism* 2001;50. doi:10.1053/meta.2001.21693.
- [22] Amati F, Pennant M, Azuma K, Dubé JJ, Toledo FGS, Rossi AP, et al. Lower Thigh Subcutaneous and Higher Visceral Abdominal Adipose Tissue Content Both Contribute to Insulin Resistance. *Obesity* 2012;20:1115–7. doi:10.1038/oby.2011.401.
- [23] Tordjman J, Divoux A, Prifti E, Poitou C, Pelloux V, Hugol D, et al. Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue : Relation with liver histopathology in morbid obesity. *J Hepatol* 2012;56:1152–8. doi:10.1016/j.jhep.2011.12.015.
- [24] Awad NS, El-tarras AE. Analysis of the APO B R3500Q Mutation and APOE Polymorphism in Taif Saudi Population using Polymerase Chain Reaction-Reveres Hybridization Technique. *J Mol Biomark Diagn* 2011;2:2–5. doi:10.4172/2155-9929.1000109.
- [25] Kanaley JA, Sames C, Swisher L, Swick AG, Ploutz-Snyder LL, Stepan CM, et al. Abdominal Fat Distribution in Pre- and Postmenopausal Women: The Impact of Physical Activity, Age, and Menopausal Status. *Metabolism* 2001;50:976–82. doi:10.1053/meta.2001.24931.
- [26] Al-Attar SA, Pollex RL, Ban MR, Young TK, Bjerregaard P, Anand SS, et al. Association between the FTO rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-Caucasian multi-ethnic sample. *Cardiovasc Diabetol* 2008;7:5. doi:10.1186/1475-2840-7-5.
- [27] Kring SII, Holst C, Zimmermann E, Jess T, Berentzen T, Toubro S, et al. FTO gene associated fatness in relation to body fat distribution and metabolic traits throughout a broad range of fatness. *PLoS One* 2008;3:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0002958.
- [28] Liguori R, Labruna G, Alfieri A, Martone D, Farinaro E, Contaldo F, et al. The FTO gene polymorphism (rs9939609) is associated with metabolic syndrome in morbidly obese subjects from southern Italy. *Mol Cell Probes* 2014;28:195–9. doi:10.1016/j.mcp.2014.03.004.
- [29] Berulava T, Horsthemke B. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO

- gene affect primary transcript levels. *Eur J Hum Genet* 2010;18:1054–6. doi:10.1038/ejhg.2010.71.
- [30] Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, et al. Inactivation of the *Fto* gene protects from obesity. *Nature* 2009;458:894–8. doi:10.1038/nature07848.
- [31] Merkestein M, McTaggart JS, Lee S, Kramer HB, McMurray F, Lafond M, et al. Changes in gene expression associated with *FTO* overexpression in mice. *PLoS One* 2014;9:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0097162.
- [32] Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289–95. doi:10.1038/nature05026.
- [33] Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Teboul L, et al. Overexpression of *Fto* leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet* 2010;42:1086–92. doi:10.1038/ng.713.
- [34] Petkeviciene J, Smalinskiene A, Klumbiene J, Petkevicius V, Kriaucioniene V, Lesauskaite V. Physical activity, but not dietary intake, attenuates the effect of the *FTO* rs9939609 polymorphism on obesity and metabolic syndrome in Lithuanian adult population. *Public Health* 2015;135:23–9. doi:10.1016/j.puhe.2016.02.009.
- [35] Berentzen T, Kring SII, Holst C, Zimmermann E, Jess T, Hansen T, et al. Lack of association of fatness-related *FTO* gene variants with energy expenditure or physical activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2904–8. doi:10.1210/jc.2008-0007.
- [36] Kim JY, DeMenna JT, Puppala S, Chittoor G, Schneider J, Duggirala R, et al. Physical activity and *FTO* genotype by physical activity interactive influences on obesity. *BMC Genet* 2016;17:47. doi:10.1186/s12863-016-0357-6.
- [37] Kilpeläinen TO, Qi L, Brage S, Sharp SJ, Sonestedt E, Demerath E, et al. Physical Activity Attenuates the Influence of *FTO* Variants on Obesity Risk: A Meta-Analysis of 218,166. *PLoS Med* 2011;8:e1001116.
- [38] Milano GE, Leite N, Chaves TJ, Eisfeld G, Lehtonen R, Souza R De, et al. Atividade da butirilcolinesterase e fatores de risco cardiovascular em adolescentes obesos submetidos a um programa de exercícios físicos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013;57:533–7.
- [39] Lopes WA, Leite N, Silva LR, Brunelli DT, Gáspari AF, Radominski RB, et al.

Effects of 12 weeks of combined training without caloric restriction on inflammatory markers in overweight girls. *Nutrition and Biochemistry* 2016;34:1902-12.

- [40] Leite N, Lazarotto L, Cavazza JF, Lopes MDFA, Bento PCB, Torres R, et al. Efeitos de exercícios aquáticos e orientação nutricional na composição corporal de crianças e adolescentes obesos. *Rev Bras Cineantropometria E Desempenho Hum* 2010;12:232–8. doi:10.5007/1980-0037.2010v12n4p232.

