

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**O PAPEL DAS PROTEÍNAS DESACOPLADORAS E SUAS
PROTEÍNAS REGULATÓRIAS NA OBESIDADE E DIABETES
MELLITUS**

Tese de doutorado

Letícia de Almeida Brondani

Porto Alegre, setembro de 2015.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**O PAPEL DAS PROTEÍNAS DESACOPLADORAS E SUAS
PROTEÍNAS REGULATÓRIAS NA OBESIDADE E DIABETES
MELLITUS**

Letícia de Almeida Brondani

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Endocrinologia.

Porto Alegre, setembro de 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

Brondani, Letícia de Almeida

O papel das proteínas desacopladoras e suas
proteínas regulatórias na obesidade e diabetes
mellitus / Letícia de Almeida Brondani. -- 2015.
137 f.

Orientadora: Daisy Crispim.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. proteínas desacopladoras. 2. diabetes mellitus.
3. obesidade. I. Crispim, Daisy, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira, pela impecável orientação iniciada desde a época da minha graduação. Durante esses 7 anos eu tive o privilégio de trabalhar com um exemplo de profissional, dedicada e competente. Muito obrigada por sempre confiar na minha capacidade e contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal. Tenho as melhores recordações de todos os ensinamentos e momentos de carinho e amizade que muito me acrescentaram. Eternamente grata por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. Décio Laks Eizirik, pela ótima recepção em seu laboratório na *Université Libre de Bruxelles (ULB)* - Bélgica e pelos enriquecedores ensinamentos e desafios científicos.

A todos os colaboradores deste trabalho, principalmente à Dra Andrea C. Bauer e à Profa. Dra. Cristiane B. Leitão, pelos ensinamentos, simpatia e incentivos à pesquisa científica.

À minha amiga e colaboradora, Taís S. Assmann, que sempre esteve ao meu lado. Obrigada pelo companheirismo, carinho e amizade de sempre.

Aos colegas e amigos do laboratório do Serviço de Endocrinologia - HCPA pelas valiosas conversas e discussões propiciando um ótimo ambiente de trabalho.

Aos colegas e amigos do *Center for Diabetes Research - ULB*, especialmente à Dra. Tatiana H. Rech, pelas colaborações e amizade durante o tempo em que estudei em Bruxelas.

À minha amiga e colega, Dra. Mírian Romitti, por dividir comigo os fascínios e aflições de estudar no exterior.

Aos alunos de iniciação científica e que agora são alunos de mestrado, Gabriela Boelter e Guilherme C. Kullmann Duarte, pelo comprometimento e ajuda para que esta pesquisa fosse realizada.

Aos meus pais Enio A. Brondani e Jussara C. de Almeida Brondani pelo apoio e suporte na minha formação e pelo exemplo de trabalho e integridade.

Ao meu amor, Gustavo de Ávila Lopes, pela paciência e todo o amor dedicado a mim ao longo dessa e de muitas outras etapas da minha vida.

A CAPES, CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA pelo financiamento desta pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma também contribuíram para a concretização deste trabalho.

Esta tese de doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de uma breve introdução sobre o assunto, seguida dos manuscritos originais sobre o tema da tese.

- **Artigo original 1:** “Association of the *UCP* polymorphisms with susceptibility to obesity: case-control study and meta-analysis” (publicado na revista *Molecular Biology Reports* em 2014).

- **Artigo original 2:** “Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (*UCP*) 1-3 genes with body mass index variability” (publicado na revista *Plos One* em 2014).

- **Artigo original 3:** “The presence of at least three alleles of the *ADRB3* Trp64Arg (C/T) and *UCP1* -3826A/G polymorphisms is associated with protection to overweight/obesity and with higher high-density lipoprotein cholesterol levels in Caucasian-Brazilian patients with type 2 diabetes” (publicado na revista *Metabolic Syndrome and Related Disorders* em 2014).

- **Artigo original 4:** “Irisin-encoding gene (*FND5*) variant is associated with changes in blood pressure and lipid profile in type 2 diabetic women but not in men” (publicado na revista *Metabolism* em 2015).

- **Artigo original 5:** “There is an increased expression of *UCP2* in pancreas from brain-dead donors and *UCP2* increases cytokine-induced beta-cell apoptosis” (a ser submetido para a revista *Molecular and Cellular Endocrinology*).

Lista de abreviaturas para a introdução

ADRB3	Gene para o Receptor β 3-adrenérgico
β3-AR	Receptor β 3-adrenérgico
3'UTR	<i>3' Untranslated Region</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
CRM	Cadeia Respiratória Mitocondrial
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FNDC5	<i>Fibronectin type III Domain Containing 5</i>
FOX-A1	<i>Forkhead Box A1</i>
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
ME	Morte Encefálica
PGC-1α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator-α</i>
PPAR-α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-α</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
PPAR-δ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-δ</i>
SIRT-1	<i>Sirtuin-1</i>
SOD2	Superóxido Dismutase 2
SREBP-1c	<i>Sterol Regulatory element binding-protein-1c</i>
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom

UCP1	Proteína Desacopladora 1
UCP2	Proteína Desacopladora 2
UCP3	Proteína Desacopladora 3
UCP4	Proteína Desacopladora 4
UCP5	Proteína Desacopladora 5
UCPs	Proteínas Desacopladoras

Lista de abreviaturas para os artigos originais

3'UTR	<i>Untranslated Region</i>
ADRB3	<i>β3-adrenergic Receptor Gene</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
β3-AR	<i>β3-adrenergic Receptor</i>
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i>
BD	<i>Brain Death</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BP	<i>Blood Pressure</i>
CI	<i>Confidence Interval</i>
DPB	<i>Diastolic Blood Pressure</i>
FEM	<i>Fixed Effect Model</i>
FFAs	<i>Free-fatty Acids</i>
FNDC5	<i>Fibronectin type III Domain Containing 5</i>
FPG	<i>Fasting Plasma Glucose</i>
GLM	<i>General Linear Model</i>
HDL-C	<i>HDL Cholesterol</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible Factor-1α</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
IFN-γ	<i>Interferon-γ</i>
LDL-C	<i>LDL Cholesterol</i>
MRC	<i>Mitochondrial Respiratory Chain</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NOS	<i>Newcastle-Ottawa Scale</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>

PAX6	<i>Paired Box Gene 6</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGC-1α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator-α</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
REM	<i>Random Effect Model</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative Real-time PCR</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SOD2	<i>Superoxide Dismutase 2</i>
SPB	<i>Systolic Blood Pressure</i>
T2DM	<i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>
TC	<i>Total cholesterol</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UCP1	<i>Uncoupling Protein 1</i>
UCP2	<i>Uncoupling Protein 2</i>
UCP3	<i>Uncoupling Protein 3</i>
UCPs	<i>Uncoupling Proteins</i>
WAT	<i>White Adipose Tissue</i>
WMD	<i>Weighted Mean Difference</i>

SUMÁRIO

Resumo	12
Abstract	16
Introdução	20
Referências da introdução	34
Justificativa e objetivos	31
Parte I – Artigo original: “Association of the <i>UCP</i> polymorphisms with susceptibility to obesity: case-control study and meta-analysis”.....	40
Parte II – Artigo original: “Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (<i>UCP</i>) 1-3 genes with body mass index variability”.....	41
Parte III – Artigo original: “The presence of at least three alleles of the <i>ADRB3</i> Trp64Arg (C/T) and <i>UCP1</i> -3826A/G polymorphisms is associated with protection to overweight/obesity and with higher high-density lipoprotein cholesterol levels in Caucasian-Brazilian patients with type 2 diabetes”.....	42
Parte IV – Artigo original: “Irisin-encoding gene (<i>FNDC5</i>) variant is associated with changes in blood pressure and lipid profile in type 2 diabetic women but not in men”..	43
Parte V – Artigo original: “There is an increased expression of <i>UCP2</i> in pancreas from brain-dead donors and <i>UCP2</i> increases cytokine-induced beta-cell apoptosis”...	44
Conclusões	45
Colaborações em outros estudos	47

RESUMO

Em vista do forte envolvimento de fatores genéticos na patogênese da obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), grandes esforços têm sido realizados para se identificar genes associados a estas doenças. Neste contexto, diversos estudos têm sido focados em genes relacionados ao gasto energético, como os genes para as proteínas desacopladoras (UCPs), receptor β 3-adrenérgico (β 3-AR) e, mais recentemente, irisina.

As UCPs estão presentes na membrana mitocondrial interna e, apesar de terem similaridades nas suas estruturas, possuem uma expressão tecidual diferente. Estas proteínas desacoplam a oxidação dos substratos na mitocôndria da síntese de ATP, dissipando a energia do potencial de membrana e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ATP pela cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Este desacoplamento está associado a funções tecido-específicas como regulação do gasto energético e do metabolismo de ácidos graxos livres e diminuição da secreção de insulina e da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), mecanismos associados à patogênese da obesidade e DM2. Sendo assim, as associações entre polimorfismos nos genes *UCP1-3* e suscetibilidade a estas doenças têm sido investigadas em diversas populações. No entanto, o impacto destes polimorfismos na obesidade e DM2 ainda está em debate, com resultados contraditórios sendo relatados.

Deste modo, realizou-se um estudo de caso-controle na nossa população, seguido de uma revisão sistemática e metanálise dos estudos disponíveis na literatura para avaliar se os seguintes polimorfismos nos genes *UCP1-3* estavam associados com a suscetibilidade à obesidade: -3826A/G (*UCP1*); -866G/A, Ala55Val e Ins/Del (*UCP2*) e -55C/T (*UCP3*). Os resultados do estudo de caso-controle foram incluídos na metanálise. No estudo de caso-controle, não encontramos nenhuma associação dos

polimorfismos analisados com suscetibilidade à obesidade em pacientes com DM2. Quarenta e sete estudos foram incluídos na metanálise e os resultados mostraram que os polimorfismos -866G/A (*UCP2*) e -55C/T (*UCP3*) estão associados com proteção para obesidade em europeus. Por outro lado, os polimorfismos Ala55Val e Ins/Del (*UCP2*) foram associados com risco para obesidade em asiáticos e europeus, respectivamente.

Considerando que polimorfismos nos genes *UCP1-3* podem estar associados a pequenas variações no índice de massa corporal (IMC) sem estarem, necessariamente, associados à obesidade, realizou-se outra revisão sistemática e metanálise com o objetivo de investigar se os polimorfismos descritos acima estavam associados com variações no IMC. A metanálise de 56 estudos mostrou que os polimorfismos Ins/Del (*UCP2*) e -55C/T (*UCP3*) estão associados a um aumento no IMC em asiáticos, enquanto o polimorfismo Ala55Val (*UCP2*) está associado a um aumento do IMC em europeus. Entretanto, o polimorfismo -866G/A (*UCP2*) parece estar associado a uma diminuição do IMC em europeus. As duas metanálises sugerem que o polimorfismo -3826A/G (*UCP1*) não está associado com obesidade ou IMC.

Interações entre polimorfismos nos genes *UCP1-3* com polimorfismos nos genes de suas proteínas regulatórias (como, por exemplo, nos genes *ADRB3* e *FNDC5*) podem influenciar as suas associações com obesidade e DM2. O gene *ADRB3* codifica o receptor β 3-AR, um importante regulador da expressão de *UCP1* e mediador da lipólise. O gene *FNDC5* codifica o hormônio irisina, uma nova miocina associada à redução de obesidade visceral e melhora no metabolismo da glicose em camundongos. A irisina atua no tecido adiposo branco, estimulando a expressão de *UCP1*, a qual induz a transformação do tecido em um fenótipo mais parecido com o do tecido adiposo marrom, aumentando o gasto energético.

Em vista do exposto, investigamos se os polimorfismos -3826A/G (*UCP1*) e Trp64Arg (*ADRB3*), sozinhos ou em combinação, estavam associados com DM2 ou características associadas. Os dois polimorfismos não foram associados ao DM2; entretanto, em pacientes com DM2, o alelo 64Arg foi associado com proteção para sobrepeso e obesidade [IMC \geq 25 Kg/m²; razão de chances (RC) = 0,598; p = 0,014]. Interessantemente, a prevalência de sobrepeso/obesidade foi menor em portadores de \geq 3 alelos raros dos dois polimorfismos quando comparados a portadores de <3 alelos raros (54,5% vs. 79,1%; RC = 0,288; p = 0,007). Os portadores de \geq 3 alelos raros destes polimorfismos também tiveram os níveis do colesterol HDL aumentados (p = 0,018).

Em outro estudo de caso-controle avaliamos se os polimorfismos rs1746661 e rs3480 no gene *FNDC5* estavam associados ao DM2 e características associadas. As frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas destes polimorfismos foram similares em casos e controles. Entretanto, mulheres com DM2 portadoras do alelo G do polimorfismo rs3480 apresentaram um aumento na hemoglobina glicada (HbA1c) quando comparadas ao genótipo A/A. O alelo T do polimorfismo rs1746661 foi associado com o aumento da pressão sistólica, colesterol total e colesterol LDL e diminuição do colesterol HDL em mulheres com DM2. Essas associações não foram observadas em homens.

A UCP2 parece ter também um papel importante na regulação da apoptose das células-beta pancreáticas; entretanto, se este papel é anti-apoptótico ou pró-apoptótico ainda precisa ser melhor definido. Recentemente, um estudo do nosso grupo demonstrou que a expressão de *Ucp2* estava aumentada no pâncreas de um modelo murino de morte encefálica (ME), possivelmente devido ao aumento da inflamação e estresse oxidativo associado à ME. Sendo assim, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a expressão da *UCP2* no pâncreas de doadores de órgãos em ME. Também

foi realizado um estudo experimental em células INS-1E, uma linhagem de células-beta de ratos, para avaliar o papel do bloqueio da *Ucp2* na apoptose das células-beta submetidas à inflamação. Em concordância com nossos resultados prévios em ratos, a expressão de *UCP2* foi aumentada no pâncreas de doadores de órgãos em ME comparado aos controles ($1,73 \pm 0,93$ vs. $0,75 \pm 0,66$ *fold change*; $p < 0,05$). O bloqueio de *Ucp2* reduziu em 30% a apoptose e a produção de óxido nítrico em células INS-1E incubadas com citocinas pró-inflamatórias. Dados obtidos sugerem que esta proteção está associada à via intrínseca de apoptose.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que polimorfismos nos genes *UCP2* e *UCP3* estão associados à obesidade em diferentes populações. Os alelos G do polimorfismo -3826A/G (*UCP1*) e Arg do polimorfismo Trp64Arg (*ADRB3*) parecem interagir na modulação do sobrepeso/obesidade e níveis de colesterol HDL em indivíduos com DM2. Além disso, o alelo G do polimorfismo rs3480 (*FNDC5*) está associado com níveis aumentados de HbA1c, enquanto que o alelo T do polimorfismo rs1746661 parece estar associado com pressão sistólica aumentada e dislipidemia em mulheres com DM2. Por último, nossos dados experimentais sugerem que a *UCP2* tem um efeito apoptótico em células-beta submetidas a condições pró-inflamatórias, por meio da regulação da via intrínseca de apoptose.

ABSTRACT

In view of the strong involvement of genetic factors in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM), great efforts have been done to identify genes associated with these diseases. In this context, several studies have been focused on genes encoding proteins related to energy expenditure, such as uncoupling proteins (UCPs), β 3-adrenergic receptor (β 3-AR) and, more recently, irisin.

UCPs are located in the mitochondrial inner membrane and, despite similarities in their structures, they have different tissue expressions. These proteins uncouple substrate oxidation in mitochondria from ATP synthesis, thereby dissipating the membrane potential energy and, consequently, decreasing ATP production by mitochondrial respiratory chain (MRC). The uncoupling is associated with tissue-specific functions such as energy expenditure and free-fatty acids regulation and decreasing insulin secretion and reactive oxygen species (ROS) production, all mechanisms associated with obesity and T2DM pathogenesis. Thus, the relationship between *UCP1-3* polymorphisms and susceptibility to these diseases has been investigated in several populations. However, the impact of these polymorphisms on obesity and T2DM is still under debate, with contradictory results being reported.

Therefore, we performed a case-control study in our population followed by a systematic review and meta-analysis of published studies in order to evaluate whether the following polymorphisms were associated with susceptibility to obesity: -3826A/G (*UCP1*); -866G/A, Ala55Val and Ins/Del (*UCP2*), and -55C/T (*UCP3*). Results obtained in our case-control study were also included in the meta-analysis. In the case-control study, we did not find any association between the analyzed polymorphisms and obesity. Forty-seven studies were included in the meta-analysis, and results showed

that *UCP2* -866G/A and *UCP3* -55C/T polymorphisms are associated with protection to obesity in Europeans. On the other hand, *UCP2* Ala55Val and Ins/Del polymorphisms were associated with obesity in Asians and Europeans, respectively.

Considering that *UCP1-3* polymorphisms may be associated with small changes in body mass index (BMI) without being, necessarily, associated with obesity, we performed another systematic revision with meta-analysis aiming to evaluate if the polymorphisms described above are associated with BMI changes. Meta-analysis of 56 studies showed that *UCP2* Ins/Del and *UCP3* -55C/T polymorphisms were associated with increased BMI in Asians, while the *UCP2* Ala55Val polymorphism was associated with increased BMI in Europeans. However, the *UCP2* -866G/A polymorphism seems to be associated with decreased BMI in Europeans. Both meta-analyses suggest that the *UCP1* -3826A/G polymorphism is not associated with obesity or BMI.

Interactions between polymorphisms in *UCP1-3* genes with polymorphisms in genes for their regulatory proteins (such as in *ADRB3* and *FNDC5* genes) could influence their associations with obesity or T2DM. *ADRB3* gene codifies for β 3-AR, an important *UCP1* regulator and mediator of lipolysis. *FNDC5* gene codifies for the hormone irisin, a novel myokine which reduces visceral obesity and improves glucose metabolism in mice. Irisin acts on white adipose cells, stimulating *UCP1* expression, which induces the transformation of these cells in brown fat-like cells, increasing energetic expenditure.

In view of the foregoing, we investigated if *UCP1* -3826A/G and *ADRB3* Trp64Arg polymorphisms, individually or in combination, were associated with T2DM or related characteristics. Both polymorphisms were not associated with T2DM; however, in T2DM patients, the 64Arg allele was associated with protection against overweight and obesity [BMI \geq 25 kg/m²; odds ratio (OR) = 0.598; P = 0.014].

Interestingly, prevalence of overweight/obesity was lower among carriers of at least three minor alleles of the two polymorphisms than among patients with fewer than three minor alleles (54.5% vs. 79.1%; OR = 0.288; P = 0.007). Subjects with at least three minor alleles also had higher HDL-cholesterol levels (P = 0.018).

In another case-control study, we evaluated if rs1746661 and rs3480 polymorphisms in the *FNDC5* gene were associated with T2DM or related features. Genotype, allele and haplotype frequencies of both polymorphisms were similar between case and control subjects. Nevertheless, women with T2DM carrying the rs3480G allele showed increased HbA1c levels compared with A/A carriers. The rs1746661T allele was associated with increased systolic blood pressure, total cholesterol and LDL-cholesterol and decreased HDL-cholesterol in women with T2DM. These associations were not observed in men.

There is increasing evidence that UCP2 also plays a role in regulating apoptosis in pancreatic beta-cells; however, if this role is proapoptotic or anti-apoptotic still needs to be better defined. Recently, a study from our group showed increased *Ucp2* expression in pancreas from a rat brain-death (BD) model, possibly due to BD-associated increased inflammation and oxidative stress. Therefore, one aim of the present study was to evaluate *UCP2* expression in pancreas from human BD donors. Also, an experimental study was conducted in INS-1E cells (lineage of murine beta-cells) to analyze the role of *Ucp2* knockdown in beta-cell apoptosis submitted to inflammation. In agreement with our previous results in rats, *UCP2* expression was increased in pancreas from BD donors compared to controls (1.73 ± 0.93 vs. 0.75 ± 0.66 fold change; $P < 0,05$). *Ucp2* knockdown was able to reduce by 30% cytokine-induced apoptosis and nitric-oxide production in INS-1E cells. Our data suggest that this protection was associated to the intrinsic apoptotic pathway.

In conclusion, our results indicate that polymorphisms in *UCP2* and *UCP3* genes are associated to obesity in different populations. The G allele of -3826A/G (*UCP1*) polymorphism and Arg allele of Trp64Arg (*ADRB3*) polymorphism seem to interact in the modulation of overweight/obesity and HDL cholesterol levels in T2DM subjects. Moreover, the G allele of the rs3480 (*FNDC5*) polymorphism is associated to higher HbA1c levels, while the T allele of the rs1746661 polymorphism seems to be associated with higher systolic blood pressure and dyslipidemia in women with T2DM. Lastly, our experimental data suggest that *UCP2* has an apoptotic effect in beta-cells exposed to pro-inflammatory conditions through regulation of the intrinsic apoptosis pathway.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, cerca de 7,5% da população têm diabetes mellitus (1) e a prevalência de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está aumentando em decorrência do alarmante aumento da obesidade no mundo todo [revisado em (2)]. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos tinham sobrepeso e desses mais de 600 milhões eram obesos (3). Esta epidemia de obesidade e DM2 está associada à redução da longevidade e qualidade de vida da população (4). Hábitos alimentares inadequados, inatividade física, urbanização, predisposição genética e envelhecimento contribuem para o aumento na prevalência dessas doenças (2).

A obesidade é caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura corporal resultante de um desequilíbrio entre a energia gasta e a adquirida (3). Esse desequilíbrio pode ser devido a fatores de risco genéticos ou ambientais ou mais provavelmente pela combinação dos dois (5). Estudos em gêmeos monozigóticos demonstraram que 50-70% da variância fenotípica do índice de massa corporal (IMC) pode ser explicada por fatores genéticos (6). Entretanto, estudos demonstram que a herdabilidade possa ser influenciada por fatores ambientais. Ainda que a herdabilidade da porcentagem de massa gorda seja de até 90% em gêmeos que praticaram menos exercícios físicos, essa porcentagem é reduzida em aproximadamente 20% nos pares de gêmeos mais ativos e da mesma etnia (7). Esses achados indicam que a influência genética na obesidade é amplificada em um ambiente obesogênico, sendo que a atividade física de forma intensa e constante é um método eficaz para conter alguns dos efeitos deletérios das variantes genéticas de suscetibilidade à obesidade (8).

O DM2 corresponde a 90-95% dos casos de diabetes mellitus, ocorre principalmente em indivíduos com mais de 40 anos de idade e é caracterizado por uma

hiperglicemia crônica causada por um desequilíbrio entre a ação e a secreção de insulina (9). O reconhecimento de que o DM2 tem fortes determinantes genéticos foi baseado principalmente na alta incidência dessa doença entre familiares de 1º grau de pacientes com DM2 (30-40%) e na alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos (cerca de 90%) comparada a de gêmeos dizigóticos (10). Entretanto, da mesma forma que para a obesidade, o DM2 é uma doença multifatorial influenciada também por fatores ambientais. A interação entre variáveis genéticas e ambientais é evidenciada em estudos que mostram que um estilo de vida saudável ou uma modificação no estilo de vida podem conter o efeito de variantes genéticas associadas ao risco de desenvolver obesidade e DM2 (8, 11-13).

Como adultos obesos com o IMC $>35 \text{ kg/m}^2$ são 20 vezes mais predispostos a desenvolver DM2 comparados com aqueles indivíduos com IMC entre 18,5 – 24,9 kg/m^2 (14) e a obesidade *per se* causa algum grau de resistência à insulina (9), genes envolvidos na obesidade também podem predispor ao DM2. Sendo assim, em vista do forte envolvimento de fatores genéticos na patogênese da obesidade e DM2, tem-se buscado a identificação de genes associados a estas doenças (12, 13, 15) e diversos estudos têm sido focados em genes relacionados ao gasto energético, como os genes para as proteínas desacopladoras (*uncoupling proteins* - UCPs), receptor β 3-adrenérgico (β 3-AR) e, mais recentemente, irisina (16, 17).

1.1. Proteínas desacopladoras (UCPs) e suas proteínas regulatórias chaves

As UCPs estão presentes na membrana mitocondrial interna e fazem parte de uma superfamília de proteínas transportadoras. A UCP1, a UCP2 e a UCP3 têm similaridades nas suas estruturas, mas possuem uma expressão tecidual diferente (18,

19). Através do transporte de prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, essas UCPs desacoplam a oxidação dos substratos da síntese de ATP, dissipando a energia do potencial de membrana e, conseqüentemente, diminuindo a produção de ATP pela cadeia respiratória mitocondrial (CRM) (20, 21) (**Figura 1**). A dissipação de energia pelas UCPs pode ter diversas funções: produção de calor (UCP1), regulação do metabolismo de ácidos graxos livres (UCP2 e UCP3), diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio – EROs (UCP1 a 3) e regulação de processos ATP-dependentes, como por exemplo, a regulação da secreção de insulina (UCP2) (18, 20, 22).

A UCP1 é expressa principalmente no tecido adiposo marrom (TAM), o qual é responsável pela termogênese em recém-nascidos (19). Em certas condições fisiológicas, a UCP1 também pode ser expressa em outros tecidos, como tecido adiposo branco (TAB), células da retina e ilhotas pancreáticas (19, 23-25). A descoberta do TAM em humanos adultos e a sua correlação com o IMC (26) sugere que a sua ativação pode proteger contra a obesidade. Sendo assim, defeitos no gene *UCP1* que causam uma redução na sua expressão podem aumentar o risco do desenvolvimento de obesidade e doenças metabólicas associadas, como o DM2 (19, 22).

O gene *UCP1* está localizado no cromossomo 4 em humanos e tem sua expressão regulada principalmente pelo sistema nervoso simpático via o receptor β 3-AR após estimulação por frio, agonistas- β 3, hormônio retinóide, hormônio da tireóide, AMPc e ácidos graxos não-esterificados (20, 27). O gene que codifica o receptor β 3-AR (*ADRB3*) é principalmente expresso no TAM e no TAB e apresenta um importante papel na indução da lipólise e regulação da homeostase energética (20). O co-ativador PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α*) também é um importante regulador da expressão de *UCP1* após estimulação adrenérgica (17, 20).

Para uma revisão mais ampla sobre as funções da UCP1, seus reguladores e de seu papel na patogênese do DM2 e gasto energético ver uma revisão publicada por nosso grupo, em 2012 (19).

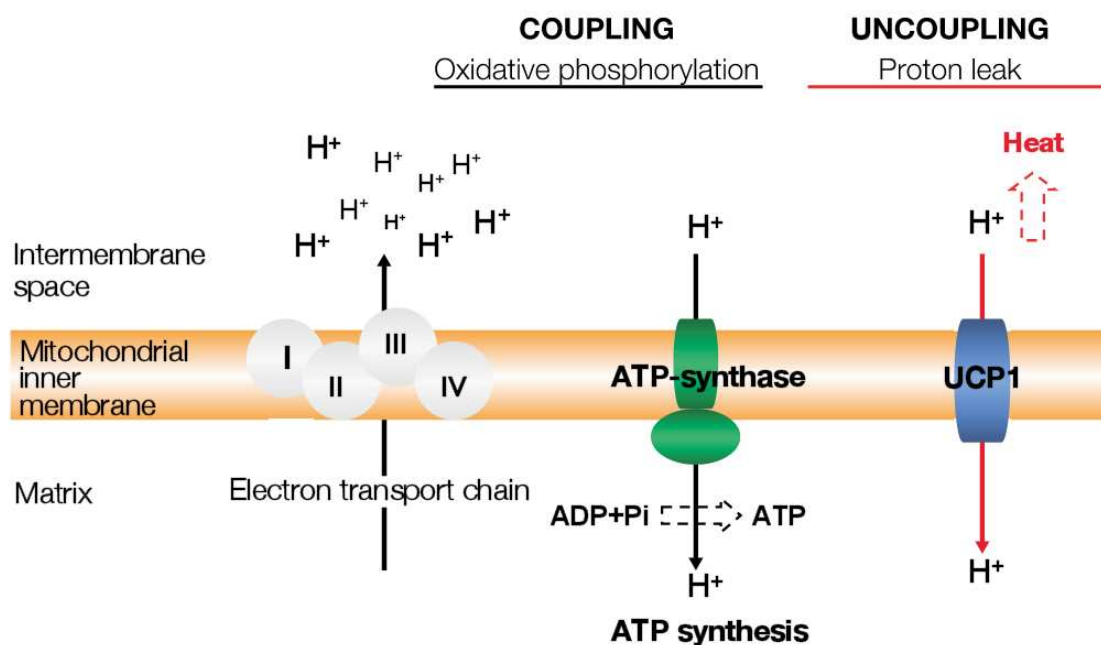


Figura 1. Localização e função da UCP1 na cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Os números I-IV correspondem aos complexos da CRM. ATP-sintase é o quinto complexo da CRM. Durante a respiração, prótons são bombeados através dos complexos da CRM e um gradiente de prótons é gerado. A energia do gradiente de prótons induz a síntese de ATP pelo complexo ATP-sintase. A UCP1 catalisa a reentrada de prótons para a matriz mitocondrial, desacoplando a CRM e, conseqüentemente, reduzindo a síntese de ATP e levando à geração de calor (19).

Outro indutor da UCP1 é a irisina, uma miocina recentemente descoberta. Em 2012, Boström *et al.* (28) demonstraram que o aumento da expressão de PGC-1 α no músculo de camundongos estimula a expressão do gene *FNDC5* (*fibronectin type III domain containing 5*), o qual codifica uma proteína de membrana que é clivada e secretada como o hormônio irisina. Este hormônio secretado por células musculares atua no TAB, estimulando a sua transformação em um fenótipo mais parecido com o do

TAM (“*browning*”) através do aumento da expressão da UCP1 (28). Este efeito foi associado à diminuição da obesidade visceral nos camundongos devido a um aumento do gasto energético, causado predominantemente pelo desacoplamento da CRM, o que é característico de termogênese.

Desde a sua descoberta, diversos estudos estão sendo realizados visando esclarecer o papel da irisina em diversas condições patológicas, como a obesidade e o DM2 [revisado em (29)]. Apesar de Boström *et al.* (28) terem mostrado que o exercício de resistência (por 10 semanas) foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de irisina em humanos saudáveis, a regulação da irisina pelo exercício é ainda contraditória (29). A irisina também parece ter um efeito antidiabetogênico por melhorar o metabolismo da glicose e reduzir a resistência à insulina em camundongos (28). Além disso, os níveis plasmáticos de irisina parecem estar reduzidos nos pacientes com DM2 e estão associados ao perfil lipídico (29-32). Em contraste, alguns estudos relataram que a irisina plasmática está positivamente correlacionada com o IMC [revisado em (33)].

A UCP2 apresenta uma distribuição tecidual bastante ampla, sendo expressa no TAM, TAB, músculo esquelético, coração, rins, células da retina e ilhotas pancreáticas (18, 34). A UCP3 humana está basicamente restrita ao músculo esquelético (20), apesar de poder ser encontrada em outros tecidos, incluindo células-beta pancreáticas, após estímulo (35, 36). Em humanos, os genes UCP2 e UCP3 estão localizados no cromossomo 11, distantes apenas 7 kb um do outro (37). A sequência do gene UCP2 humano é 57% similar ao gene UCP1 e 71% similar ao gene UCP3 (18). As UCP2 e 3, ao contrário da UCP1, causam apenas um desacoplamento leve da CRM, após indução por EROs, frio, hiperglicemia, hiperlipidemia, exercício ou hipertireodismo (20, 38, 39). As suas expressões são reguladas positivamente por PPAR- α (músculo esquelético e fígado), PPAR- γ (TAB), PPAR- δ (músculo esquelético), PGC-1 α e SREBP-1c (*sterol*

regulatory element binding-protein-1c) e negativamente por SIRT-1 (*sirtuin-1*) e FOX-A1 (*forkhead box A1*) (40, 41).

O desacoplamento leve da CRM pelas UCP2 e UCP3 causa uma diminuição da produção de EROs pela CRM, tendo um efeito protetor importante contra o estresse oxidativo (18, 39, 41). Além disso, está bem descrito na literatura que a UCP2 regula negativamente a secreção de insulina pelas células-beta (42-45). A superexpressão *in vitro* de UCP2 em ilhotas isoladas de ratos suprime completamente a secreção de insulina estimulada pela glicose (42). Por outro lado, ratos deficientes em UCP2 apresentam uma secreção aumentada de insulina em comparação a ratos com o gene normal e parecem estar protegidos do DM2 (43). A principal explicação para isto é que a expressão aumentada da UCP2 leva a uma diminuição na produção de ATP, o qual é requerido para o fechamento dos canais de potássio sensíveis à ATP e subsequente despolarização da membrana interna mitocondrial, influxo de cálcio e exocitose dos grânulos contendo insulina (18, 46). Além disso, parece que a geração transitória de EROs a partir do metabolismo da glicose serve como um importante sinal para induzir a secreção de insulina nas células-beta (47). Dessa forma, o bloqueio da UCP2 pode melhorar a função das células-beta devido à melhora da secreção de insulina estimulada pela glicose mesmo que esteja associado a um pequeno aumento na produção de EROs. Para uma revisão mais ampla sobre as funções da UCP2 e de seu papel na patogênese do DM2 e características associadas ver as revisões de Souza *et al.* (18) e Liu *et al.* (35).

Ácidos graxos são importantes reguladores fisiológicos da UCP2 e UCP3 através da via do PPAR- α , PPAR- γ e SREBP-1c (48). Neste contexto, a função primária da UCP3 parece ser o transporte de ânions de ácidos graxos para fora da matriz mitocondrial, protegendo a mitocôndria dos danos oxidativos causados pela peroxidação de lipídeos e permitindo taxas contínuas de oxidação dos ácidos graxos em

condições de abundância exagerada dessas macromoléculas (49). Pacientes com DM2 possuem um decréscimo característico nas taxas de fosforilação oxidativa mitocondrial, o que é acompanhado por uma redução de cerca de 50% nos níveis de UCP3 no músculo esquelético (49). Camundongos normais que se alimentam de uma dieta rica em gorduras exibem uma resistência à insulina marcante. Em oposição, camundongos transgênicos que expressam níveis altos de UCP3 no músculo estão completamente protegidos da resistência à insulina induzida por dieta; provavelmente porque a UCP3 esteja aumentando a taxa de oxidação da gordura na mitocôndria (50). Da mesma forma que a UCP3, a UCP2 também parece atuar no transporte direto de ácidos graxos, protegendo as células do dano causado pela peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (38). Mais recentemente, também se demonstrou que a UCP3 é expressa nas ilhotas pancreáticas, onde teria um papel oposto ao da UCP2 na secreção de insulina, estimulando a secreção deste hormônio (51). Para uma maior revisão sobre o papel da UCP3 no gasto energético e desenvolvimento do DM2 ver as revisões de Liu *et al.* (35) e Busiello *et al.* (51).

Cabe ressaltar que também já foram descritas as UCP4 e UCP5, as quais são principalmente expressas no tecido nervoso central (52). Apesar destas duas UCPs também desacoplarem a CRM, diminuindo o estresse oxidativo, elas não parecem ter um papel importante na patogênese da obesidade e doenças associadas (52).

Resumidamente, as UCP1-3 estão envolvidas na regulação do gasto energético e secreção de insulina, diminuição da produção de EROs e regulação do metabolismo e transporte de ácidos graxos livres, mecanismos associados à patogênese da obesidade e DM2. Dessa forma, variantes genéticas nos genes *UCP1-3* podem estar associadas a essas doenças.

1.2. Associações de polimorfismos nos genes *UCP1-3* e de suas proteínas associadas com obesidade ou diabetes mellitus tipo 2

Diversos polimorfismos têm sido estudados nos genes *UCP1-3* sobre suas possíveis associações com obesidade e DM2; entretanto, apenas um pequeno número destes polimorfismos tem mostrado associação consistente com essas características em mais de uma população (18, 19, 37, 53-56).

O principal polimorfismo no gene *UCP1* que parece estar associado com obesidade, DM2, perfil lipídico e pressórico em algumas populações é o polimorfismo -3826A/G (rs1800592) localizado na região 5'UTR do gene; entretanto, os resultados ainda não são conclusivos [revisado em (19, 35, 53, 54)]. Este polimorfismo parece ser funcional, pois está localizado na região promotora do gene e foi associado com uma redução do RNAm de *UCP1* no TAM de indivíduos obesos (57). Interessantemente, alguns estudos relatam que o alelo G desse polimorfismo atua sinergicamente com o alelo Arg do polimorfismo Trp64Arg (rs4994, C/T) no gene *ADRB3* (58-60). Indivíduos com DM2 que possuem o genótipo homocigoto ou heterocigoto para os dois alelos de risco (G-3826G / Arg64Arg ou A-3826G / Trp64Arg) apresentaram um maior ganho de peso em comparação a indivíduos sem esses genótipos (58).

Três polimorfismos frequentes foram descritos no gene *UCP2*: o polimorfismo Ala55Val (rs660339 C/T) no éxon 4 (61), o polimorfismo Ins/Del, que é uma inserção/deleção de 45 bp na região 3'UTR do éxon 8 (62), e o polimorfismo -866G/A na região promotora, o qual está associado a modificações da expressão do mRNA *UCP2* em diferentes tipos celulares (63). Os resultados dos estudos desses polimorfismos em diferentes populações têm sido bastante variáveis: enquanto alguns estudos mostraram associação de um ou mais desses polimorfismos com o gasto

energético, obesidade, níveis reduzidos de secreção de insulina pelas células-beta, resistência à insulina e/ou DM2, outros estudos não foram capazes de encontrar nenhuma associação desses polimorfismos com essas características [revisado em (18, 35, 37, 54-56, 64, 65)].

O polimorfismo no gene *UCP3* mais frequentemente associado à obesidade e/ou DM2 é o polimorfismo funcional -55C/T na região promotora desse gene (35, 37, 56, 64, 66-68); entretanto, os resultados são também contraditórios e a associação com estas características deve ser melhor estudada em diferentes populações. Neste contexto, uma metanálise recentemente publicada por nosso grupo demonstrou que o polimorfismo -55C/T está associado com o risco para DM2 em populações asiáticas (RC = 1,22; IC 95% 1,04 - 1,44, para o modelo de contraste de alelos), mas não em europeias (54).

Até o momento, poucos estudos avaliaram o efeito de polimorfismos no gene *FNDC5*, codificante do hormônio irisina, com o metabolismo glicêmico (69-71). Interessantemente, Staiger *et al.* (69) mostrou que dois polimorfismos no gene *FNDC5* estão associados com a sensibilidade à insulina. Outro estudo avaliou os polimorfismos rs3480 e rs16835198 no gene *FNDC5* em homens japoneses que foram divididos em dois grupos: os que praticavam exercícios com alto desempenho e os que praticavam exercícios com baixo desempenho (71). No grupo que apresentava um baixo desempenho nos exercícios, portadores do alelo mutado do polimorfismo rs3480 apresentaram níveis aumentados de insulina em jejum e do índice HOMA-IR e, da mesma forma, portadores do alelo mutado do polimorfismo rs16835198 apresentaram maiores níveis de HbA1c e glicose em jejum do que os portadores dos genótipos selvagens (71). Mais recentemente, um estudo realizado na população asiática mostrou que um polimorfismo no gene *FNDC5* apresenta uma interação com os níveis de insulina de jejum e IMC (70).

Em vista do exposto, defeitos nos genes *UCP1-3* ou proteínas relacionadas podem estar associados ao desenvolvimento da obesidade, DM2 ou características associadas. No entanto, novos estudos em diferentes populações são ainda necessários para esclarecer estas associações. Isto poderá contribuir para a elucidação das bases genéticas e moleculares da obesidade e do DM2, podendo levar à identificação de pacientes que apresentam maior predisposição ao desenvolvimento destas doenças, bem como contribuir na procura por novos alvos terapêuticos.

1.3. O papel da UCP2 na morte das células-beta pancreáticas

Estudos de expressão gênica revelaram que o gene *UCP2* pertence a um grupo de genes que são rapidamente induzidos em células sensíveis à apoptose (72). Além disso, o aumento da expressão de *UCP2* parece ter um efeito antiapoptótico em vários tipos celulares, uma vez que previne a produção elevada de EROs (73). Entretanto, estudos indicam que o papel da UCP2 pode ser tanto proapoptótico como antiapoptótico dependendo da regulação transcricional, tipo celular e diferentes estímulos bioquímicos (73). De fato, o papel da UCP2 na apoptose das células-beta pancreáticas ainda é controverso; enquanto alguns estudos indicam que a expressão aumentada de *UCP2* está associada à proteção contra o estresse oxidativo (74-77), outros estudos relataram justamente o contrário, isto é, que o bloqueio de *UCP2* teria um efeito anti-apoptótico (78, 79).

A reposição de células-beta pancreáticas é, até o momento, a maneira mais eficaz de restabelecer a homeostase glicêmica nos pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) com controle metabólico instável (80). Neste contexto, o transplante de ilhotas pancreáticas tem vantagem em relação ao do órgão inteiro por ser menos invasivo, uma

vez que a injeção das células é feita pela canulação percutânea da veia porta (80). Entretanto, um controle glicêmico adequado pós-transplante exige que um grande número de ilhotas seja transplantado e frequentemente são necessários transplantes de dois ou mais pâncreas para se atingir a independência à insulina (81). A escassez de órgãos para transplante acaba sendo um forte limitador desta terapêutica (82). Em razão disso, vêm-se estudando estratégias terapêuticas para atingir o máximo de aproveitamento de ilhotas por pâncreas doado, objetivando-se o alcance da independência à insulina com apenas um doador (81, 82).

A perda de ilhotas ao longo dos procedimentos de isolamento do pâncreas de doador em morte encefálica (ME) e enxerto no receptor são os principais motivos da baixa eficiência do processo como um todo (83). Entre os fatores responsáveis pela perda das ilhotas podemos destacar o intenso estresse inflamatório produzido pela ME do doador, a hipóxia das ilhotas isoladas e a injúria causada pela isquemia-reperfusão e pelo estresse oxidativo (83-85).

Interessantemente, um estudo prévio do nosso grupo mostrou que as expressões de *Ucp2* e *Sod2* (gene que codifica a superóxido dismutase 2, uma importante enzima antioxidante mitocondrial) estavam aumentadas no pâncreas de um modelo murino de ME quando comparadas às do pâncreas de ratos do grupo controle (86). Este foi o primeiro estudo a avaliar a expressão de *Ucp2* em um modelo de ME. Considerando-se que a inflamação local contribui para a morte das células-beta no DM1 (87) e que citocinas pró-inflamatórias engatilham a produção de EROs (88, 89), pode-se supor que o papel da UCP2 na diminuição do estresse oxidativo poderia contribuir para a melhora da função das células-beta sobre uma situação de inflamação aumentada, como a ME. Entretanto, tendo em mente que ainda não está claro se a UCP2 tem um efeito pró- ou

anti-apoptótico nas células-beta, torna-se necessário o esclarecimento do papel da UCP2 na morte dessas células submetidas a um ambiente inflamatório.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As UCP1, UCP2 e UCP3 apresentam papéis importantes na redução da formação de EROs pela mitocôndria, na regulação da secreção de insulina pelas células-beta pancreáticas e na regulação do metabolismo e transporte dos ácidos graxos livres, mecanismos associados à patogênese da obesidade e DM2. Sendo assim, polimorfismos nos genes *UCP1-3*, ou nos genes de suas proteínas regulatórias, podem estar associados ao desenvolvimento destas doenças. De fato, diversos estudos têm investigado as associações entre polimorfismos nos genes das UCPs com obesidade e DM2; entretanto, os resultados são ainda contraditórios e o impacto desses polimorfismos nestas doenças continua em debate. Além disso, a interação de polimorfismos nos genes *UCP1-3* com polimorfismos nos genes de suas proteínas regulatórias (como, por exemplo, nos genes *ADRB3* e *FNDC5*) pode influenciar as suas associações com a obesidade e o DM2.

Metanálise é um método poderoso para síntese estatística de dados de diferentes estudos porque ela pode superar o problema de tamanhos amostrais pequenos e poder estatístico insuficiente dos estudos de associação genéticos para doenças complexas (90). Em 2013, nosso grupo realizou uma metanálise para avaliar a associação entre polimorfismos nos genes *UCP1-3* e o risco para DM2, demonstrando a associação dos polimorfismos Ala55Val (*UCP2*) e -55C/T (*UCP3*) com risco para esta doença em asiáticos (54). Torna-se ainda necessária a realização de metanálises que avaliem se polimorfismos nos genes *UCP1-3* estão realmente associados com a obesidade.

Sabe-se que a UCP2 regula negativamente a secreção de insulina pelas células-beta pancreáticas ao mesmo tempo em que diminui a produção de EROs pela CRM, podendo ter tanto um papel deletério (em relação à secreção de insulina) ou protetor (diminuição de EROs) na função das células-beta. Em vista disso, a UCP2 parece ter um papel importante na regulação da apoptose nestas células; entretanto, se este papel é anti-apoptótico ou pró-apoptótico ainda precisa ser melhor definido. Recentemente, um estudo do nosso grupo demonstrou que a expressão de *Ucp2* estava aumentada no pâncreas de um modelo murino de morte encefálica (ME), possivelmente devido a um mecanismo compensatório devido ao aumento do estresse oxidativo associado à ME (86). Uma melhor definição do papel da UCP2 na viabilidade das células-beta submetidas à inflamação poderá permitir o planejamento futuro de novas estratégias para proteger as ilhotas isoladas de doadores de órgãos em ME, minimizando a perda das ilhotas durante o isolamento e, dessa forma, melhorando a quantidade e qualidade de ilhotas e, conseqüentemente, o sucesso do transplante de ilhotas pancreáticas.

Em vista do exposto, os principais objetivos do presente estudo são:

Objetivo geral:

- Avaliar o papel das proteínas desacopladoras (UCPs) e de proteínas associadas na suscetibilidade à obesidade e diabetes mellitus tipo 2.

Objetivos específicos:

- Realizar revisões sistemáticas seguidas de metanálises de todos os estudos disponíveis na literatura para avaliar se polimorfismos comuns nos genes *UCP1-3* estão associados à obesidade ou a variações no IMC.

- Avaliar se os polimorfismos -3826A/G no gene *UCP1* e Trp64Arg no gene *ADBR3*, sozinhos ou em combinação, estão associados ao DM2 ou características associadas como a obesidade.
- Avaliar se os polimorfismos rs1746661 e rs3480 no gene *FNDC5* (codificador da irisina) estão associados ao DM2 ou características associadas como a obesidade.
- Avaliar a expressão de *UCP2* no pâncreas de doadores de órgãos em morte encefálica em comparação ao de controles e, avaliar o efeito do bloqueio de *Ucp2* sobre a viabilidade de células-beta pancreáticas de ratos (linhagem INS-1E) após serem submetidas à incubação com citocinas pró-inflamatórias (TNF- α + INF- γ).

3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes care*. 1992;15(11):1509-16.
2. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:181643.
3. El-Sayed Moustafa JS, Froguel P. From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(7):402-13.
4. Mitchell NS, Catenacci VA, Wyatt HR, Hill JO. Obesity: overview of an epidemic. *Psychiatr Clin North Am*. 2011;34(4):717-32.
5. Drummond EM, Gibney ER. Epigenetic regulation in obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(4):392-7.
6. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20(6):501-6.
7. Silventoinen K, Hasselbalch AL, Lallukka T, Bogl L, Pietilainen KH, Heitmann BL, et al. Modification effects of physical activity and protein intake on heritability of body size and composition. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(4):1096-103.
8. Temelkova-Kurktschiev T, Stefanov T. Lifestyle and genetics in obesity and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012;120(1):1-6.
9. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S81-90.
10. Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003;4:257-91.
11. Vimalaswaran KS, Loos RJ. Progress in the genetics of common obesity and type 2 diabetes. *Expert reviews in molecular medicine*. 2010;12:e7.
12. Prasad RB, Groop L. Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes*. 2015;6(1):87-123.
13. Hara K, Shojima N, Hosoe J, Kadowaki T. Genetic architecture of type 2 diabetes. *Biochem and bioph res com*. 2014;452(2):213-20.
14. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA*. 2001;286(10):1195-200.
15. Owen KR, McCarthy MI. Genetics of type 2 diabetes. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(3):239-44.
16. Arner P. Genetic variance and lipolysis regulation: implications for obesity. *Ann Med*. 2001;33(8):542-6.
17. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(8):946-65.
18. Souza BM, Assmann TS, Kliemann LM, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role of uncoupling protein 2 (UCP2) on the development of type 2 diabetes mellitus and its chronic complications. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(4):239-48.

19. Brondani LA, Assmann TS, Duarte GC, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(4):215-25.
20. Azzu V, Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(5):298-307.
21. Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep.* 2005;6(10):917-21.
22. Jezek P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(10):1190-206.
23. Cui Y, Xu X, Bi H, Zhu Q, Wu J, Xia X, et al. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp eye res.* 2006;83(4):807-16.
24. Brondani LA, de Souza BM, Duarte GC, Kliemann LM, Esteves JF, Marcon AS, et al. The UCP1 -3826A/G polymorphism is associated with diabetic retinopathy and increased UCP1 and MnSOD2 gene expression in human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012.
25. Sale MM, Hsu FC, Palmer ND, Gordon CJ, Keene KL, Borgerink HM, et al. The uncoupling protein 1 gene, UCP1, is expressed in mammalian islet cells and associated with acute insulin response to glucose in African American families from the IRAS Family Study. *BMC Endocr Disord.* 2007;7:1.
26. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509-17.
27. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000;529 Pt 1:3-10.
28. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481(7382):463-8.
29. Novelle MG, Contreras C, Romero-Pico A, Lopez M, Dieguez C. Irisin, two years later. *International journal of endocrinology.* 2013;2013:746281.
30. Sanchis-Gomar F, Lippi G, Mayero S, Perez-Quilis C, García-Giménez JL. Irisin: a new potential hormonal target for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *J Diabetes.* 2012;4(3):196.
31. de la Iglesia R, Lopez-Legarrea P, Crujeiras AB, Pardo M, Casanueva FF, Zulet MA, et al. Plasma irisin depletion under energy restriction is associated with improvements in lipid profile in metabolic syndrome patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013.
32. Park KH, Zaichenko L, Brinkoetter M, Thakkar B, Sahin-Efe A, Joung KE, et al. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98(12):4899-907.
33. Hofmann T, Elbelt U, Stengel A. Irisin as a muscle-derived hormone stimulating thermogenesis--a critical update. *Peptides.* 2014;54:89-100.
34. de Souza BM, Assmann TS, Kliemann LM, Marcon AS, Gross JL, Canani LH, et al. The presence of the -866A/55Val/Ins haplotype in the uncoupling protein 2 (UCP2) gene is associated with decreased UCP2 gene expression in human retina. *Exp eye res.* 2012;94(1):49-55.
35. Liu J, Li J, Li WJ, Wang CM. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *Journal of diabetes research.* 2013;2013:585897.

36. Li Y, Maedler K, Shu L, Haataja L. UCP-2 and UCP-3 proteins are differentially regulated in pancreatic beta-cells. *PloS One*. 2008;3(1):e1397.
37. Jia JJ, Zhang X, Ge CR, Jois M. The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obes Rev*. 2009;10(5):519-26.
38. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(6):755-67.
39. Fisler JS, Warden CH. Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)*. 2006;3:38.
40. Affourtit C, Brand MD. On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1777(7-8):973-9.
41. Bezair V, Seifert EL, Harper ME. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB*. 2007;21(2):312-24.
42. Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC, Johns DC, Marbàn E, Wheeler MB. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes*. 1999;48(7):1482-6.
43. Joseph JW, Koshkin V, Zhang CY, Wang J, Lowell BB, Chan CB, et al. Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet. *Diabetes*. 2002;51(11):3211-9.
44. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*. 2001;105(6):745-55.
45. Robson-Doucette CA, Sultan S, Allister EM, Wikstrom JD, Koshkin V, Bhattacharjee A, et al. Beta-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion. *Diabetes*. 2011;60(11):2710-9.
46. Chan CB, Saleh MC, Koshkin V, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S136-42.
47. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007;56(7):1783-91.
48. Thompson MP, Kim D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. *FEBS letters*. 2004;568(1-3):4-9.
49. Schrauwen P, Mensink M, Schaart G, Moonen-Kornips E, Sels JP, Blaak EE, et al. Reduced skeletal muscle uncoupling protein-3 content in prediabetic subjects and type 2 diabetic patients: restoration by rosiglitazone treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1520-5.
50. Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK, Liu ZX, Kim S, Collier EF, et al. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1995-2003.
51. Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology*. 2015;6:36.
52. Ramsden DB, Ho PW, Ho JW, Liu HF, So DH, Tse HM, et al. Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain and behavior*. 2012;2(4):468-78.
53. Jia JJ, Tian YB, Cao ZH, Tao LL, Zhang X, Gao SZ, et al. The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Mol Biol Rep*. 2010;37(3):1513-22.

54. de Souza BM, Brondani LA, Bouças AP, Sortica DA, Kramer CK, Canani LH, et al. Associations between UCP1 -3826A/G, UCP2 -866G/A, Ala55Val and Ins/Del, and UCP3 -55C/T polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: case-control study and meta-analysis. *PloS One*. 2013;8(1):e54259.
55. Liu L, Zhao X, Kang S, Zhang D. An association between -866G/A polymorphism in the promoter of UCP2 and obesity: a meta-analysis. *Gene*. 2013;514(1):41-7.
56. Qian L, Xu K, Xu X, Gu R, Liu X, Shan S, et al. UCP2 -866G/A, Ala55Val and UCP3 -55C/T Polymorphisms in Association with Obesity Susceptibility - A Meta-Analysis Study. *PloS One*. 2013;8(4):e58939.
57. Esterbauer H, Oberkofler H, Liu YM, Breban D, Hell E, Krempler F, et al. Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res*. 1998;39(4):834-44.
58. Sivenius K, Valve R, Lindi V, Niskanen L, Laakso M, Uusitupa M. Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and beta3-adrenergic receptor genes on long-term body weight change in Finnish type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(4):514-9.
59. Clément K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, et al. Additive effect of A-->G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20(12):1062-6.
60. Hayakawa T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Takamura T, Abe T, et al. Phenotypic characterization of the beta3-adrenergic receptor mutation and the uncoupling protein 1 polymorphism in Japanese men. *Metabolism*. 1999;48(5):636-40.
61. Urhammer SA, Dalgaard LT, Sørensen TI, Møller AM, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, et al. Mutational analysis of the coding region of the uncoupling protein 2 gene in obese NIDDM patients: impact of a common amino acid polymorphism on juvenile and maturity onset forms of obesity and insulin resistance. *Diabetologia*. 1997;40(10):1227-30.
62. Cassell PG, Neverova M, Janmohamed S, Uwakwe N, Qureshi A, McCarthy MI, et al. An uncoupling protein 2 gene variant is associated with a raised body mass index but not Type II diabetes. *Diabetologia*. 1999;42(6):688-92.
63. Sasahara M, Nishi M, Kawashima H, Ueda K, Sakagashira S, Furuta H, et al. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in beta-cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2004;53(2):482-5.
64. Xu K, Zhang M, Cui D, Fu Y, Qian L, Gu R, et al. UCP2 -866G/A and Ala55Val, and UCP3 -55C/T polymorphisms in association with type 2 diabetes susceptibility: a meta-analysis study. *Diabetologia*. 2011;54(9):2315-24.
65. Qin LJ, Wen J, Qu YL, Huang QY. Lack of association of functional UCP2 -866G/A and Ala55Val polymorphisms and type 2 diabetes in the Chinese population based on a case-control study and a meta-analysis. *GMR*. 2013;12(3):3324-34.
66. Alonso A, Martí A, Corbalán MS, Martínez-González MA, Forga L, Martínez JA. Association of UCP3 gene -55C>T polymorphism and obesity in a Spanish population. *Ann Nutr Metab*. 2005;49(3):183-8.
67. Pinelli M, Giacchetti M, Acquaviva F, Cocozza S, Donnarumma G, Lapice E, et al. Beta2-adrenergic receptor and UCP3 variants modulate the relationship between age and type 2 diabetes mellitus. *BMC Med Genet*. 2006;7:85.

68. de Luis DA, Aller R, Izaola O, González Sagrado M, Conde R, Pérez Castrillón JL. Lack of association of -55CT polymorphism of UCP3 gene with fat distribution in obese patients. *Ann Nutr Metab.* 2007;51(4):374-8.
69. Staiger H, Böhm A, Scheler M, Berti L, Machann J, Schick F, et al. Common genetic variation in the human FNDC5 locus, encoding the novel muscle-derived 'browning' factor irisin, determines insulin sensitivity. *PloS One.* 2013;8(4):e61903.
70. Tang S, Zhang R, Jiang F, Wang J, Chen M, Peng D, et al. An interaction between a FNDC5 variant and obesity modulates glucose metabolism in a Chinese Han population. *PLoS One.* 2014;9(11):e109957.
71. Tanisawa K, Taniguchi H, Sun X, Ito T, Cao ZB, Sakamoto S, et al. Common single nucleotide polymorphisms in the FNDC5 gene are associated with glucose metabolism but do not affect serum irisin levels in Japanese men with low fitness levels. *Metabolism.* 2014.
72. Voehringer DW, Hirschberg DL, Xiao J, Lu Q, Roederer M, Lock CB, et al. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2680-5.
73. Ježek P, Olejár T, Smolková K, Ježek J, Dlasková A, Plecítá-Hlavatá L, et al. Antioxidant and regulatory role of mitochondrial uncoupling protein UCP2 in pancreatic beta-cells. *Physiol Res.* 2014;63 Suppl 1:S73-91.
74. Affourtit C, Jastroch M, Brand MD. Uncoupling protein-2 attenuates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E insulinoma cells by lowering mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(5):609-16.
75. Pi J, Bai Y, Daniel KW, Liu D, Lyght O, Edelstein D, et al. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function. *Endocrinology.* 2009;150(7):3040-8.
76. Produit-Zengaffinen N, Davis-Lameloise N, Perreten H, Bécard D, Gjinovci A, Keller PA, et al. Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia.* 2007;50(1):84-93.
77. Lee SC, Robson-Doucette CA, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin. *J Endocrinol.* 2009;203(1):33-43.
78. Niño Fong R, Fatehi-Hassanabad Z, Lee SC, Lu H, Wheeler MB, Chan CB. Uncoupling protein-2 increases nitric oxide production and TNFAIP3 pathway activation in pancreatic islets. *J Mol Endocrinol.* 2011;46(3):193-204.
79. Zhang D, Shen M, Mikita A, Zhang W, Liu Y, Liu Q, et al. Targeting uncoupling protein-2 improves islet graft function. *Cell Transplant.* 2011;20(3):421-9.
80. Rheinheimer J, Bauer AC, Silveiro SP, Estivalet AA, Boucas AP, Rosa AR, et al. Human pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. *Archives of endocrinology and metabolism.* 2015;59(2):161-70.
81. Kim SC, Han DJ, Kang CH, We YM, Back JH, Kim YH, et al. Analysis on donor and isolation-related factors of successful isolation of human islet of Langerhans from human cadaveric donors. *Transplant Proc.* 2005;37(8):3402-3.
82. Sakuma Y, Ricordi C, Miki A, Yamamoto T, Pileggi A, Khan A, et al. Factors that affect human islet isolation. *Transplant Proc.* 2008;40(2):343-5.
83. Bugge JF. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(10):1239-50.

84. Weiss S, Kotsch K, Francuski M, Reutzel-Selke A, Mantouvalou L, Klemz R, et al. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *American journal of transplantation*. 2007;7(6):1584-93.
85. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(11):2474-81.
86. Carlessi R, Lemos NE, Dias AL, Oliveira FS, Brondani LA, Canani LH, et al. Exendin-4 protects rat islets against loss of viability and function induced by brain death. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;412:239-50.
87. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115-33.
88. Tabatabaie T, Vasquez-Weldon A, Moore DR, Kotake Y. Free radicals and the pathogenesis of type 1 diabetes: beta-cell cytokine-mediated free radical generation via cyclooxygenase-2. *Diabetes*. 2003;52(8):1994-9.
89. Li N, Brun T, Cnop M, Cunha DA, Eizirik DL, Maechler P. Transient oxidative stress damages mitochondrial machinery inducing persistent beta-cell dysfunction. *J Biol Chem*. 2009;284(35):23602-12.
90. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA*. 2000;283(15):2008-12.

Parte I

**Association of the UCP polymorphisms with susceptibility to obesity:
case-control study and meta-analysis**

Brondani LA et al. Mol Biol Rep. 2014 Aug;41(8):5053-67

Parte II

Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (*UCP*) 1-3 genes with body mass index variability

Brondani LA et al. PLoS One. 2014 May 7;9(5):e96411

Parte III

The presence of at least three alleles of the *ADRB3* Trp64Arg (C/T) and *UCP1* -3826A/G polymorphisms is associated with protection to overweight/obesity and with higher high-density lipoprotein cholesterol levels in Caucasian-Brazilian patients with type 2 diabetes

Brondani LA et al. Metab Syndr Relat Disord. 2014 Feb;12(1):16-24

Parte IV

Irisin-encoding gene (*FNDC5*) variant is associated with changes in blood pressure and lipid profile in type 2 diabetic women but not in men

Brondani LA et al. Metabolism. 2015 Sep;64(9):952-7

Parte V

There is an increased expression of UCP2 in pancreas from brain-dead donors and UCP2 increases cytokine-induced beta-cell apoptosis

4. CONCLUSÕES

Os nossos resultados mostram que polimorfismos nos genes *UCP1*, *UCP2* e *UCP3* não estão associados à obesidade em pacientes com DM2, brancos, do sul do Brasil. Por outro lado, quando incluímos o nosso estudo de caso-controle em uma revisão sistemática e metanálise dos estudos disponíveis na literatura que avaliaram o risco para obesidade bem como variações no IMC de acordo com a presença dos polimorfismos, observamos os seguintes resultados: os polimorfismos -866G/A (*UCP2*) e -55C/T (*UCP3*) estão associados com proteção para obesidade em Europeus e os polimorfismos Ala55Val e Ins/Del (*UCP2*) foram associados com risco para obesidade em Asiáticos e Europeus, respectivamente. Consistente com esses resultados, uma diminuição na média do IMC foi observada para o polimorfismo -866G/A (*UCP2*) em Europeus. Além disso, os polimorfismos Ins/Del (*UCP2*) e -55C/T (*UCP3*) estão associados a um aumento do IMC em Asiáticos e o polimorfismo Ala55Val (*UCP2*) está associado a um aumento do IMC em Europeus.

Além disso, os polimorfismos -3826A/G (*UCP1*) e Trp64Arg (*β3AR*) não estão associados ao DM2; entretanto, em pacientes com DM2, o alelo 64Arg foi associado com proteção para sobrepeso e obesidade. Interessantemente, a prevalência de sobrepeso/obesidade foi ainda menor em carreadores de pelo menos 3 alelos raros dos polimorfismos -3826A/G (*UCP1*) e Trp64Arg (*β3AR*) quando comparados a carreadores de menos que 3 alelos raros, indicando que esses dois polimorfismos parecem ter um efeito combinado na modulação de sobrepeso e obesidade em pacientes brancos com DM2.

Em relação aos polimorfismos rs1746661 e rs3480 no gene *FNDC5* (codificador da irisina), os nossos resultados não mostraram uma associação com o DM2 na nossa

população; no entanto, o polimorfismo rs3480 está associado com o aumento dos níveis de HbA1c e o alelo T do polimorfismo rs1746661 está associado com um aumento na pressão sistólica e dislipidemia em mulheres com DM2.

Portanto, as associações de polimorfismos nos genes *UCPs* e nos genes das suas proteínas associadas, como o β 3-AR e a irisina, com a obesidade é variável conforme a etnia e o gênero dos pacientes. Dessa forma, análises adicionais com grandes estudos que permitam estratificação por etnia, gênero e análise de interação gene-gene e gene-ambiente devem ser realizadas para elucidar o papel dos polimorfismos nos genes *UCPs* na obesidade e variações do IMC.

Tendo em consideração o papel da UCP2 na apoptose das células-beta, nós observamos que a UCP2 é induzida em condições inflamatórias. Pâncreas de doadores em ME tiveram um aumento da expressão de *UCP2* comparado aos controles. Também se observou que o bloqueio de *Ucp2* previne parcialmente a apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias nas células INS-1E. Portanto, novas estratégias para bloquear a UCP2 no pâncreas humano podem ser uma alternativa para melhorar o rendimento de ilhotas pancreáticas isoladas para transplante, através da prevenção do estresse inflamatório causado pela ME.

5. COLABORAÇÃO EM OUTROS TRABALHOS DURANTE O ANDAMENTO DO DOUTORADO

Além dos artigos que fazem parte da presente tese, ao longo do período do doutorado foram desenvolvidos, em colaboração, os seguintes manuscritos:

- Toll-like receptor 3 (TLR3) and the development of type 1 diabetes mellitus. Assmann TS, **Brondani LA**, Bouças AP, Canani LH, Crispim D. Archives of Endocrinology and Metabolism, v. 59, p. 4-12, 2015.

- Human Pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. Rheinheimer J, Bauer AC, Silveiro S, Estivalet AAF, Bouças AP, Rosa A, Souza BM, Oliveira FS, Cruz L, **Brondani LA**, Azevedo MJ, Lemos NE, Carlessi RM, Assmann TS, Gross JL, Leitão C, Crispim D. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (Impresso), v. 59, p. 161-170, 2015.

- Exendin-4 protects rat islets against loss of viability and function induced by brain death. Carlessi R, Lemos NE, Dias AL, Oliveira FS, **Brondani LA**, Canani LH, Bauer AC, Leitão CB, Crispim D. Molecular and Cellular Endocrinology (Print), v. 412, p. 239-250, 2015.

- Association between rs7903146 and rs12255372 polymorphisms of transcription factor 7-like 2 gene and polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. Ramos RB, Fabris VC, **Brondani LA**, Spritzer PM. Endocrine (Basingstoke), v. 49, p. 635-642, 2015.

- Polymorphisms in the TLR3 gene are associated with risk for type 1 diabetes mellitus. Assmann TS, **Brondani LA**, Bauer AC, Canani LH, Crispim D. European Journal of Endocrinology, v. 170, p. 519-527, 2014.

- Association between Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms in Toll-Like Receptor 4 Gene and Type 2 Diabetes Mellitus: Case-Control Study and Meta-Analysis. Assmann TS, Lemos NE, **Brondani LA**, Carlessi RM, Bernal CM, Cruz M, Canani LH, Crispim D. Journal of Diabetes & Metabolism, v. 5, p. 1-10, 2014.

- Associations between *UCP1* -3826A/G, *UCP2* -866G/A, Ala55Val and Ins/Del, and *UCP3* -55C/T Polymorphisms and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: Case-Control Study and Meta-Analysis. De Souza BM, **Brondani LA**, Bouças AP, Sortica DA, Kramer CK, Canani LH, Leitão CB, Crispim D. Plos One, v. 8, p. e54259, 2013.

- The A Allele of the rs1990760 Polymorphism in the *IFIH1* Gene Is Associated with Protection for Arterial Hypertension in Type 1 Diabetic Patients and with Expression of This Gene in Human Mononuclear Cells. Bouças AP, **Brondani LA**, Souza BM, Oliveira FS, Lemos NE, Canani LH, Crispim DM. Plos One, v. 8, p. e83451, 2013.