

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**INVESTIGAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO  
CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR EM ESTUDOS DE  
ASSOCIAÇÃO COM FENÓTIPOS RELACIONADOS  
À OBESIDADE HUMANA**

**Janaína Pacheco Jaeger**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

**Orientadora: Profa. Dra. Mara Helena Hutz**

Porto Alegre, março de 2009

*"A ciência não pode resolver o mistério definitivo da natureza, porque, em última análise, nós mesmos somos parte do mistério que estamos tentando resolver"*

Max Planck (1858-1947)

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

---

As pesquisas realizadas nos laboratórios de DNA e de Eletroforese do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram subvencionadas pelas agências Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Instituto do Milênio e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq.

## **Agradecimentos**

---

Considero que a elaboração de uma Tese de doutorado é um produto coletivo, embora sua redação, responsabilidade e estresse sejam predominantemente individuais. Várias pessoas contribuíram para que esse trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

À minha orientadora Dra. Mara H. Hutz, pela sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir e conduzir as idéias apresentadas, facilitando o alcance dos objetivos desse trabalho. Agradeço pela confiança e pela minha formação como pesquisadora, desde o mestrado até esses 3 anos e 4 meses de doutorado. Meus irrestritos agradecimentos!

À Dra. Vanessa Mattevi por ter me “emprestado” um projeto inicialmente criado e executado por ela. Por ter me auxiliado durante os primeiros contatos laboratoriais e por toda a ajuda na revisão dos artigos que compõem essa Tese.

À Dra. Sídia Maria Callegari-Jacques pelos “helps” estatísticos e por ter me ensinado tudo o que eu sei sobre análises de dados. Pelo bom humor de sempre, pelas tardes de cálculos na sala e por ter sido uma das melhores professoras que já tive.

Às minhas colegas do laboratório 114 e 116 do departamento de genética da UFRGS, pelas risadas, congressos, mas também pela companhia durante o trabalho e intervalos entre os intermináveis PCRs. Agradeço em especial à Ana Paula, à Tati G. e à Vê Zembrzuski, pela amizade e companheirismo ao longo de todos esses anos.

Ao Elmo e à Ellen, pela dedicação e por estarem sempre disponíveis em ajudar. Não consigo imaginar como seria nosso departamento sem vocês.

A todos os meus amigos de dentro e fora da UFRGS, pela ajuda, festas, conversas, por ouvirem minhas queixas e participarem das minhas conquistas, sempre torcendo muito por mim.

Às minhas manas Kitty e Fran pela amizade e amor que vão muito além dos laços de sangue, por me deixarem o computador sempre disponível quando precisei e por aturarem meu mau humor diversas vezes, mesmo quando não houvesse motivos para tê-lo.

Por último e mais importante agradeço aos meus pais, Marlene e José Ignácio, de quem herdei a sede por conhecimento e a coragem de ir atrás do que eu queria, mesmo que eu tivesse que atravessar um oceano sozinha para isso. Obrigada pelo amor e por me ensinarem mais do que eu jamais pude aprender. Dedico essa Tese a vocês!

## Sumário

---

<b>Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades</b>	07
<b>Resumo</b>	08
<b>Abstract</b>	10
<b>I. Introdução</b>	12
I.1. Obesidade: definição e caracterização	13
I.2. O Componente Genético da Obesidade Humana	18
I.3. Controle da Ingestão Alimentar	24
I.3.1. Neurônios Hipotalâmicos	25
I.3.2. Sistema Mesolímbico de Recompensa	34
I.3.2.1. Sistema Endocanabinoide	37
I.3.2.2. Sistema Dopaminérgico	41
I.4. Genes Candidatos	44
I.5. Justificativa e Objetivos	53
<b>II. Cannabinoid type-1 receptor gene polymorphisms are associated with central obesity in a Southern Brazilian population</b>	56
<b>III. Association studies of AgRP, CART, MC4R and POMC gene polymorphisms with obesity in a Brazilian population of European descent</b>	65
<b>IV. The reward system and obesity: the D2 receptor is associated with central obesity in an age-dependent way</b>	87
<b>V. Discussão</b>	115
V.1. Perspectivas Futuras	121
<b>VI. Referências Bibliográficas</b>	124
<b>VII. Anexos</b>	141

## **Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades**

---

- AgRP** – proteína relacionada a agouti
- CART** – transcrito regulado por cocaína e anfetamina
- COMT** – catecol-O-metil transferase
- CRH** – hormônio liberador de corticotrofina
- DRD2** – receptor de dopamina D2
- IMC** – índice de massa corporal
- INSR** – receptor de insulina
- LEPR** – receptor de leptina
- MAOA** – monoamina oxidase A
- MC4R** – receptor melanocortina 4
- α-MSH** – alfa-hormônio estimulador de melanócitos
- NPY** – neuropeptídeo Y
- POMC** – pro-opiomelanocortina
- SNC** – sistema nervoso central
- TRH** – hormônio liberador de tirotrófina
- VTA** – área tegumentar ventral
- WC** – “waist circumference” (circunferência da cintura)
- WHR** – “waist-to-hip ratio” (razão cintura-quadril)

## **Resumo**

---

O aumento da prevalência de obesidade em várias regiões do planeta vem se revelando como um dos mais importantes fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade. Fatores como a mudança do hábito alimentar e o estilo de vida sedentário, aliados a determinantes genéticos ainda pouco conhecidos, desempenham um papel relevante na patogênese desta doença. Nos últimos dez anos, desde o descobrimento do hormônio leptina, avanços consideráveis foram obtidos na caracterização dos mecanismos hipotalâmicos do controle da ingestão alimentar. Tais avanços têm revelado as particularidades de um sistema complexo e integrado, e têm oferecido novas perspectivas para abordagens terapêuticas específicas. Apesar da contribuição de fatores genéticos no desenvolvimento do ganho de peso ser amplamente reconhecida, a real contribuição quantitativa dos mesmos em fenótipos relacionados é ainda uma questão complexa que precisa ser esclarecida.

Na presente Tese, foram avaliados onze polimorfismos em oito genes candidatos e suas possíveis influências sobre parâmetros de massa e de distribuição da gordura corporal em uma amostra da população da região metropolitana de Porto Alegre de ancestralidade predominantemente européia. Foram analisados polimorfismos localizados nos seguintes genes candidatos à obesidade: Proteína relacionada a agouti (AgRP), Transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), Receptor canabinoide 1 (CNR1), Catecol-O-metil transferase (COMT), Receptor de dopamina D2 (DRD2), Monoamina oxidase A (MAOA), Receptor melanocortina 4 (MC4R) e Pro-opiomelanocortina (POMC). Os genótipos para cada polimorfismo foram determinados através da amplificação do DNA de cada indivíduo



pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior clivagem com endonucleases de restrição específicas quando necessário. Os genótipos foram determinados após separação eletroforética em géis de agarose ou poliacrilamida.

Dentre os indivíduos da amostra, a maioria deles (42,6%) apresentou peso normal ( $IMC < 25 \text{Kg/m}^2$ ), enquanto que 36,9% foram classificados como sobrepeso e 20,5% como obesos ( $IMC \geq 30 \text{Kg/m}^2$ ). Os parâmetros corporais de gordura analisados foram influenciados pelas variantes dos genes CART, CNR1, COMT e DRD2. O polimorfismo CART -156A/G foi associado ao aumento da obesidade abdominal determinada através da razão cintura-quadril (WHR); interação com fumo anterior a correção de Bonferroni foi também observada. Da mesma forma, o polimorfismo CNR1 4895A/G e o haplótipo contendo os três alelos selvagens dos polimorfismos analisados nesse gene mostraram-se associados à presença de obesidade abdominal. Entretanto, tal efeito haplotípico não se sustentou após a correção de Bonferroni. O polimorfismo COMT 158G/A foi associado ao aumento do índice de massa corporal (IMC), embora tal associação também não tenha permanecido após correções para múltiplos testes. Já a variante DRD2 -141C *Ins/Del* mostrou-se associada à obesidade abdominal de um modo idade-dependente. Não foram observadas associações significantes para as demais variantes analisadas (AgRP 199G/A, CNR1 1359G/A, CNR1 3813A/G, DRD2 TaqIA, MAOA u-VNTR 30pb, MC4R -2745C/T e POMC 8246C/T).

Os dados aqui apresentados reforçam as evidências de que os estudos de associação representam uma ferramenta poderosa na identificação de variantes genéticas que influenciam a susceptibilidade às doenças complexas, principalmente quando essas influências são analisadas dentro de seu contexto biológico e ambiental.

## **Abstract**

---

The worldwide increase in the prevalence of obesity is becoming one of the most important clinical-epidemiological phenomena at present day. Environmental factors such as changes in lifestyle and feeding behavior associated with poorly characterized genetic determinants are thought to play the most important roles in the pathogenesis of this disease. During the last ten years, since the discovery of leptin, great advances were obtained in the characterization of the hypothalamic mechanisms involved in food intake control. Such advances are unveiling a complex and integrated system and are opening a wide perspective for the finding of novel therapeutic targets for the treatment of this harming condition. Despite the contribution of genetic factors to the development of weight gain being widely recognized, the real quantitative contribution of them is a complex question yet to be answered.

In the present study, we evaluated the influence of eleven variants at eight candidate genes on mass parameters and body fat distribution in an European derived sample from Porto Alegre metropolitan region. Polymorphisms were investigated in the following candidate genes related to obesity: Agouti-related protein (AgRP), Cocaine and Amphetamine-regulated transcript (CART), Cannabinoid receptor 1 (CNR1), Catechol-O-methyltransferase (COMT), Dopamine receptor D2 (DRD2), Monoamine oxidase A (MAOA), Melanocortin receptor 4 (MC4R) and Proopiomelanocortin (POMC). Genotypes for each variant were determined by the polymerase chain reaction (PCR) coupled with

endonuclease restriction digestion when necessary. The genotypes were identified after electrophoresis in agarose or polyacrylamide gels.

Most individuals in our sample (42.6%) had a normal weight ( $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), while 36.9% could be classified as overweight and 20.5% were obese ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ). The body fat parameters investigated were influenced by CART, CNR1, COMT and DRD2 gene variants. The CART -156A/G was associated with increased abdominal obesity determined through waist-to-hip ratio (WHR), as well as it showed an interaction with smoking habits only before Bonferroni correction for multiple tests. Similarly, the CNR1 4895A/G polymorphism was associated with the presence of central obesity. The haplotype derived from the three wild variants studied in this gene was associated with abdominal obesity, although this effect disappeared after Bonferroni correction. The COMT 158G/A was significantly associated with increased body mass index (BMI), but not after Bonferroni adjustments. Finally, the DRD2 -141C *Ins/Del* showed to exert an influence on central obesity in an age-dependent way. No significant associations were observed for the remaining variants (AgRP 199G/A, CNR1 1359G/A, CNR1 3813A/G, DRD2 TaqIA, MAOA u-VNTR 30pb, MC4R -2745C/T and POMC 8246C/T).

The data revealed here reinforce evidence that association studies are a powerful tool to identify genetic variants for susceptibility to complex diseases, mainly when they are analyzed in a biological-environmental context.

Capítulo I

## **INTRODUÇÃO**

---

## **I.1. Obesidade: definição e caracterização**

A obesidade é o resultado de uma disfunção crônica do balanço energético. Quando a energia ingerida é maior do que a energia despendida, ocorre uma expansão dos adipócitos e, em alguns casos, o aumento do número dessas células. Como resultado, tem-se um balanço energético positivo associado ao ganho de peso. Podemos assim definir que a obesidade é um acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo. Entretanto, tal doença pode acarretar profundas conseqüências durante a vida de seus portadores, que variam desde sintomas psicológicos superficiais, até sérias comorbidades, podendo diminuir tanto a qualidade quanto o tempo de vida desses indivíduos. De fato, o aumento dos adipócitos pode induzir outros distúrbios metabólicos e levar, conseqüentemente, a doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, complicações respiratórias, câncer (de mama e próstata, por exemplo), entre outras (World Health Organization, 2000).

Durante muito tempo, a medicina procurou um padrão de cálculo que pudesse ser utilizado em todo o mundo e que permitisse identificar clinicamente, da melhor forma possível, o ponto a partir do qual uma pessoa pudesse ser considerada como portadora de sobrepeso e/ou obesa. Existe uma série de medidas de peso, porém o Índice de Massa Corpórea (IMC), por sua praticidade, é hoje aceito como padrão de medida internacional. Esse índice, que é calculado pela razão peso em kg/(altura em m)<sup>2</sup>, baseia-se na premissa de que a maior parte da variação no peso para pessoas da mesma altura é devida a massa de gordura corporal desses indivíduos. A Organização Mundial da Saúde, baseada em estudos demonstrando o aumento nos riscos à saúde associado com o ganho de peso, definiu que

um IMC igual ou superior a  $25 \text{ kg/m}^2$  é classificado como sobrepeso e que um IMC igual ou superior a  $30 \text{ kg/m}^2$  é classificado como obesidade. Um IMC igual ou superior a  $40 \text{ kg/m}^2$  é diagnosticado como obesidade mórbida. Embora a quantificação da gordura corporal seja importante, também é extremamente relevante saber onde a mesma está localizada. A gordura depositada na região abdominal acarreta mais riscos à saúde do que se ela estiver concentrada em outra parte do corpo, por exemplo. Medidas que são comumente usadas na prática médica para avaliar obesidade abdominal são a circunferência da cintura (WC) e a razão cintura-quadril (WHR). Ambas as medidas estão associadas a doenças cardiovasculares. Entretanto, existem evidências de que a razão cintura-quadril seja mais eficiente, uma vez que leva em consideração a circunferência do quadril, o qual está inversamente associado com disfunções metabólicas e hipertensão (de Koning e cols., 2007). A obesidade abdominal é identificada clinicamente em mulheres que apresentam  $\text{WC} \geq 88\text{cm}$  e/ou  $\text{WHR} \geq 0,80$  e em homens com  $\text{WC} \geq 102\text{cm}$  e/ou  $\text{WHR} \geq 0,95$  (Han e cols., 1998a). A Tabela 1 e a Tabela 2 indicam os riscos de ocorrência de comorbidades associados com o IMC e medidas de obesidade abdominal (WC e WHR), respectivamente, em adultos (World Health Organization, 2000). Muitos especialistas utilizam, conjuntamente, os métodos IMC e razão cintura-quadril para avaliar com mais segurança o risco de saúde do paciente. Além disso, a avaliação desses parâmetros é fundamental para que se possam realizar comparações dentro e entre populações, identificar pessoas ou grupos de indivíduos que apresentem risco aumentando de morbidade ou mortalidade e, a partir disso, priorizar intervenções tanto individuais quanto em diferentes comunidades.

**Tabela 1:** Classificação de adultos de acordo com o índice de massa corporal (IMC) e risco de comorbidades associadas à obesidade

<b>Classificação</b>	<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Risco de comorbidades</b>
Baixo peso	< 18,5	Baixo*
Normal	18,5-24,9	Média populacional
Sobrepeso	25-29,9	Levemente aumentado
Obeso classe I	30-34,9	Moderado
Obeso classe II	35-39,9	Severo
Obeso mórbido	≥40	Extremamente severo

\*Entretanto esses indivíduos apresentam outros problemas clínicos associados (adaptado de World Health Organization, 2000)

**Tabela 2:** Circunferência da cintura (WC)<sup>a</sup> e razão cintura-quadril (WHR)<sup>b</sup> sexo-específicas e riscos de complicações metabólicas associadas à obesidade central

<b>Riscos de complicações metabólicas</b>	<b>Homem</b>	<b>Mulher</b>
WC (cm) <sup>a</sup>		
Normal	<94	<80
Aumentado	≥94<102	≥80<88
Substancialmente aumentado	≥102	≥88
WHR (cm) <sup>b</sup>		
Normal	<0,95	<0,80
Substancialmente aumentado	≥0,95	≥0,80

(adaptado de World Health Organization, 2000)

O mundo vive hoje o que podemos chamar de epidemia da obesidade, uma vez que a prevalência dessa doença tem crescido em proporções alarmantes durante os últimos anos, contabilizando mais de 75% desde 1980. Tal fato levou a Organização Mundial da Saúde a classificá-la como uma epidemia global (World Health Organization, 1998).

Atualmente, se reconhece que a obesidade é uma doença crônica, tanto pelo sofrimento pessoal que causa nos indivíduos afetados, como pelo custo que traz aos sistemas de saúde pública e às sociedades (Ravussin e Bouchard, 2000). Não somente países desenvolvidos, mas também países em desenvolvimento estão sendo afetados. Além disso, por estar aumentando rapidamente entre crianças, as conseqüências dessa doença poderão ser observadas mais claramente em um futuro bem próximo. No mundo, mais de um bilhão de adultos apresentam sobrepeso ou são obesos, uma vez que a urbanização, as rápidas mudanças tecnológicas e a disponibilidade de alimentos palatáveis têm alterado o modo de vida das pessoas. Dessa forma, a maior causa dessa recente epidemia parece ser a mudança ambiental, que promove uma excessiva ingestão calórica e baixa atividade física, condições que são pobremente compensadas por características do nosso genoma (Loos e Bouchard, 2003). Apesar dos poucos dados epidemiológicos disponíveis, estudos referentes à região das Américas indicam que essa prevalência aumentou tanto em homens quanto em mulheres (Tabela 3). Ainda, em países desenvolvidos e no Brasil foi observado que esse aumento ocorreu, principalmente, entre famílias carentes (Monteiro e cols., 1995; Swinburn e Egger, 2002). Um baixo salário diminui a possibilidade de uma alimentação saudável, o que leva a bairros com baixo status socioeconômico tenderem a ser mais obesogênicos do que aqueles com alto status (Reidpath e cols., 2002). Uma baixa renda familiar está também associada com elevados níveis de estresse crônico, os quais podem acarretar na busca do conforto através da alimentação, consumo excessivo de álcool e, inclusive, na ativação crônica do eixo adrenal pituitário hipotalâmico (Bjorntorp e Rosmond, 2000), resultando, assim, no desenvolvimento da obesidade.



**Tabela 3:** Prevalência da obesidade ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) em países da região das Américas

País	Ano	Idade (anos)	Prevalência da obesidade (%)		Referências
			Homens	Mulheres	
Brasil	1975	25-64	3,1	8,2	Monteiro e cols., 1995
	1989	25-64	5,9	13,3	Monteiro e cols., 1995
Canadá	1978	20-70	6,8	9,6	Health Welfare Canada, 1981
	1981	20-70	8,5	9,3	Fitness Canada, 1986
	1988	20-70	9,0	9,2	Stephens e Craig, 1990
Estados Unidos	1960-1962	20-74	10,4	15,1	Flegal e cols., 1998
	1971-1974	20-74	11,8	16,1	Flegal e cols., 1998
	1976-1980	20-74	12,3	16,5	Flegal e cols., 1998
	1986-1990	18-74	15	15	Reeder e cols., 1992
	1988-1994	20-74	19,9	24,9	Flegal e cols., 1998

(adaptado de World Health Organization, 2000)

São muitos os fatores que atuam contra o aumento do ganho de peso, sendo, provavelmente, o maior deles a discriminação social pelos quais passam indivíduos com sobrepeso ou obesos nas sociedades ocidentais (Puhl e Brownell, 2001). A obesidade leva à redução de oportunidades de trabalho, educação, relacionamentos e inclusão social (Stunkard, 1996) e isso parece ser mais potente em mulheres do que em homens. Outro fator que desfavorece o aumento de peso é o desconforto físico associado com a doença, o qual reduz substancialmente a qualidade de vida dessas pessoas (Han e cols., 1998b). Para alguns indivíduos obesos, a insatisfação com o corpo, o desconforto físico e a estigmatização social relacionadas à gula e à preguiça podem desencadear ou aumentar eventos de depressão, ansiedade, sentimentos de baixa auto-estima e culpa. Algumas das conseqüências desses problemas psicológicos podem favorecer a ingestão energética (como

recorrência a alimentos ou bebidas alcoólicas) ou reduzir a atividade física (através da letargia ou falta de motivação) (Wardle, 1999). Além disso, alguns medicamentos utilizados para amenizar tais transtornos psicológicos (como drogas psicotrópicas) podem favorecer o aumento do peso corporal (Swinburn e Egger, 2004).

Atualmente, diversas sociedades constantemente discriminam a pessoa obesa como se ela fosse a única responsável por seu estado. Entretanto, isso não condiz com a realidade, uma vez que o obeso nada mais é do que o resultado de uma série de fatores orgânicos, ambientais e psicossociais, que têm implicações fortes para o desenvolvimento dessa doença caracterizada pelo excesso de gordura corporal. Portanto, não podemos considerar um ou outro fator isoladamente, já que o ideal é uma integração de todos os mecanismos que podem estar contribuindo para a etiologia da obesidade humana.

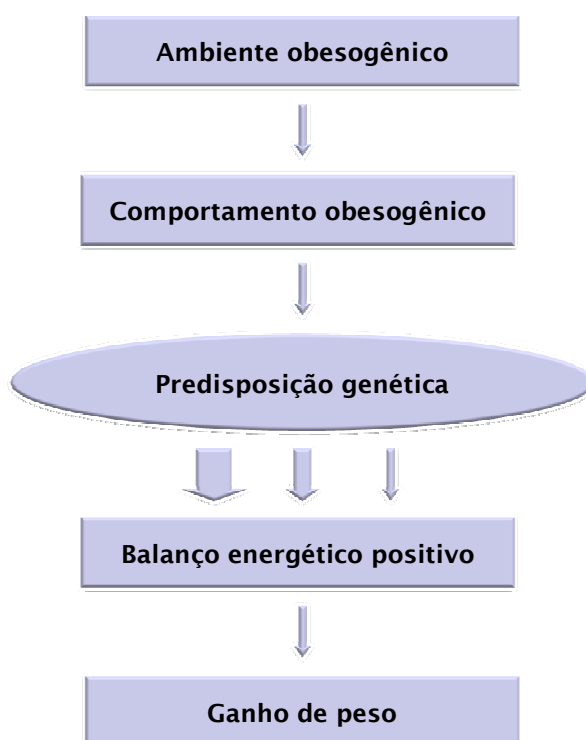
## **I.2. O Componente Genético da Obesidade Humana**

É difícil contestar o fato de que a prevalência da obesidade tem aumentado ao redor do mundo e que indivíduos com sobrepeso ou obesos estão se tornando cada vez mais obesos com o passar dos anos. Entretanto, são poucas as certezas sobre as verdadeiras causas desse fenômeno. Uma vez que essa atual epidemia tem se desenvolvido somente há três décadas, o genoma humano não pode ter sofrido mudanças significativamente suficientes para ser o único responsável por seu acontecimento. De fato, mudanças ambientais e no estilo de vida dos indivíduos (como aumento do consumo de alimentos

ricos em gordura e redução da atividade física), têm papéis fundamentais nessa contribuição ao ganho de peso. Estima-se que a herdabilidade da obesidade seja 77% (Wardle e cols., 2008), mostrando-se um caráter amplamente herdável, mas também sujeito a fatores ambientais.

Dentre os fatores ambientais que têm contribuído constantemente para a promoção de um ambiente obesogênico e, por conseguinte, para o aumento do ganho de peso, encontra-se a modernização. Toda a gama de recursos tecnológicos que, se por um lado possibilitam mais conforto, por outro acabam reforçando o sedentarismo. Por outro lado, a grande avalanche de produtos saborosos e práticos, perfeitamente acessíveis e econômicos, são noticiados a todo instante na mídia. O século XX foi marcado por uma dieta rica em gorduras (principalmente as de origem animal), açúcar e alimentos refinados, e reduzida em carboidratos complexos e fibras. Portanto, a relação sinérgica entre genótipo e ambiente faz com que na presença da predisposição genética à obesidade, a severidade da doença seja amplamente determinada pelo estilo de vida e pelas condições ambientais (Figura 1). Quando indivíduos que vivem em um ambiente restritivo evoluem em direção a um ambiente obesogênico, como ocorre em países industrializados, a maioria ganha peso. Contudo, aqueles com alta predisposição genética à obesidade ganharão mais peso, enquanto que aqueles resistentes à obesidade ganharão pouco ou nenhum peso (Loos e Bouchard, 2003). Além disso, a restrição energética pode resultar em uma significativa perda de peso em indivíduos obesos. Entretanto, não são todos que apresentam sucesso nessa redução, e, similarmente ao ganho de peso em um ambiente obesogênico, a redução do peso em resposta a um balanço energético negativo mostra diferenças interindividuais mediadas pelo componente genético (Loos e Rankinen, 2005). Tais diferenças na predisposição ao ganho de peso estão representadas pelas três diferentes setas na Figura 1,

as quais unem “predisposição genética” ao “balanço energético positivo”. Esquemáticamente, a seta mais estreita corresponde a uma baixa ou inexistente predisposição genética a obesidade, enquanto que as setas intermediária e larga correspondem a uma susceptibilidade aumentada, podendo promover um balanço energético positivo durante um longo período de tempo. Atualmente, diversos pesquisadores têm se perguntado onde reside e de que maneira surgiu nossa susceptibilidade biológica a obesidade. Contudo, são poucas as hipóteses que podem tentar nos aproximar de uma definição biológica capaz de esclarecer tais fatos.



**Figura 1** - Modelo hierárquico da relação entre diferentes classes de determinantes do ganho de peso corporal (adaptado de Bouchard, 2007)

A primeira hipótese a esse respeito, denominada de genótipo frugal (“thrifty genotype”), foi proposta há 47 anos pelo geneticista James V. Neel da Universidade de Michigan (Neel, 1962). De acordo com essa hipótese, os antepassados que apresentassem genótipos promotores de deposição de gordura, poderiam ter sido favorecidos durante as épocas de escassez alimentar, uma vez que àqueles mais resistentes à desnutrição teriam sobrevivido em maior proporção. Remanescente dos tempos incertos de nossos ancestrais caçadores-coletores, os quais tiravam seu sustento da própria natureza, essa fome instintiva os manteve vivos em um mundo competitivo que exigia o consumo de grandes quantidades de energia. Entretanto, a presença desses genótipos “austeros” ou “poupadores” se torna desvantajosa em nossa sociedade moderna, já que ela promove a deposição de gordura e prepara os indivíduos para uma época de falta de alimentos que pode nunca acontecer. Portanto, o que antigamente era uma característica que aumentava a capacidade de sobrevivência, hoje pode ser uma das principais causas do acentuado aumento da obesidade por todo o mundo. Contudo, alguns pesquisadores têm sugerido que essa hipótese dos genótipos frugais é insuficiente e apresenta muitas falhas ao tentar explicar o aumento da prevalência do ganho de peso (Bouchard, 2007; Prentice e cols., 2008; Speakman, 2008).

Em 1989, Neel modificou sua própria teoria original, sugerindo que a pressão seletiva atuante sobre os genótipos frugais possivelmente ocorreu posterior a era Paleolítica, e não durante, como sugerido anteriormente (Neel, 1989). Atualmente, Prentice e cols. (2008) apóiam a idéia de que tais períodos de fome e escassez de alimentos eram raros entre populações de caçadores-coletores, sendo mais evidentes em sociedades de agricultores e, através de sua influência na fertilidade, poderiam ter sido a fonte principal da pressão seletiva atuante no genoma humano. Dessa forma, o efeito principal seria mediado

pela fertilidade, e não pela viabilidade, desses indivíduos capazes de sobreviverem a grandes faltas de alimentos. A seleção por fertilidade, ainda, poderia ter sido capaz de produzir consideráveis mudanças evolutivas em um período histórico relativamente pequeno, como observamos nos dias de hoje. Entretanto, Speakman (2008) contesta a fecundidade maior entre indivíduos obesos, uma vez que longos períodos de fome foram sempre seguidos por períodos de intensa fecundidade ao longo da história. Nesse caso, períodos de fome com intensa mortalidade seriam relativamente raros, o que não teria implicação alguma em um evento seletivo. Além do fato da maioria das pessoas nessas condições morrerem devido a outras doenças, como cólera, febre tifóide e diarreia, geradas por baixo saneamento básico (Tauxe e cols., 1988), os índices de mortalidade discriminados são geralmente exagerados, uma vez que se confundem com eventos de migração. O autor ainda discute que as pessoas que morrem por inanição são principalmente crianças menores de 10 anos e adultos maiores de 40 anos que, provavelmente, já passaram seus genes e não estão sujeitos à seleção. Além disso, tais crianças podem estar morrendo, preferivelmente, em decorrência da carência de cuidados por pais e avós do que por desnutrição. Portanto, os genótipos frugais presentes atualmente não foram selecionados positivamente no passado, mas sim, sofreram um processo aleatório de deriva genética em decorrência de uma falta de seleção. Dentre essas teorias citadas, ainda não podemos apontar uma delas como a mais adequada para explicar a predisposição biológica à obesidade.

Mesmo apresentando divergências quanto às origens de tais genótipos frugais na população mundial, não podemos deixar de enfatizar que é indiscutível o relevante papel da predisposição genética no ganho de peso, a qual pode ser o resultado de diferenças biológicas e comportamentais gerados por diversos genes, ou pela combinação de

diferentes genótipos. De forma geral, muitos estudos sugeriram um forte componente genético na obesidade humana (Bouchard e cols., 1990; Hainer e cols., 2000). Esses trabalhos indicaram que, em resposta a dietas de baixo valor calórico, alguns indivíduos perderam peso mais facilmente do que outros, mas aqueles com o mesmo genótipo responderam de maneira similar quando expostos à mesma dieta. Esses experimentos confirmaram que existe uma diferença considerável na forma como os indivíduos respondem a alterações do balanço energético, e que a magnitude de suas respostas às mudanças na dieta (alimentação induzida ou restrição energética) é influenciada por uma predisposição genética. Além disso, pessoas que são obesas desde a infância apresentam qualitativamente e quantitativamente diferentes formas de regulação daquelas que alcançam a obesidade gradualmente como o passar dos anos (Blundell e Gillett, 2001). Dessa forma, o que se observa é que a obesidade no mundo está aumentando, sugerindo que existe uma debilidade na regulação do apetite e no controle da homeostase energética.

Com exceção de algumas doenças raras, na grande maioria das famílias de pacientes obesos não se observa um padrão claro de herança mendeliana. O excesso de adiposidade é uma característica multifatorial complexa, estando sob a influência de fatores sociais, comportamentais, fisiológicos, metabólicos e genéticos, interagindo entre si. São diversos os estudos que procuram explicar os mecanismos de ingestão alimentar (Weinsier e cols., 1998; Schwartz e cols., 2000; Woods e cols., 2000). Tais trabalhos descrevem os processos que influenciam a atividade alimentar e propõem modelos para que se possa entender a relação entre fatores biológicos e ambientais.

### **I.3. Controle da Ingestão Alimentar**

A regulação da ingestão alimentar é baseada em um intrincado sistema de “feedback”, o qual é influenciado não somente pela disponibilidade de nutrientes, mas também por vários fatores ambientais e psicológicos. A recente identificação de peptídeos relacionados à fome e à saciedade, bem como de seus receptores, tem aumentado o interesse de pesquisadores nos mecanismos de regulação do apetite, como um foco especial na identificação de ferramentas que podem ser úteis no tratamento farmacológico de distúrbios alimentares, desde anorexia até obesidade (Erlanson-Albertsson, 2005).

A resposta de cada indivíduo à dieta ou a outros fatores ambientais varia consideravelmente, dependendo das características dos mecanismos de controle do peso corporal apresentados pelos mesmos. Esse elemento diferencial, especialmente considerando o controle da obesidade por dietas ou fármacos, são conhecidos como uma possível resposta individual dependente do “background” genético (Palou e cols., 2000). Entretanto, existem algumas limitações nas investigações do comportamento alimentar em humanos. Indivíduos em ambientes laboratoriais ou em clínicas, nas quais são alimentados segundo um protocolo restrito, comportam-se diferentemente daquelas ocasiões onde estão livres para fazerem o que desejam. Conseqüentemente, torna-se muito difícil obter-se um real dado quantitativo a respeito do comportamento alimentar dessas pessoas (Blundell e Gillett, 2001).

A obesidade pode ser o resultado de mudanças genéticas ou adquiridas em três principais tipos de processos bioquímicos: controles da ingestão alimentar, do gasto



energético e do armazenamento de energia. Por ser o foco de estudo desse trabalho, apenas os controles relacionados à ingestão alimentar serão discutidos a seguir.

Existem diversos aspectos a serem considerados na regulação do comportamento alimentar. Dentro do aspecto temporal dos mecanismos de controle do apetite, incluem-se o controle a curto prazo, por sinais físicos e liberação de peptídeos digestivos em resposta ao alimento, e o controle crônico ou a médio-longo prazo, efetuado por sinais (como a leptina) que indicam os níveis de reserva energética no corpo. Dentre os aspectos qualitativos do controle do apetite, podemos citar os mecanismos relacionados à seleção de certos nutrientes específicos ou grupos de nutrientes, os quais são determinados pelo grau de prazer experimentado pelos indivíduos (sistema mesolímbico de recompensa). Por último, devemos considerar que todos esses processos são coordenados por mecanismos integrativos (Palou e cols., 2000).

### **I.3.1. Neurônios Hipotalâmicos**

Nos últimos dez anos, avanços consideráveis foram obtidos na caracterização dos mecanismos hipotalâmicos de controle da fome e da homeostase energética. Em grande parte, tais avanços foram possíveis graças à identificação do hormônio leptina e do estudo de sua ação no sistema nervoso central (Zhang e cols., 1994). Acredita-se hoje que um dos desfechos deste acúmulo progressivo de conhecimento seja a possibilidade de se revelarem alvos mais específicos para a abordagem terapêutica da obesidade.

São diversos os tipos de biomoléculas capazes de unir todas as informações relacionadas à situação energética externa (disponibilidade alimentar) à situação energética interna (reservas energética e nutricional). Entretanto, a insulina e a leptina já são suficientes para nos possibilitar uma interpretação fisiológica dos processos envolvidos no controle do balanço energético e explicá-los, pelo menos parcialmente, em termos genéticos e moleculares. Ambos hormônios circulam em níveis que são proporcionais ao volume de gordura corporal (Bagdade e cols., 1967; Considine e cols., 1996) e entram no SNC proporcionalmente aos seus níveis plasmáticos (Baura e cols., 1993; Schwartz e cols., 1996). Os receptores de leptina (LEPR) e insulina (INSR) são expressos por neurônios cerebrais envolvidos na ingestão energética (Baskin e cols., 1988; 1999; Cheung e cols., 1997), sendo que a administração cerebral desses peptídeos reduz a ingestão alimentar (Woods e cols., 1979; Campfield e cols., 1995; Weigle e cols., 1995), enquanto que a deficiência dos mesmos faz o oposto (Zhang e cols., 1994; Sipols e cols., 1995).

Na última década, as expressões de LEPR e INSR no sistema nervoso central foram avaliadas por vários grupos que observaram que, apesar de ambos os receptores serem encontrados em múltiplas e distintas regiões do cérebro, a presença no hipotálamo, e mais especificamente no núcleo arqueado, é a mais marcante (Folli e cols., 1994; Tartaglia, 1997; de LAFML e cols., 1999; Torsoni e cols., 2003). Até o presente, duas sub-populações de neurônios foram bem caracterizadas no núcleo arqueado. Uma expressa os neurotransmissores orexigênicos NPY e AgRP, enquanto a outra expressa os neurotransmissores anorexigênicos  $\alpha$ -MSH (clivado a partir de POMC) e CART (Flier, 2004). Existe uma certa controvérsia quanto à expressão de LEPR e INSR nestas duas sub-populações. A maior parte dos estudos sugere que ambos os receptores estejam presentes igualmente nas duas sub-populações de neurônios (Bjorbaek e Kahn, 2004; Flier, 2004;

Munzberg e Myers, 2005; Plum e cols., 2005); entretanto, em estudo recente, Xu e cols. (2005) apresentaram evidências de que apenas neurônios  $\alpha$ -MSH/CARTérgicos expressam LEPR e INSR, e que neurônios NPY/AgRPérgicos possuem apenas o INSR. Apesar de que, do ponto de vista funcional, tal controvérsia deva resultar em poucas diferenças, quando se discute a viabilidade do emprego de abordagens neuromodulatórias como método fármaco-terapêutico para a obesidade, aí sim tal informação passa ter um valor determinante.

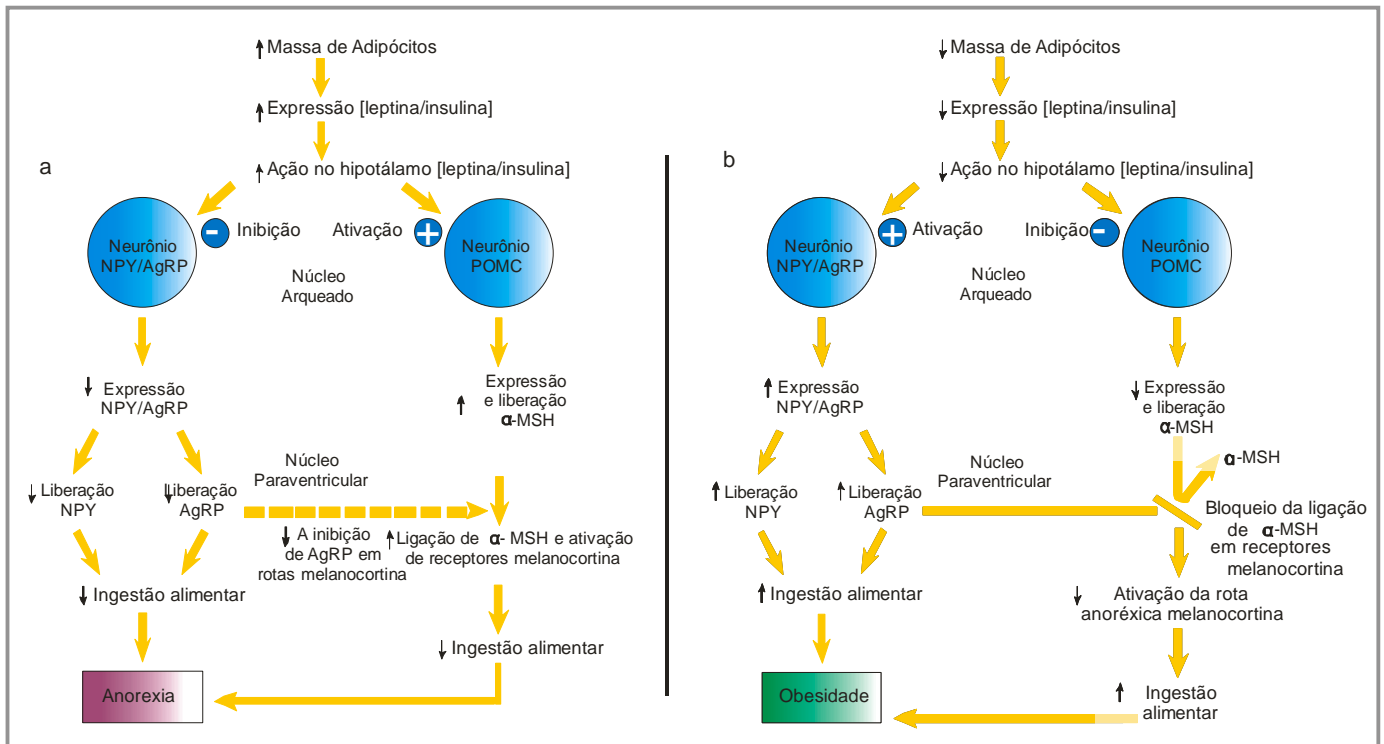
Diversos estudos têm demonstrado que a leptina apresenta um papel mais importante do que a insulina no controle da homeostase energética via SNC. Como exemplo, é possível observar que uma deficiência de leptina leva à obesidade severa, com hiperfagia que persiste até mesmo com altos níveis de insulina. Entretanto, a deficiência de insulina não induz obesidade (Schwartz e cols., 2000). Em pacientes com diabetes mellitus fora de tratamento, a ingestão alimentar aumenta consideravelmente (Leedom e Meehan, 1989), enquanto que os níveis de leptina e de adiposidade corporal permanecem baixos (Hathout e cols., 1999). Isso ocorre, porque, ao invés de ser estocado em forma de gordura, o excesso de calorias ingerido nesse contexto contribui para um acréscimo dos níveis sanguíneos de glicose, a qual é posteriormente excretada junto com a urina (Schwartz e cols., 2000).

A descoberta do gene *ob* em 1994, e a clonagem de seu produto genético, a leptina, pelo grupo de Friedman, da Rockefeller University, abriram as portas da pesquisa deste peptídeo produzido pelas células adiposas (Zhang e cols., 1994). Em camundongos *ob/ob*, a mutação genética é acompanhada de ausência de síntese de leptina, resultando em obesidade mórbida (Zhang e cols., 1994). Um ano mais tarde, o gene *db* (ou LEPR), o qual codifica o receptor da leptina (expresso no hipotálamo, em outras partes do sistema nervoso

central e também em tecidos periféricos) foi igualmente identificado (Tartaglia e cols., 1995) e caracterizado (Chen e cols., 1996; Chua e cols., 1996). Entre outras ações, a leptina ativa receptores hipotalâmicos, inibindo a secreção de neuropéptido Y (NPY), diminuindo o apetite e aumentando a termogênese pela ativação do sistema nervoso simpático (Campfield e cols., 1995; Chen e cols., 1996).

A leptina é uma molécula sinalizadora dos depósitos de gordura no organismo, sendo considerada um fator de saciedade. Até o momento, é o sinal aferente mais bem conhecido e estudado que emana do tecido adiposo e pode ser o hormônio mais importante na informação aos controladores centrais do balanço energético sobre o conteúdo de gordura corporal. Quando os níveis de leptina estão altos, as moléculas circulantes, liberadas na corrente sanguínea pelos adipócitos, ativam os receptores de leptina em neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo. Os neurônios do núcleo arqueado, que são ativados por um aumento dos níveis sanguíneos de leptina, são caracterizados por uma mistura característica de neurotransmissores peptídicos. A maioria deles parece possuir tanto POMC (pro-opiomelanocortina), a qual é a molécula precursora de  $\alpha$ -MSH (alfa-hormônio estimulador de melanócitos), quanto CART (transcrito regulado por cocaína e anfetamina), e os níveis destes peptídeos no cérebro variam na proporção dos níveis de leptina no sangue. Como resultado do aumento dos níveis de leptina no sangue, tem-se um aumento da liberação de  $\alpha$ -MSH através de POMC e de CART nos neurônios do núcleo arqueado. Tais peptídeos atuam no encéfalo e são designados anorexigênicos, por inibirem o apetite e aumentarem a taxa metabólica (Figura 2a)(Kristensen e cols., 1998; Cowley e cols., 2001).

Em contrapartida, uma queda nos níveis sanguíneos de leptina estimula outro tipo de neurônio do núcleo arqueado, o qual contém sua própria mistura de peptídeos: NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (proteína relacionada a agouti). Os efeitos desses peptídeos no balanço energético são opostos aos efeitos de  $\alpha$ -MSH e CART, já que estimulam o apetite e diminuem o metabolismo (Figura 2b)(Stanley e cols., 1986; Billington e cols., 1991; Shutter e cols., 1997; Hahn e cols., 1998). Por essa razão, esses são conhecidos como peptídeos orexigênicos. Embora o NPY seja descrito como a molécula orexigênica de maior potência no estímulo da ingestão alimentar, quando a sua resposta é medida em um curto intervalo de tempo, seus efeitos têm curta duração se comparados aos da AgRP. Portanto, a AgRP deve ser considerada a molécula orexigênica de maior relevância nesse processo, e o mecanismo responsável por sua ação prolongada é uma questão que ainda necessita de futuras investigações (Schwartz e cols., 2000).



**Figura 2** - Papel dos neurônios hipotalâmicos na sinalização da adiposidade. **a.** Leptina/insulina no núcleo arqueado inibe a rota anabólica NPY/AgRP e estimula a rota catabólica POMC, resultando na redução da ingestão alimentar e anorexia. **b.** Rota de sinalização na deficiência de leptina/insulina, onde ocorre o bloqueio dos receptores MC4 e aumento da ingestão alimentar, levando à obesidade (adaptado de Schwartz e cols., 2000).

AgRP e  $\alpha$ -MSH têm efeitos antagônicos. Ambos ligam-se ao receptor MC4. Enquanto que o  $\alpha$ -MSH é o agonista desse receptor, AgRP é o antagonista natural, que bloqueia a estimulação por  $\alpha$ -MSH (Cone e cols., 1996; Ollmann e cols., 1997). A ativação de receptores MC4 em neurônios do hipotálamo lateral inibe a ingestão de alimentos, já o bloqueio desses receptores tem efeito contrário (Fan e cols., 1997). Esses efeitos puderam ser observados através de camundongos deficientes do receptor MC4, os quais apresentaram-se hiperfágicos e obesos, indicando que a sua ativação é um fator limitante da ingestão alimentar e da massa de gordura corporal (Huszar e cols., 1997). Tal observação

pode ser estendida a humanos com mutações no gene desse receptor (Vaisse e cols., 1998; Yeo e cols., 1998).

O sistema NPY/AgRP não somente antagoniza células anorexigênicas com melanocortina em seus sítios alvos, nos quais os receptores MC4 estão localizados, como também inibe diretamente essas células. Isso ocorre tanto através do NPY, quanto através dos neurotransmissores GABA (Cowley e cols., 2001), os quais agem em inervações sinápticas de células POMC por meio de terminações celulares NPY/AgRP (Horvath e cols., 1992). Essa aparente interação anatômica unidirecional entre pericários NPY/AgRP e POMC tem uma significativa relevância, já que promove a inibição de células melanocortinas sempre que neurônios NPY/AgRP estiverem ativos. Pelo fato de não existir um mecanismo constitutivo direto de “feedback” a partir de células POMC para desativar neurônios NPY/AgRP, essa simples interação anatômica pode prover uma possível explicação do porquê da base desses circuitos alimentares promoverem mais a ingestão alimentar do que a sensação de saciedade (Horvath, 2005). Entretanto, estudos recentes indicam que a ação anorexigênica de CART parece ser independente do sistema melanocortina, já que o bloqueio de receptores MC4 pela administração de AgRP não previne a hipofagia induzida por esse neuropeptídeo (Edwards e cols., 2000). Examinando os efeitos de CART na ingestão alimentar, tem-se sugerido uma interação desse peptídeo com o sistema NPY, através da observação de que o neuropeptídeo orexigênico induz a liberação de CART e o contrário tem o mesmo efeito (Dhillon e cols., 2002). A liberação de neuropeptídeos orexigênicos induzida por CART parece ser contraditória se pensarmos nesse peptídeo como um simples agente anorexigênico. Contudo, essa observação pode representar um efeito de “feedback” negativo e, embora o CART tenha se mostrado um inibidor da hiperfagia induzida por NPY, esse fato não sugere, necessariamente, uma

conexão direta entre os dois sistemas. Espera-se que o bloqueio da alimentação induzida por NPY possa ser alcançado caso os neuropeptídeos anoréticos sejam administrados em doses suficientemente altas para isso (Murphy, 2005).

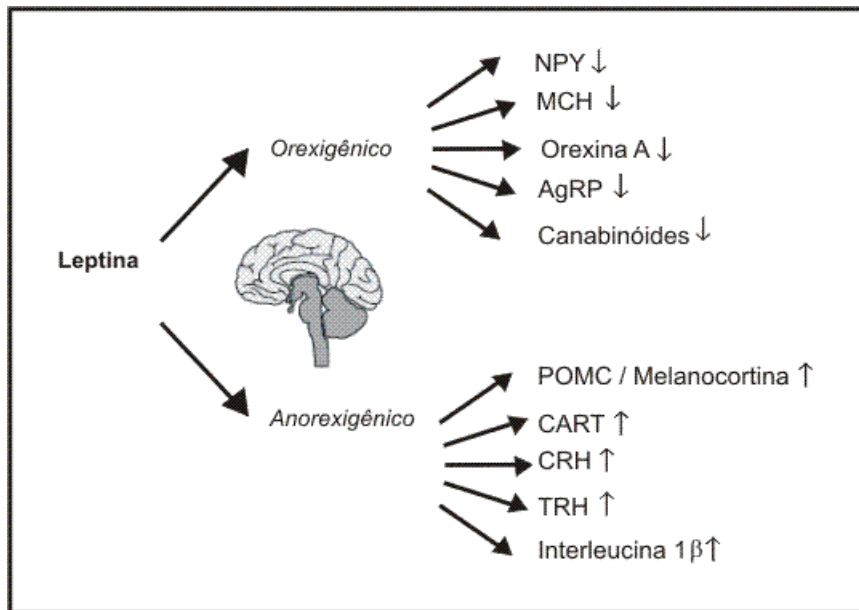
Além de os sistemas neuronais orexigênicos e anorexigênicos serem regulados diretamente por leptina, também sofrem a ação de outros sinais metabólicos periféricos, como a grelina, insulina, glicose e o peptídeo YY, um sinal de saciedade liberado do trato gastrointestinal após a ingestão alimentar proporcionalmente à quantidade de calorias contida na refeição (Cowley, 2003). Essa conexão e integração de sinais periféricos e circuitos cerebrais associados com a alimentação e o gasto energético parecem ser algo redundante. Entretanto, tal fato reflete a habilidade do circuito alimentar de se autorearranjar, com a finalidade de manter os níveis iniciais de energia caso um dos componentes da via de sinalização seja removido. Isso indica que as interações envolvendo circuitos neuronais hipotalâmicos têm uma substancial plasticidade, o qual é um componente chave na regulação fisiológica da homeostase energética (Horvath, 2005).

Atualmente, novos sistemas orexigênicos têm sido identificados, como as hipocretinas, ou orexinas (principalmente a hipocretina 1, ou orexina A), o hormônio concentrador de melanina (MCH) e os canabinóides endógenos, os quais parecem ser inibidos por leptina durante o controle da ingestão alimentar (Qu e cols., 1996; Sakurai e cols., 1998; Di Marzo e cols., 2001). Em contrapartida, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o hormônio liberador de tirotrófina (TRH) e a interleucina 1 $\beta$  estão entre a crescente lista de peptídeos que promovem o balanço energético negativo quando estimulados por leptina (Figura 3)(Bray e cols., 1990; Kow e Pfaff, 1991; Luheshi e cols.,



1999). Dessa forma, a ação desse hormônio em ambos os sistemas orexigênicos e anorexigênicos, quando combinados, leva a uma alta supressão da ingestão alimentar.

Os efeitos dramáticos de redução do peso corporal pela administração de leptina em camundongos obesos da linhagem *ob/ob*, que são deficientes em leptina devido a mutações no gene que a codifica, aumentaram as expectativas de que a obesidade humana também pudesse ser um estado de deficiência desta proteína e que poderia ser tratada pela sua administração exógena. Porém, estudos posteriores não confirmaram essa hipótese, concluindo que pessoas deficientes em leptina, provavelmente, representam apenas uma minoria dos casos de obesidade em humanos (Maffei e cols., 1996; Niki e cols., 1996). Em contraste, a maioria das pessoas obesas apresenta níveis elevados de leptina, o que indica que a obesidade possa ser um estado de resistência a essa proteína na maioria dos casos (Considine e cols., 1996). Essa hipótese sugere que alguns casos de obesidade possam ocorrer devido a uma redução da ação da leptina no cérebro, na qual indivíduos afetados provavelmente não responderiam a um tratamento farmacológico com leptina. Portanto, a busca por moléculas capazes de induzir a resistência à leptina, ou por mutações no seu receptor e/ou em etapas posteriores da sua via no sistema nervoso central, tornou-se uma importante direção tomada na compreensão da etiologia da obesidade em humanos.

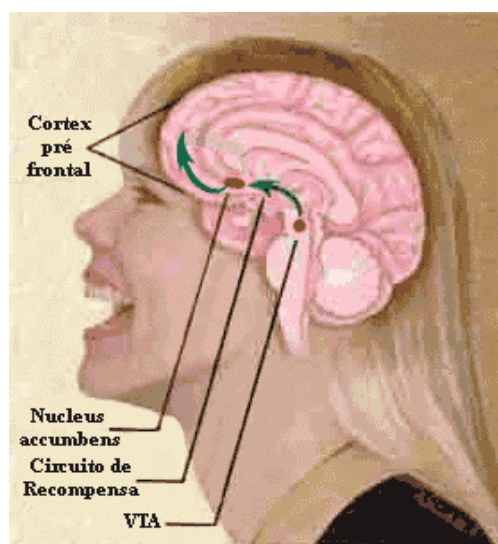


**Figura 3** – Visão esquemática do efeito da leptina na regulação da ingestão alimentar através de fatores neuroendócrinos. As setas indicam aumento e/ou redução nos níveis dos neuropeptídeos. NPY, neuropeptídeo Y; MCH, hormônio concentrador de melanina; AgRP, proteína relacionada a agouti; POMC, proopiomelanocortina; CART, transcrito regulado por cocaína e anfetamina; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; TRH, hormônio liberador de tirotrofina (adaptado de Trayhurn, 2005).

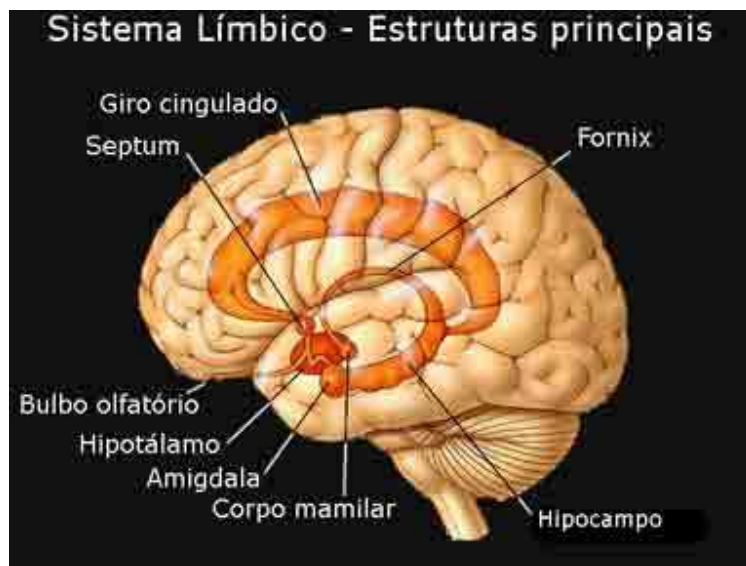
### I.3.2. Sistema Mesolímbico de Recompensa

Não são apenas os mecanismos fisiológicos dos tecidos, seja de déficits de nutrientes ou de saturação, que determinam as respostas comportamentais. Sentimentos de prazer ou de ansiedade, por exemplo, podem evocar determinado comportamento independente do estado nutricional do organismo. O prazer é tão poderoso que pode produzir comportamentos exagerados de alimentação, gerando a obesidade. Praticamente todas as substâncias que podem gerar abuso exercem, direta ou indiretamente, efeitos

cerebrais profundos. A via neurológica mais envolvida nas dependências é o chamado sistema mesolímbico de recompensa. Este sistema se estende desde a área tegumentar ventral (VTA) até o núcleo acumbens, apresentando projeções para diferentes áreas, como o sistema límbico e o córtex orbitofrontal. (Figura 4) (Ballone, 2005). O sistema límbico é constituído por várias estruturas do encéfalo (giro do cíngulo, hipocampo, amígdala, tálamo, etc.) (Figura 5) que participam no controle das emoções. Este sistema possui conexões com o hipotálamo e influencia o comportamento alimentar (Van de Graaff, 2003).



**Figura 4 - Circuito de recompensa.** Área tegumentar ventral (VTA), de onde partem os impulsos que nos possibilitam sentir as recompensas fundamentais proporcionadas pela satisfação da fome e da sede, necessárias à subsistência. Dessa área partem feixes de neurônios para cima e para frente, em direção a um núcleo neural situado na base do cérebro, chamado núcleo accumbens. Ao conjunto neural formado pelo - VTA - feixe neural - núcleo accumbens - damos o nome de circuito de recompensa (<http://www.espacocomenius.com.br/cerdrogasdois.htm>).



**Figura 5** - Sistema límbico, formado por suas principais estruturas, como hipotálamo, amígdala, hipocampo, corpo mamilar e giro do cíngulo.  
(<http://www.espacocomenius.com.br/cerdrogasdois.htm>)

O sistema de recompensa é uma parte primitiva do sistema nervoso dos mamíferos. Ele assegura que comportamentos fundamentais à sobrevivência da espécie, tais como a alimentação, sejam percebidos como prazerosos e, dessa forma, aumenta a possibilidade de que sejam sempre repetidos. A busca e o consumo compulsivo, seja por alimentos, ou por drogas, nada mais é do que o comportamento resultante desse sentimento de prazer e recompensa. O paralelo entre a toxicodependência (que é inicialmente definida como a condição de dependência e excessos) e a obesidade pode não parecer imediatamente aparente. Dependência é uma enfermidade crônica caracterizada por compulsão de utilizar a droga, perda de controle em limitar a ingestão de drogas, e aparecimento de um estado emocional negativo (por exemplo, ansiedade, irritabilidade), quando o acesso à droga é

impedido (Del Parigi e cols., 2003). Um comportamento semelhante caracteriza o desejo por alimentos em indivíduos hiperfágicos. Sabe-se que transtornos alimentares tendem a ocorrer juntamente com abuso de drogas e álcool (Grigson, 2002), assim como circuitos neuronais em comum atuam em recompensas químicas e alimentares, incluindo os canabinóides (Després, 2007), os opióides (Kelley e cols., 2002; Pelchat, 2002; Saper e cols., 2002) e as rotas dopaminérgicas (Pelchat, 2002; Saper e cols., 2002; Schultz, 2002) e serotoninérgicas (Pelchat, 2002; Saper e cols., 2002). Raras formas de obesidade causadas por defeitos nos mecanismos reguladores da homeostase energética que operam no subconsciente cerebral têm sido descritas em animais e humanos (Schwartz e cols., 2000). Dessa forma, considerando que a comida é a fonte natural mais comum de prazer na vida cotidiana e que a neurofisiologia da recompensa em seres humanos têm sido amplamente estudada no contexto do abuso de drogas (Volkow e Fowler, 2000), pouco se sabe sobre como o cérebro humano processa especificamente as recompensas alimentares.

#### **I.3.2.1. Sistema Endocanabinóide**

De 1960 até o presente, a *Cannabis sativa* (maconha ou marijuana) e seus outros derivados representam a droga ilícita mais consumida no mundo ocidental (Adams e Martin, 1996). Cultivada há mais de cinco mil anos para a obtenção de fibras utilizadas na manufatura de tecidos, a *Cannabis* era prescrita pelos chineses, desde 2600 a.C., para tratar câimbras, dores reumáticas e menstruais (Mechoulam, 1986). Porém, só em 1964 o seu

princípio ativo  $\Delta^9$ -tetra-hidrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC) foi isolado e sua estrutura química caracterizada (Gaoni e Mechoulam, 1964). Atualmente, inúmeros análogos sintéticos da *Cannabis sativa* vêm sendo prescritos como antieméticos e estimulantes do apetite aos pacientes com doenças oncológicas em uso de quimioterápicos. O dronabinol, um composto sintético derivado do THC foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) há mais de 15 anos como tratamento auxiliar de fases avançadas de portadores da AIDS e câncer que cursam com anorexia e caquexia (Plasse e cols., 1991; Beal e cols., 1995; Volicer e cols., 1997).

Os primeiros ligantes endógenos dos receptores canabinóides, ou endocanabinóides, foram descobertos no início dos anos 90, sendo eles a anadamida (Devane e cols., 1992) e o glicerol 2-araquidonoil (2-AG) (Mechoulam e cols., 1995; Sugiura e cols., 1995). Ambos são derivados do ácido araquidônico, o qual é um ácido graxo precursor de muitos outros sinalizadores químicos, bem como agonistas dos receptores CB1 e CB2. Em 1990, o primeiro gene para um receptor canabinóide (CB1) foi clonado (Matsuda e cols., 1990), seguido três anos mais tarde pela caracterização do segundo gene para o receptor (CB2) (Munro e cols., 1993), ambos pertencentes a superfamília de receptores acoplados à proteína G. Levando-se em consideração a distribuição no Sistema Nervoso Central (SNC), CB1 foi considerado o receptor canabinóide do tipo cerebral, enquanto que CB2, por ser expresso, principalmente, em células imunes, foi considerado o tipo periférico. Contudo, essa classificação não se faz mais correta dado que inúmeros estudos têm mostrado a expressão de CB1 também em tecidos periféricos, bem como de CB2 em células imunes derivadas do cérebro (Porter e Felder, 2001). Dessa forma, podemos dizer que o sistema endocanabinóide é constituído pelos receptores canabinóides, pelos endocanabinóides e

pelas enzimas que catalisam a sua biossíntese. Visto que não existem evidências demonstrando o envolvimento de CB2 no controle do balanço energético, esse trabalho focalizou-se, exclusivamente, em CB1, o qual apresenta significativos efeitos na ingestão alimentar.

No SNC, CB1 é predominantemente expresso presinápticamente, modulando a liberação de neurotransmissores como a dopamina, o GABA, a noradrenalina, o glutamato e a serotonina (Schlicker e Kathmann, 2001). Os efeitos comportamentais provocados por  $\Delta^9$ -THC incluem ataxia, analgesia, hipotermia, euforia, déficit de memória a curto prazo e outros prejuízos cognitivos. É possível inferir que tais efeitos sejam mediados por CB1, uma vez que a expressão desse receptor ocorre em áreas cerebrais relacionadas a essas funções, bem como em camundongos deficientes de CB1 esses efeitos estão ausentes (Zimmer e cols., 1999; Ledent e cols., 1999).

Cota e cols. (2003) também verificaram a evidência de que os endocanabinóides atuam em várias regiões do hipotálamo as quais regulam a homeostase energética, incluindo o hipotálamo lateral, o núcleo arqueado e o núcleo paraventricular, todos em conjunção com efeitos diretos em células adiposas na lipogênese, para promover um balanço energético positivo. Na mesma direção, Di Marzo e cols. (2001) observaram que camundongos deficientes de CB1, ou tratados com antagonistas do receptor, consumiram menos alimentos nas primeiras horas após a privação alimentar. Outros trabalhos evidenciaram a importância dos endocanabinóides na ingestão alimentar através do uso de antagonistas do receptor CB1, os quais reduziram a aquisição calórica e o peso corporal em camundongos (Hildebrandt e cols., 2003) e em humanos (Black, 2004). Tais antagonistas de receptor canabinóide estão sendo vistos como possíveis fármacos para a perda de peso.

Os dados encontrados por Di Marzo e cols. (2001) de que os canabinóides apresentam relevante papel na aquisição energética, juntamente com o papel neuromodulador dos endocannabinóides através de seus receptores CB1 previamente estabelecido (Di Marzo e cols., 2004), sugerem que esse sistema controla a ingestão alimentar em dois níveis principais. O primeiro deles é que esse sistema reforça a motivação de encontrar e consumir alimentos com um alto valor de incentivo, possivelmente por interagir com rotas mesolímbicas envolvidas em mecanismos de recompensa. O segundo é que o mesmo, por ser ativado em grande demanda no hipotálamo após uma curta privação alimentar, regula os níveis e/ou a ação de outros mediadores orexigênicos e anoréticos, com a finalidade de induzir o apetite. Essa hipótese de ação dupla em regiões mesolímbicas e hipotalâmicas foi confirmada através da observação de que a administração de endocannabinóides nessas áreas estimula a ingestão alimentar em ratos (Jamshidi e Taylor, 2001; Kirkham e cols., 2002). Além disso, os níveis de endocannabinóides são maiores nessas regiões durante a privação e menores durante o consumo alimentar, como o esperado para um mediador orexigênico. De fato, a leptina diminui os níveis de endocannabinóides no hipotálamo mais do que o faz para outros neuropeptídeos orexigênicos (Di Marzo e Matias, 2005).

A hiperativação do sistema endocanabinóide não só causa aumento de peso (Pagotto e cols., 2006) como pode induzir fenótipos dislipidêmicos e disglucêmicos (Di Marzo e Matias, 2005). Numerosos estudos clínicos e experimentais demonstraram que a intervenção farmacológica no sistema representa promissora perspectiva terapêutica no controle da obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e aterosclerose (Després e cols., 2005; Pi-Sunyer e cols., 2006). Entretanto, são poucos os estudos de associação realizados



entre o gene CNR1 (qual codifica o receptor canabinóide 1 – CB1) e fenótipos relacionados à obesidade humana.

### **I.3.2.2. Sistema Dopaminérgico**

Em 1954, o psicólogo americano James Olds, ao realizar experiências em um rato, para estudar o "estado de alerta, colocou, por engano, os eletrodos em uma área profunda do cérebro, tida como responsável pelas reações emocionais. Os referidos eletrodos estavam conectados, através de arames, a uma alavanca que permitia ao animal já devidamente treinado acioná-la, sempre que desejasse. Olds verificou que o roedor passou a acionar o dispositivo freneticamente, como se, da estimulação cerebral resultante, lhe adviesse uma imensa satisfação (Olds, 1976). Repetindo a experiência com outros ratos, idênticos resultados foram obtidos, sendo que alguns chegavam a acionar a alavanca 4 a 5 mil vezes em uma hora. O prazer que obtinham devia ser de uma tal intensidade, que nem a fome nem estímulos dolorosos conseguiam interromper o processo. Eles somente paravam de se auto estimular quando vencidos pela exaustão. Olds havia descoberto as áreas cerebrais responsáveis pela sensação de recompensa.

Fortes evidências indicam que o sistema dopaminérgico tem um importante papel na motivação de comportamentos, inclusive do comportamento alimentar (Comings e Blum, 2000). A alimentação está associada com a liberação de dopamina no estriado dorsal e o grau de prazer sentido durante a ingestão alimentar está diretamente associado à quantidade

de dopamina liberada nessa região (Szczyпка e cols., 2001; Small e cols., 2003). Os efeitos centrais da dopamina são mediados por quatro subtipos de seus receptores, os quais desempenham papéis imperativos no controle dos movimentos, prazer, recompensa e regulação neuroendócrina da glândula pituitária (Baik e cols., 1995; Kandel, 2000). Chama-se de subtipo 2 (codificado pelo gene DRD2) o receptor dopaminérgico que mais se associa com o controle do balanço energético (Baptista, 1999; Jenkinson e cols., 2000; Tataranni e cols., 2001). Experimentações animais sugerem que a dopamina está envolvida na modulação de aspectos não específicos do comportamento alimentar. Há mais de 40 anos, Ungerstedt (1971) demonstrou que ratos que tiveram seus neurônios dopaminérgicos destruídos por uma neurotoxina (6-hidroxi-dopamina) mostraram-se afáxicos. Na mesma direção, Szczyпка e cols. (1999) observaram que camundongos incapazes de sintetizar dopamina foram incapazes de sobreviver até a quarta semana de vida a menos que seus níveis de dopamina fossem restaurados no estriado dorsal. Tais estudos que correlacionam o sistema de recompensa com o comportamento alimentar têm sido recentemente aplicados em humanos. Wang e cols. (2001) foram os primeiros a demonstrarem que a biodisponibilidade de receptores D2 apresentava-se diminuída no estriado dorsal de indivíduos obesos, da mesma forma como foi descrito previamente em pacientes usuários de drogas e álcool (Volkow e Fowler, 2000). Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que dopamina foi liberada nessa mesma região cerebral de indivíduos com peso normal em resposta ao cheiro do alimento (efeito amplificado pela administração de metilfenidato, um bloqueador da reabsorção de dopamina no SNC), característica que enfatizam o efeito do sistema dopaminérgico em eventos de antecipação e desejo de uma próxima refeição (Volkow e cols., 2002).

Como muitas monoaminas têm função biológica é importante que suas concentrações no ambiente extracelular e intracelular sejam controladas. A função da MAO (enzima monoamina oxidase) é degradar essas monoaminas, evitando assim que se acumulem (no caso de monoaminas endógenas, como a dopamina) ou que gerem efeitos indesejáveis (no caso de monoaminas exógenas, como as provindas da alimentação). O processo pelo qual a MAO degrada monoaminas é conhecido por desaminação oxidativa, a qual gera como produtos aldeídos e íon amônio. No caso da dopamina, a degradação não se dá somente pela MAO, mas também pela COMT (catecol-O-metil transferase). A COMT é uma enzima de localização extracelular, podendo somente ela O-metilizar a dopamina presente fora do corpo celular neuronal. Essa O-metilação pode ocorrer antes ou depois da desaminação realizada pela MAO. As enzimas MAOA (monoamina oxidase-A) e MAOB (monoamina oxidase-B) estão localizadas nas mitocôndrias intraneuronais e são as únicas capazes de desaminar a dopamina que foi recapturada pelo seu transportador SLC6A3 para a sinapse, controlando, portanto, a concentração desse neurotransmissor na fenda sináptica (Napolitano e cols., 1995).

Diante do exposto, conclui-se que vários mecanismos homeostáticos estão envolvidos no controle do equilíbrio energético. Mesmo diante de todo avanço científico que já ocorreu acerca dos sistemas neurais, muito ainda precisa ser esclarecido em relação a esse complexo mecanismo de regulação do consumo de alimentos. No entanto, em humanos (e talvez também em outras espécies), quando baixa o nível de dopamina nos neurônios pós-sinápticos da via mesolímbica, quer por diminuição da produção desse neurotransmissor, quer por redução do número de seus receptores D2, as mesmas condições que antes atuavam como autênticos estímulos naturais já não se mostram suficientes para gerar sensações prazerosas ou de bem-estar. O indivíduo passa, então, a

buscar, através de alterações comportamentais (em geral de natureza perversa e/ou pelo consumo de certas substâncias químicas), o aumento da liberação de dopamina para o sistema límbico. Nesse caso incluem-se o uso e abuso de substâncias químicas, como álcool, cafeína e nicotina, que parecem induzir ao aumento da liberação de dopamina, assim como o aumento do consumo alimentar, levando assim a um aumento da obesidade entre esses indivíduos (Oliveira, 1999).

#### **I.4. Genes Candidatos**

Desde o reconhecimento de que a variação interindividual da obesidade e fenótipos relacionados têm origem em múltiplos determinantes genéticos, pesquisadores estão buscando alcançar a identificação de genes específicos, bem como suas mutações com implicações funcionais, que possam estar associados ou ligados à obesidade.

Nosso grupo investiga já, há vários anos, genes candidatos de susceptibilidade à obesidade em uma amostra de descendentes de europeus da cidade de Porto Alegre (Mattevi, 2003; Mattevi e cols., 2002; 2004; 2006; 2007; Fiegenbaum e Hutz, 2003; Hutz e cols., 2003). Esses estudos já identificaram associação em 9 genes dos 17 previamente selecionados dentre aqueles que compreendem as várias vias metabólicas envolvidas na etiologia do acúmulo excessivo de massa corporal, desde sinalizadores centrais, até genes cujos produtos participam no processo de termogênese. É importante salientar, ainda, que, dentre os genes com resultados de associação positiva, alguns apresentaram associações

gênero-específicas, bem como interações gene-ambiente. Dessa forma, torna-se imperativo analisar o efeito desses genes controlando por fatores biológicos e ambientais que exercem influência no desenvolvimento da doença em questão e, portanto, capazes de modular a resposta de tais genes sobre o fenótipo estudado.

Com a primeira edição em 1994, tem sido publicada uma compilação sobre os estudos genéticos em relação a essa complexa doença, designada Mapa Genético da Obesidade Humana (Pérusse e cols. 2005). Até março de 2005, pelo menos 113 genes com associação positiva em estudos publicados haviam sido relatados.

Para esse trabalho, foram selecionados oito genes candidatos à obesidade, todos expressos no sistema nervoso central e incluídos em uma das três vias principais envolvidas na homeostase energética: a ingestão alimentar. Os principais genes pertencentes às três rotas metabólicas que influenciam o consumo energético foram selecionados de acordo com sua relevância nas vias de regulação. Dentre os genes pertencentes ao mecanismo de regulação via neurônios hipotalâmicos encontram-se a proteína relacionada a agouti (AgRP), o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), o receptor melanocortina 4 (MC4R) e o pro-opiomelanocortina (POMC). O gene estudado pertencente ao sistema endocanabinóide foi o receptor canabinóide 1 (CNR1) e os atuantes no sistema dopaminérgico foram o receptor de dopamina D2 (DRD2), a catecol-O-metil transferase (COMT) e a monoamina oxidase A (MAOA). Os polimorfismos analisados no presente estudo estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Características dos polimorfismos gênicos analisados

Gene	Polimorfismo	dbSNP ID	Frequência da variante rara(%)	Localização no Gene	Endonuclease para RFLP	Referência
AgRP	199G/A	rs5030980	A= 4,6	Região codificante	BsmAI	Argyropoulos e cols., 2002
CART	-156A/G	rs35862863	A= 44,6	Promotor	BpmI	Yamada e cols., 2002
CNR1	1359G/A	rs1049353	A= 22	Região codificante	MspI	Gadzicki e cols., 1999
CNR1	3813A/G	rs12720071	G= 11	3'UTR	HinfI	Zhang e cols., 2004
CNR1	4895A/G	rs806368	G= 27,9	3'UTR	FokI	Zhang e cols., 2004
COMT	158G/A	rs4680	A(Met)= 40,9	Região codificante	Hsp92II	Lachman e cols.,1996
DRD2	TaqIA	rs1800497	T(A1) = 24,3	Região codificante	TaqI	Grandy e cols., 1993
DRD2	-141C <i>Ins/Del</i>	rs1799732	<i>Del(-)</i> = 12,3	Promotor	MvaI	Ohara e cols., 1998
MAOA	u-VNTR 30bp	u-VNTR	Baixa atividade (L)= 38,9	Promotor	-	Sabol e cols., 1998
MC4R	-2745C/T	rs7242169	T= 20,2	Promotor	NcoI	Loos e cols., 2005
POMC	8246C/T	rs1042571	T= 19,1	3'UTR	MboII	Hixson e cols., 1999

A seleção desses genes baseou-se, principalmente, nas funções propostas para as proteínas codificadas por eles e nos tecidos nos quais essas proteínas são expressas. Em relação às características moleculares de cada gene, procuraram-se aqueles com polimorfismos já descritos para outras populações derivadas de europeus. A Tabela 5 descreve os estudos de associação entre os polimorfismos gênicos estudados na presente Tese e fenótipos relacionados à obesidade humana em diferentes populações. Até o presente, 76% dos trabalhos publicados (n=29) demonstraram associações estatisticamente significantes, enquanto que 24% (n=9) obtiveram resultados negativos. Cabe ressaltar que dos 11 polimorfismos selecionados, 8 deles apresentaram até 5 trabalhos de associação e apenas 2 foram extensivamente estudados (DRD2 TaqIA e POMC 8246C/T). É importante salientar que dos 10 trabalhos realizados com a variante DRD2 TaqIA, somente um obteve resultado de associação negativa, o que sugere um importante papel desse gene na etiologia da obesidade humana. Em relação à variante POMC 8246C/T, dos 8 estudos realizados, metade obteve associações positivas, enquanto 3 obtiveram resultados negativos e um encontrou monomorfismo desse polimorfismo na população investigada. Apenas uma das variantes selecionadas nunca foi estudada em relação ao ganho de peso (DRD2 -141C *Ins/Del*). Entretanto, esse polimorfismo foi incluído no presente trabalho por apresentar evidências de funcionalidade modificando a expressão do gene DRD2 (Arinami e cols., 1997), o qual desempenha importante papel no controle da ingestão alimentar. É possível observar também que somente um trabalho até o momento estudou as variantes CNR1 3813A/G e 4895A/G (Russo e cols., 2007) e MC4R -2745C/T (Loos e cols., 2005) com enfoque relacionado ao ganho de peso.

Mesmo com grandes evidências de que alguns genes demonstram influência nas características relacionadas ao ganho de peso, para a maioria deles esses efeitos são

modestos, inconsistentes e, até mesmo, não são replicados em diferentes populações. Esses resultados demonstram que, mesmo com um número relativamente alto de trabalhos realizados, o papel dessas variantes no desenvolvimento da obesidade ainda necessita de futuros esclarecimentos.



**Tabela 5:** Estudos de associação entre fenótipos relacionados à obesidade humana e os polimorfismos gênicos analisados

Gene	Localização Cromossômica	Polimorfismo	dbSNP ID	Estudos de Associação
AgRP	16q22	199G/A	rs5030980	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Ausência de associação com IMC em 257 indivíduos hispânicos e 248 indivíduos americanos euro-descendentes (Brown e cols., 2001);</li><li>2. Associação com IMC, gordura corporal e massa gorda em 183 indivíduos euro-descendentes entre 47 e 59 anos de idade (Argyropoulos e cols., 2002);</li><li>3. Associação com IMC e massa gorda em 874 indivíduos franco-canadenses (Marks e cols., 2004);</li><li>4. Associação com IMC em 272 homens holandeses entre 20 e 40 anos de idade (van Rossum e cols., 2006).</li></ol>
CART	5q13-14	-156A/G	rs35862863	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Associação com IMC em 528 indivíduos japoneses (Yamada e cols., 2002);</li><li>2. Associação com IMC em 660 indivíduos franceses (Guérardel e cols., 2005).</li></ol>
CNR1	6q14-15	1359G/A	rs1049353	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Associação com IMC em 210 indivíduos italianos entre 65 e 75 anos de idade (Gazzerro e cols., 2007);</li><li>2. Ausência de associação com IMC em 451 indivíduos obesos euro-descendentes (Aberle e cols., 2007);</li><li>3. Ausência de associação com IMC em 120 crianças e adolescentes alemãs com obesidade severa (Müller e cols., 2007);</li><li>4. Associação com WHR em 1.064 homens obesos euro-descendentes (Peeters e cols., 2007).</li></ol>
CNR1	6q14-15	3813A/G	rs12720071	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Associação com prega subescapular e WC em 216 homens italianos entre 40 e 59 anos de idade (Russo e cols., 2007).</li></ol>
CNR1	6q14-15	4895A/G	rs806368	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Ausência de associação com prega subescapular e WC em 216 homens italianos entre 40 e 59 anos de idade. Polimorfismo em desequilíbrio de</li></ol>

				ligação com 3813A/G e associação do haplótipo com WC na mesma população (Russo e cols., 2007).
COMT	22q11.21	158G/A	rs4680	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Associação com IMC em 181 mulheres canadenses na pré-menopausa. Entretanto, a associação não foi significativa após controle por fatores de crescimento (Hong e cols., 2003);</li> <li>2. Associação com perda de gordura corporal durante exercício físico em 83 mulheres euro-descendentes na pós-menopausa (Tworoger e cols., 2004);</li> <li>3. Associação com peso corporal em 246 meninas suecas na pré-puberdade (Eriksson e cols., 2005);</li> <li>4. Ausência de associação com IMC em 500 mulheres inglesas (Need e cols., 2006);</li> <li>5. Associação com diâmetro abdominal sagital e WHR em 214 homens suecos (Annerbrink e cols., 2008).</li> </ol>
DRD2	11q23	TaqIA	rs1800497	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Associação com obesidade em 392 indivíduos euro-descendentes (Comings e cols., 1993);</li> <li>2. Associação com obesidade em 73 indivíduos obesos euro-descendentes (Noble e cols., 1994);</li> <li>3. Associação com obesidade e transtornos comórbidos por uso de substâncias em 40 obesos euro-descendentes (Blum e cols., 1996);</li> <li>4. Ausência de associação com IMC em 1.187 índios Pima (Jenkinson e cols., 2000);</li> <li>5. Associação com IMC em 176 indivíduos euro-descendentes (Spitz e cols., 2000);</li> <li>6. Associação com dobras cutâneas em 383 indivíduos chineses (Thomas e cols., 2000);</li> <li>7. Associação com obesidade em 990 indivíduos chineses (Thomas e cols., 2001);</li> <li>8. Associação com IMC e pregas cutâneas em 113 índios brasileiros</li> </ol>

				(tribos Xavante, Zoró, Gavião, Suruí e Kaingang) (Hutz e cols., 2003); 9. Associação com IMC em 70 mulheres norte-americanas entre 14 e 22 anos de idade (Stice e cols., 2008); 10. Associação com obesidade em 44 indivíduos diabéticos afro-descendentes (Barnard e cols., 2009).
DRD2	11q23	-141C <i>Ins/Del</i>	rs1799732	1. Ausência de trabalhos de associação com fenótipos relacionados à obesidade humana.
MAOA	Xp11.3-11.4	VNTR 30pb	u-VNTR	1. Associação com IMC >35kg/m <sup>2</sup> em 50 indivíduos obesos mexicanos (Camarena e cols., 2004); 2. Associação com IMC e peso corporal em 575 pares de gêmeas inglesas (Need e cols., 2006); 3. Associação com IMC em 941 adolescentes masculinos euro e hispano-descendentes (Fuemmeler e cols., 2008).
MC4R	18q22	-2745C/T	rs7242169	1. Associação com atividade física e ausência de associação com IMC em 200 famílias franco-canadenses (669 indivíduos) (Loos e cols., 2005).
POMC	2p21-22	8246C/T	rs1042571	1. Associação com níveis séricos de leptina em 337 americanos mexicanos (Hixon e cols., 1999); 2. Ausência de associação com obesidade em 381 indivíduos franceses (Delplanque e cols., 2000); 3. Ausência desse polimorfismo em 284 homens suecos (Rosmond e cols., 2002); 4. Ausência de associação com obesidade em 242 crianças e adolescentes afro e euro-descendentes entre 5 e 18 anos de idade (Feng e cols., 2003); 5. Ausência de associação com obesidade em 102 suecos obesos (Suviolahti e cols., 2003); 6. Associação com WHR em 248 famílias inglesas (1428 indivíduos) (Baker e cols., 2005); 7. Associação com WC, gordura corporal e níveis séricos de leptina; e

				ausência de associação com IMC e peso corporal em 1.036 pares de gêmeas inglesas (Chen e cols., 2005); 8. Associação com IMC e WC em 45 famílias (811 indivíduos) hispano-descendentes (Sutton e cols., 2005).
--	--	--	--	---

## **I.5. Justificativa e Objetivos**

O aumento da prevalência de obesidade em várias regiões do planeta vem se revelando como um dos mais importantes fenômenos clínicoepidemiológicos da atualidade. Tal fato levou a Organização Mundial da Saúde a reconhecê-la como um dos dez principais problemas de saúde nas mais diversas sociedades (World Health Organization, 1998). Fatores como a mudança do hábito alimentar e o estilo de vida sedentário, aliados a determinantes genéticos ainda pouco conhecidos, desempenham um papel relevante na patogênese desta doença. Além de gerar um considerável sofrimento nos indivíduos afetados e levar a grandes conseqüências econômicas, a obesidade aumenta dramaticamente o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, doenças coronarianas, hipertensão, apnéia do sono, asma e alguns tipos de câncer (câncer de mama e de cólon, por exemplo). Esses diversos efeitos, já citados anteriormente, nos possibilitam perceber o porquê do entendimento dos mecanismos do comportamento da ingestão alimentar ter se tornado um tópico científico de extrema relevância nos últimos anos.

Desde o descobrimento do hormônio leptina, avanços consideráveis foram obtidos na caracterização dos mecanismos hipotalâmicos do controle da ingestão alimentar e da termogênese. Tais avanços têm revelado as particularidades de um sistema complexo e integrado, e têm oferecido novas perspectivas para abordagens terapêuticas farmacológicas específicas. Por ser uma doença multifatorial complexa, a natureza poligênica da obesidade humana sugere que a presença de alelos de susceptibilidade em numerosos genes pode aumentar a probabilidade de que seus portadores desenvolvam a doença. Entretanto, a

presença de variação genética não é suficiente por si só para explicar a expressão da obesidade, já que se sabe que a mesma interage com outros fatores genéticos, metabólicos e/ou ambientais. Nesse sentido, os estudos de associação são amplamente aceitos na detecção de genes de susceptibilidade que possam apresentar um papel relevante no desenvolvimento da doença (Clément, 1999).

Dando continuidade ao trabalho relacionado à ingestão alimentar que o nosso grupo vem desenvolvendo (Mattevi, 2003; Mattevi e cols., 2002; 2004; 2006; 2007; Fiegenbaum e Hutz, 2003; Hutz e cols., 2003), decidiu-se verificar polimorfismos de genes relacionados à via de sinalização da leptina, assim como à via mesolímbica de recompensa, os quais estejam, possivelmente, envolvidos na patogênese da obesidade humana, enfocando especificamente a rota de sinalização do controle da ingestão alimentar via SNC. Espera-se que essa caracterização permita a identificação de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de uma série de medicamentos com diferentes mecanismos de ação, a fim de proporcionarem um tratamento mais efetivo desta doença heterogênea e complexa.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

1. Determinar as frequências alélicas e genotípicas de 11 polimorfismos localizados em 8 genes candidatos (Tabela 4) envolvidos no controle da ingestão alimentar;
2. Realizar estudos de associação entre essas variantes, o índice de massa corporal (IMC) e a razão cintura-quadril (WHR) em uma amostra da população derivada

de europeus de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, visando à seleção de possíveis genes candidatos envolvidos na obesidade humana;

3. Dentre os genes que apresentarem mais de um polimorfismo e resultado de associação estatisticamente significativo, realizar estudos haplotípicos, com a finalidade de se identificar a provável variante funcional.

Capítulo II

**Cannabinoid type-1 receptor gene polymorphisms are associated  
with central obesity in a Southern Brazilian population**

---

Dis Markers 2008;25(1):67-74



# Cannabinoid type-1 receptor gene polymorphisms are associated with central obesity in a Southern Brazilian population

Janaína P. Jaeger<sup>a</sup>, Vanessa S. Mattevi<sup>b</sup>, Sidia M. Callegari-Jacques<sup>a,c</sup> and Mara H. Hutz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91509-900 Porto Alegre, RS, Brazil

**Abstract.** The CB1 cannabinoid receptor and its endogenous ligands, the endocannabinoids, are involved in energy balance control, stimulating appetite and increasing body weight in wasting syndromes. Different studies have investigated the relationship between polymorphisms of the cannabinoid receptor 1 (*CNR1*) gene and obesity with conflicting results. In the present study, we investigated the 1359G/A (rs1049353), 3813A/G (rs12720071) and 4895A/G (rs806368) polymorphisms in the *CNR1* gene in a Brazilian population of European descent. To verify the association between these variants and obesity-related traits in this population, 756 individuals were genotyped by PCR-RFLP methods. The 4895G allele was associated with waist to hip ratio (WHR) ( $P = 0.014$ ;  $P = 0.042$  after Bonferroni correction). An additive effect with the GAA haplotype was associated with WHR ( $P = 0.028$ ), although this statistical significance disappeared after Bonferroni correction ( $P = 0.084$ ). No significant association was observed between the genotypes of the 1359G/A and 3813A/G polymorphisms and any of the quantitative variables investigated. Our findings suggest that *CNR1* gene polymorphism is associated with central obesity in this Brazilian population of European ancestry.

**Keywords:** Obesity, *CNR1*, polymorphisms, WHR, BMI

## 1. Introduction

The endocannabinoid (EC) system is an endogenous and physiological system that plays a key role in the regulation of food intake and fat accumulation. It can also modulate glucose and lipid metabolism through its effects on peripheral tissues. At least two 6-protein-coupled cannabinoid receptors have been identified [7, 26]. The first cannabinoid receptor, which is the most

abundant in the brain, was named CB1 after the cloning of the second cannabinoid receptor subtype CB2, mostly present in immune cells [15]. CB1 is expressed abundantly in several areas of the central nervous system. These areas include the hippocampus, ganglia, cerebral cortex, cerebellum, limbic system and hypothalamus [16]. Early studies showed a scattered presence of CB1 receptors in peripheral organs, such as the adipose tissue and gastrointestinal system, which are key organs involved in the regulation of food intake [3, 25]. On the other hand, CB2 does not play a part in this regulation system.

Obesity is a major predisposing factor for several chronic diseases including coronary artery disease and diabetes. It arises from complex interactions between

\*Corresponding author: Prof. Mara H. Hutz, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6720; Fax: +55 51 3343 5850; E-mail: mara.hutz@ufrgs.br



genetics and environment that alter the delicate mechanism regulating energy expenditure and food intake. Feeding control determines the sensation of satiety and hunger through an interplay mechanism between internal signals (i.e. leptin) and environmental factors. The endocannabinoid system may influence food intake by regulating the expression and/or action of several hypothalamic anorectic and orexigenic mediators [6,14]. Signals of peripheral origins modulate the neurochemical activation of hypothalamic neurons. CB1 and endocannabinoids are able to cross-talk to those signals, such as leptin and adiponectin, secreted by adipocytes. In the central nervous system (CNS), endocannabinoids can act as neurotransmitters, representing an important modulatory mechanism of neuronal transmission. In the hypothalamus, the changes in endocannabinoid levels seem to be inversely correlated with some changes that are known to occur in leptin blood levels [21]. Indeed, leptin decreases endocannabinoid levels in the hypothalamus, as much as it does for other orexigenic mediators. On the other hand, animal models of obesity (*ob/ob*; *db/db* mice or *fa/fa* Zucker rats) have increased endocannabinoid levels [8]. Moreover, ventromedial hypothalamic administration of anandamide (one CB1 endogenous ligand) in pre-satiated rats resulted in CB1 dependent hyperphagia [17]. These findings are in agreement with the devastating impact that the disruption of CB1 signaling has on feeding and growth in young mice [9]. Recently, it has been demonstrated that CB1 mRNA co-expresses with corticotrophin releasing hormone (CRH), cocaine-amphetamine related transcript (CART), melanin concentrating hormone (MCH) and prepro-orexin in hypothalamic neurons [6].

All these data taken together highlight the role of the endocannabinoid system in feeding and energy balance regulation. Indeed, it was reasonable to hypothesize that from a pharmacological point of view, inhibition of the endocannabinoid system through antagonism of the cannabinoid CB1 receptor may be an effective therapeutic approach to treat human obesity.

The cannabinoid receptor 1 (*CNR1*) gene was mapped to chromosome 6q14-15 [13]. Several human *CNR1* gene polymorphisms have been reported. Among them a silent mutation resulting in the substitution from G to A nucleotide position 1359 (rs1049353) in codon 453 (Thr) [11] and two exon 4 variants in the 3' UTR region, 3813A/G (rs12720071) and 4895A/G (rs806368) [33]. Although two previous studies have shown association of the 1359G/A variant with obesity-related traits in European populations [12,23], two other studies failed to confirm this association [1,22]. The

two exon 4 polymorphisms were recently associated with abnormal body mass index (BMI) and body fat distribution in Italian middle-aged man [28].

Since the importance of the aforementioned gene variants to the development of obesity in human populations is still a matter of controversies, the aim of this study was to determine whether genetic polymorphisms at the *CNR1* gene contribute to variation in obesity-related phenotypes in an European-derived Southern Brazilian population, and to examine these results in the context of current findings related to the proposed functions for these endocannabinoids.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

The study was performed in 756 individuals of European descent residing in Porto Alegre, the capital of Brazil's southernmost state. This city was founded in 1752 by 60 Caucasian couples from the Azores Islands. Currently the population is still mainly of Portuguese descent, but Italians, Spaniards and Germans have also contributed to its gene pool [29]. The 447 women and 309 men most of them of low socio-economic status, were selected at random at the Clinical Analysis Laboratory of the Pharmacy School of the Federal University of Rio Grande do Sul among those who came from several city health centers for free routine blood determinations. The sample collection was performed between 2001–2002. The Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the study protocol and all individuals gave their written informed consent prior to the investigation. A questionnaire was completed, including smoking habits, alcohol consumption and regular physical activity in leisure time. Exclusion criteria were occasional smoking, secondary hyperlipidemia due to renal, liver or thyroid disease, and pregnant women. In addition, individuals with a previous history of diabetes mellitus or fasting glucose levels above 6.9 mmol/l [2] were excluded from the analyses to avoid the confounding effects of diabetes and its treatment on obesity-related traits.

### 2.2. Anthropometric measurements and biochemical analysis

The subjects attended the laboratory in the morning after a 12 h fast. Blood samples were collected and weight and height were measured. Height was



Table 1

Anthropometric, biological, and lifestyle characteristics of 756 individuals investigated (quantitative data are expressed as mean  $\pm$  SD)

	Women	Men	P-value	Cases	Controls	P-value
n	447	309		322	434	
Age (years) <sup>a</sup>	42.8 $\pm$ 15.6	46.0 $\pm$ 14.3	0.004	40.8 $\pm$ 15.3	46.5 $\pm$ 14.6	0.0001
Weight (Kg) <sup>a</sup>	65.9 $\pm$ 13.2	77.0 $\pm$ 13.3	0.0001	59.8 $\pm$ 8.5	78.4 $\pm$ 12.4	0.0001
Height (cm) <sup>a</sup>	158.4 $\pm$ 6.9	170.6 $\pm$ 6.9	0.0001	163.7 $\pm$ 9.3	163.1 $\pm$ 9.0	0.329
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	26.3 $\pm$ 5.1	26.5 $\pm$ 4.3	0.596	22.2 $\pm$ 2.0	29.4 $\pm$ 3.7	0.0001
Waist to hip ratio (cm) <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.10	0.0001	0.85 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.08	0.0001
Waist circumference (cm) <sup>a</sup>	88.7 $\pm$ 12.5	95.4 $\pm$ 11.1	0.0001	82.1 $\pm$ 8.4	98.3 $\pm$ 10.1	0.0001
HDL-Chol (mg/dL) <sup>b</sup>	46.4 $\pm$ 11.5	42.2 $\pm$ 12.5	0.0001	46.8 $\pm$ 12.0	43.2 $\pm$ 11.9	0.0001
LDL-Chol (mg/dL) <sup>b</sup>	135.7 $\pm$ 41.3	131.3 $\pm$ 41.9	0.272	126.6 $\pm$ 41.1	139.5 $\pm$ 41.1	0.0001
Triglycerides (mg/dL) <sup>b</sup>	127.2 $\pm$ 82.3	152.9 $\pm$ 24.1	0.0001	111.9 $\pm$ 74.4	156.7 $\pm$ 114.8	0.0001
Glycaemia (mg/dL) <sup>b</sup>	88.6 $\pm$ 11.3	93.6 $\pm$ 22.8	0.0001	87.6 $\pm$ 17.3	92.8 $\pm$ 16.5	0.0001
Physically inactive (%) <sup>c</sup>	66.0	43.4	0.0001	43.3	56.7	0.299
Current smokers (%) <sup>c</sup>	34.5	40.5	0.107	63.1	36.9	0.447
Alcohol consumption (%) <sup>c</sup>	33.1	58.9	0.0001	56.3	43.7	0.416

Cases correspond to normal-weight (BMI <25) and controls to obese plus overweight (BMI  $\geq$ 25) individuals.<sup>a</sup>Unpaired *t*-test.<sup>b</sup>Mann-Whitney test.<sup>c</sup>Chi-Square ( $\chi^2$ ) test.

measured to the nearest centimeter using a rigid stadiometer. Weight was measured to the nearest 0.1 Kg using an electronic calibrated balance scale. Body mass index (BMI) was expressed as weight (Kg) divided by the square of height (m<sup>2</sup>). Waist circumference was measured at mid-level between the lower rib margin and the iliac crest [31], and hip circumference at the widest trochanters to the nearest mm; all measurements were performed by the same person. Overweight was defined for a BMI over 25 Kg/m<sup>2</sup> and obesity for a BMI over 30 Kg/m<sup>2</sup>, according to the World Health Organization criteria [32]. Total cholesterol (TC), HDL cholesterol, triglycerides (TG) and glucose were determined by conventional enzymatic methods. LDL cholesterol was calculated according Friedewald et al. [10].

### 2.3. DNA analysis

Genomic DNA was extracted from 5ml anticoagulated venous blood samples using a salting out method [19]. The polymorphic sites 1359G/A, 3813A/G and 4895A/G at the *CNR1* gene were genotyped by PCR-RFLP methods as previously described [11,28]. Oligonucleotides used to amplify these variants were: forward 5'-GAAAGCTGCATCAAGA GCCC-3' and reverse 5'-TTTTCCTGTGCTGCCAGG G-3' for the 1359G/A variant; forward 5'-GATGAAGG CTCAGGGTGCTAGAGG-3' and reverse 5'-TAGTGC TGTCAGCCCCATGTCCC-3' for the 3813A/G variant; forward 5'-GAGACCACCCATATCATGCACAC A-3' and reverse 5'-AACTCTGATCCCCAGTAGGCC

TAG-3' for the 4895A/G variant. The amplicons were digested with restriction endonucleases *MspI* (for 1359G/A), *HinfI* (for 3813A/G) and *FokI* (for 4895A/G).

### 2.4. Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies to Hardy-Weinberg expectations was tested using the goodness of fit chi-square test. Allele and genotype frequencies between normal-weight (BMI <25 kg/m<sup>2</sup>) and overweight/obese (BMI  $\geq$ 25 kg/m<sup>2</sup>) groups were compared by chi-square tests.

Multiple linear regression analyses were used to model BMI and WHR on genotypes. These analyses were performed with BMI and WHR as dependent variables and age, physical activity, smoking, alcohol consumption, gender, HDL and LDL cholesterol, triglycerides and glycaemia as covariates. Age and serum lipids as well as glucose concentrations entered as continuous variables, and lifestyle factors were included as dichotomic variables. Interactions between SNPs and all covariates were tested. The statistical analysis was performed using the SPSS® 13.0.0 package.

Haplotype frequencies and linkage disequilibrium were estimated using the Multiple Locus Haplotype Analysis (version 2.0) [20]. Haplotype associations with BMI and WHR were performed by multiple linear regression analysis as described above. Two sided *p*-values <0.05 were considered for statistical significance. Bonferroni correction for multiparametric testing was applied when appropriate.



Table 2  
Genotype and allele frequencies of *CNR1* 1359G/A, *CNR1* 3813 A/G and *CNR1* 4895 A/G gene variants in normal-weight (BMI <25) and obese plus overweight (BMI ≥25) individuals

Genotypes	BMI <25		BMI ≥25		Alleles	Frequencies	
	n	f	n	f		BMI <25	BMI ≥25
<i>CNR1</i> 1359 G/A							
A/A	16	0.05	18	0.04	A	0.22	0.22
A/G	106	0.34	152	0.36	G	0.78	0.78
G/G	199	0.61	255	0.60	P-value <sup>a</sup>	1.0	
<i>CNR1</i> 3813 A/G							
A/A	248	0.79	335	0.78	A	0.89	0.89
A/G	62	0.20	92	0.21	G	0.11	0.11
G/G	3	0.01	2	0.01	P-value <sup>a</sup>	1.0	
<i>CNR1</i> 4895 A/G							
A/A	167	0.53	217	0.50	A	0.73	0.71
A/G	130	0.41	179	0.42	G	0.27	0.23
G/G	20	0.06	34	0.08	P-value <sup>a</sup>	0.45	

n = number of individuals.

f = genotype frequencies.

<sup>a</sup>  $\chi^2$ -test between allele frequencies.

### 3. Results

Anthropometric, biological and lifestyle characteristics of the investigated subjects are summarized in Table 1. The individuals were between 15 and 85 years old ( $44.1 \pm 15.1$ ), being 40.9% males. Most individuals (42.6%) had a normal weight (BMI <25 kg/m<sup>2</sup>), while 36.9% could be classified as overweight and 20.5% were obese (BMI ≥30 kg/m<sup>2</sup>). No differences in genotype and allele frequencies, BMI and smoking were observed between male and female subjects but, as expected, a smaller waist to hip ratio (WHR) was observed in normal weight individuals ( $P < 0.0001$ ).

No differences in genotype and/or allele frequencies were observed between normal-weight and overweight/obese groups for the three polymorphisms investigated (Table 2). The same result was obtained when comparing normal and obese individuals (BMI ≥30 kg/m<sup>2</sup>; data not shown). All genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Multiple linear regression analysis of BMI and WHR on the *CNR1* polymorphisms and other potential confounders are shown in Tables 3, 4 and 5 for 1359 G>A, 3813 A>G 4895 A>G polymorphisms respectively. These analyses were performed with BMI and WHR as continuous traits using the whole sample. Since the less frequent alleles for the three *CNR1* polymorphisms were present only in few individuals, the analyses were performed according to a dominant model pooling heterozygous and less frequent allele homozygous individuals. When controlled by confounders, the 4895G allele was associated with WHR ( $P = 0.014$ ;  $P = 0.042$  after Bonferroni correction; statistical power = 0.71), but not with BMI ( $P = 0.958$ ) (Table 5). The multiple R<sup>2</sup> of the regression model with the *CNR1* 4895 polymorphism and covariates was 0.368; the partial R<sup>2</sup> for *CNR1* 4895 was 0.008. The effect of the gene can also be evaluated through the difference between the adjusted means of the genotypes. The WHR mean ± SE were:  $0.877 \pm 0.003$  for homozygous AA individuals, and  $0.889 \pm 0.003$  for AG + GG individuals. The difference between means was 0.012 (CI 95%: 0.0024–0.0211). No significant association was observed between the genotypes of the 1359G/A and 3813A/G polymorphisms and any of the quantitative variables investigated (Tables 3 and 4). No second order interactions were observed between each SNP and covariates (data not shown).

The examination of pair-wise linkage disequilibrium (LD) indicated that the three polymorphisms were in strong LD (1359G/A and 3813A/G –  $D' = 0.87$  and  $P < 0.0001$ ; 1359G/A and 4895A/G –  $D' = 0.88$  and  $P < 0.0001$ ; 3813A/G and 4895A/G –  $D' = 0.76$  and  $P < 0.0001$ ). Due to this strong LD between polymorphisms, three frequent haplotypes accounted for 88% of the chromosomes investigated, G<sub>1359</sub>A<sub>3813</sub>A<sub>4895</sub> (GAA), G<sub>1359</sub>A<sub>3813</sub>G<sub>4895</sub> (GAG) and A<sub>1359</sub>A<sub>3813</sub>A<sub>4895</sub> (AAA), frequencies were 0.489, 0.182 and 0.212, respectively. The other five haplotypes accounted together for less than 12% of the observed chromosomes. Because the haplotype derived from the three wild alleles corresponds to almost 50% of the haplotype frequencies, we tested the association assuming an additive effect of this haplotype GAA (absent, one copy or two copies) with BMI and WHR using a multiple linear regression analysis. An association



Table 3  
Multiple Linear Regression of BMI and WHR with *CNR1* 1359G/A genotypes (GG versus AG plus AA) and potential confounders

Variables	BMI			WHR		
	B	Std. Error	P-value	B	Std. Error	P-value
<i>CNR1</i> 1359A	0.234	0.336	0.487	0.003	0.005	0.519
Age (years)	0.021	0.012	0.092	0.001	0.0001	0.0001
Smoking	-0.405	0.347	0.243	0.008	0.005	0.123
Alcohol	-0.024	0.352	0.946	-0.011	0.005	0.029
Physical inactivity	-0.186	0.344	0.589	0.015	0.005	0.004
Gender	-0.661	0.365	0.07	0.065	0.005	0.0001
HDL-Chol (mg/dL)	-0.055	0.015	0.0001	-0.0007	0.0001	0.002
LDL-Chol (mg/dL)	0.008	0.004	0.054	0.00005	0.0001	0.415
Triglycerides (mg/dL)	0.011	0.002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Glycaemia (mg/dL)	0.078	0.014	0.0001	0.0007	0.0001	0.001

Table 4  
Multiple Linear Regression of BMI and WHR with *CNR1* 3813A/G genotypes (AA versus AG plus GG) and potential confounders

Variables	BMI			WHR		
	B	Std. Error	P-value	B	Std. Error	P-value
<i>CNR1</i> 3813G	-0.08	0.409	0.837	0.008	0.006	0.203
Age (years)	0.022	0.012	0.073	0.001	0.0001	0.0001
Smoke	-0.384	0.351	0.274	0.008	0.005	0.112
Alcohol	0.035	0.358	0.923	-0.012	0.005	0.028
Physical inactivity	-0.137	0.349	0.695	0.014	0.005	0.005
Gender	-0.523	0.37	0.158	0.067	0.005	0.0001
HDL-Chol (mg/dL)	-0.052	0.015	0.001	-0.0006	0.0001	0.004
LDL-Chol (mg/dL)	0.01	0.004	0.027	0.00006	0.0001	0.376
Triglycerides (mg/dL)	0.012	0.002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Glycaemia (mg/dL)	0.041	0.011	0.0001	0.0004	0.0001	0.013

with WHR was observed ( $P = 0.028$ ) (Table 6), although this P-value is above the threshold of statistical significance after Bonferroni correction ( $P = 0.084$ ). These results suggest that the presence of the block carrying the wild 4895A allele was associated with a smaller WHR, as the association at the single SNP level pointed to a higher WHR for 4895G allele carriers. Therefore a contribution of a genetic variant at *CNR1* gene in central obesity is suggested although it does not exclude the effect of other polymorphisms not investigated in the present study.

#### 4. Discussion

We have genotyped three SNPs in the *CNR1* gene in a sample of individuals from Southern Brazil of European ancestry. Evidence of association of 4895A/G variant and WHR was detected which was consistent in single SNP and haplotype analyses. Although it is not expected for any of these three SNPs to be functional, it is possible that we have detected an association through linkage disequilibrium of nearby polymorphisms.

Obesity was measured using body mass index (BMI) and waist to hip ratio (WHR). The measurement of WHR was chosen instead of waist circumference (WC) because it has been suggested to be a superior predictor of cardiovascular disease associated with abdominal obesity, as long as it includes hip circumference, which is inversely associated to metabolic dysfunction, hypertension, and death [18].

Five previous publications [1,12,22,23,28] have examined the possible association of *CNR1* polymorphisms with obesity. The association between the 1359A allele with lower BMI found by Gazzero et al. [12] has not been replicated in two other investigations from different populations [1,22]. Russo et al. [28] reported an association of the 3813G allele with several obesity related traits including waist circumference but not with the 4895 A>G polymorphism. In the present study, we observed an association of the 4895 A>G polymorphism with waist to hip ratio (WHR). Peeters et al. [23] recently reported an association of the *CNR1* 1359G/A variant with abdominal adiposity. In obese men, *CNR1* 1359A/A genotype was significantly associated with higher WHR and waist circumference. In the current study, we demonstrated that genetic vari-



Table 5  
Multiple Linear Regression of BMI and WHR with *CNR1* 4895A/G genotypes (AA versus AG plus GG) and potential confounders.

Variables	BMI			WHR		
	B	Std. Error	P-value	B	Std. Error	P-value
<i>CNR1</i> 4895G	0.018	0.332	0.958	0.012	0.005	0.014
Age (years)	0.024	0.012	0.052	0.001	0.0001	0.0001
Smoke	-0.367	0.349	0.294	0.009	0.005	0.076
Alcohol	0.07	0.355	0.844	-0.012	0.005	0.022
Physical inactivity	-0.119	0.346	0.731	0.015	0.005	0.003
Gender	-0.579	0.368	0.116	0.067	0.005	0.0001
HDL-Chol (mg/dL)	-0.049	0.015	0.001	-0.0006	0.0001	0.007
LDL-Chol (mg/dL)	0.009	0.004	0.043	0.00006	0.0001	0.331
Triglycerides (mg/dL)	0.012	0.002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Glycaemia (mg/dL)	0.04	0.011	0.0001	0.0004	0.0001	0.015

Table 6  
Multiple Linear Regression of BMI and WHR with GAA haplotype (additive effect) and potential confounders

Variables	BMI			WHR		
	B	Std. Error	P-value	B	Std. Error	P-value
Haplotype GAA	0.021	0.234	0.929	-0.008	0.003	0.028
Age (years)	0.023	0.012	0.061	0.001	0.0001	0.0001
Smoke	-0.39	0.349	0.265	0.009	0.005	0.081
Alcohol	0.042	0.355	0.905	-0.012	0.005	0.025
Physical inactivity	-0.132	0.346	0.703	0.015	0.005	0.003
Gender	-0.549	0.367	0.135	0.067	0.005	0.0001
HDL-Chol (mg/dL)	-0.048	0.015	0.001	-0.0006	0.0001	0.007
LDL-Chol (mg/dL)	0.009	0.004	0.037	0.00005	0.0001	0.375
Triglycerides (mg/dL)	0.012	0.002	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001
Glycaemia (mg/dL)	0.04	0.011	0.0001	0.0004	0.0001	0.016

ation at *CNR1* gene might play a role in abdominal obesity. Although we did not find an association with this polymorphism, these data reinforce the relevant effect of the *CNR1* gene in abdominal fat accumulation and distribution. These inconsistencies among studies could be explained by different genetic backgrounds or environmental factors, as for other gene variants, the impact of environmental factors such as diet, exercise, and climatic temperatures may obscure the expression of detectable and consistent phenotypes across human populations. Nevertheless these results taken together suggest a role for these *CNR1* polymorphisms on appetite control, although caution is needed in reporting which polymorphism might be involved.

A recent investigation showed that *CNR1* mRNA expression was negatively correlated with visceral fat mass. They also identified endocannabinoid plasma concentrations, in addition to body fat mass, as significant predictors of CB1 receptor gene expression. Once CB1 gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissues were closely correlated, it suggest that CB1 gene expression in subcutaneous adipose tissue may be an acceptable surrogate for CB1 gene expression in visceral adipose tissue [4]. Although it is more like-

ly to expect that genetic variation contributes to decrease rather than increase the receptor activity, leading to underweight and anorexia instead of overweight and obesity, this finding suggests that the association of the 4895G allele with WHR observed in the present investigation could be due to a higher expression of the *CNR1* gene. Meanwhile, no functional studies were carried out to test if this gene is differentially expressed according to 4895A/G or other gene variants. Because many of the regulatory regions of the gene are largely unknown, and the inconsistencies of which polymorphism is associated with obesity related traits, it is likely that the functional polymorphisms have yet to be identified.

The present study has some limitations. When studying polygenic traits, it is important to keep in mind that, generally, each gene contributes with a small to moderate percentage of the trait variance, which implies that the same disorder in different groups may be caused by different combinations of polygenes [5]. This fact could explain the small effect of the *CNR1* 4895 polymorphism in the regression model, in spite of the statistical significance. Although these polymorphisms may be considered representative for variations



at this locus [11,33], the observed associations could be spurious (type I error) due to multiple statistical comparisons. We performed the Bonferroni procedure for multiple testing corrections. However, when the probability of the type I error (false positive) decreases, the probability of the type II error (false negative) increases. The appropriate application of multiple testing corrections is not always clear [24] and therefore the two P-values (before and after corrections) are shown. Indeed, independent replication of significant associations in different populations is an important aspect of a credible genetic association result.

In summary, the results presented here showed evidence for the association of *CNR1* gene variation with central obesity phenotype. As only few recent studies showed association of the *CNR1* polymorphisms and obesity-related traits, in the current study we preferred to consider our findings as exploratory. Despite of our results being consistent with the hypothesis that the *CNR1* gene is a genetic contributor to abdominal obesity, replications in other populations are obviously warranted.

### Acknowledgments

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We are also grateful to Fabiana M Andrade, Marilu Fiegenbaum, Silvana de Almeida and Marcel Arsand for help in sample collection, and to Deise Friedrich for technical assistance.

### References

- [1] J. Aberle, I. Fedderwitz, N. Klages, E. George and F.U. Beil, Genetic variation in two proteins of the endocannabinoid system and their influence on body mass index and metabolism under low fat diet, *Hormone and metabolic research* **39** (2007), 395–397.
- [2] K.G.M.M. Alberti and P.Z. Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation, *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* **15** (1998), 539–553.
- [3] M. Bensaid, M. Gary-Bobo, A. Esclangon, J.P. Mafrand, G. Le Fur, F. Oury-Donat and P. Souhrie, The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases *Acrp30* mRNA expression in adipose tissue of obese *fafa* rats and in cultured adipocyte cells, *Molecular pharmacology* **63** (2003), 908–914.
- [4] M. Blüher, S. Engeli, N. Klöting, J. Berndt, M. Fasshauer, S. Bätke, P. Pacher, M.R. Schön, J. Jordan and M. Stumvoll, Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity, *Diabetes* **55** (2006), 3053–3060.
- [5] D.E. Comings, Why different rules are required for polygenic inheritance: lessons from studies of the DRD2 gene, *Alcohol* **16** (1998), 61–70.
- [6] D. Cota, G. Marsicano, M. Tschöp, Y. Grübler, C. Flachskamm, M. Schubert, D. Auer, A. Yassouridis, C. Thöne-Reineke, S. Ortmann, F. Tomassoni, C. Cervino, E. Nisoli, A.C. Linthorst, R. Pasquali, B. Lutz, G.K. Stalla and U. Pagotto, The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis, *The Journal of clinical investigation* **112** (2003), 423–431.
- [7] V. Di Marzo, M. Bifulco and L. De Petrocellis, The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation, *Nature reviews. Drug discovery* **3** (2004), 771–784.
- [8] V. Di Marzo, S.K. Goparaju, L. Wang, J. Liu, S. Bätke, Z. Járni, F. Fezza, G.L. Mizra, R.D. Palmiter, T. Sugiura and G. Kunos, Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake, *Nature* **410** (2001), 822–825.
- [9] E. Frède, Y. Ginzburg, A. Breuer, T. Bisogno, V. Di Marzo and R. Mechoulam, Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup suckling and growth, *European journal of pharmacology* **419** (2001), 207–214.
- [10] W.T. Friedewald, R.I. Levy and D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clinical chemistry* **18** (1972), 499–502.
- [11] D. Gadzicki, K. Müller-Vahl and M. Stuhmann, A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (*CNR1*) gene, *Molecular and cellular probes* **13** (1999), 321–323.
- [12] P. Gazzero, M.G. Caraso, M. Notaricola, G. Misciagna, V. Guerra, C. Laezza and M. Bifulco, Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population, *International journal of obesity* (2005) **12** (2007), 908–912.
- [13] M.R. Hoehe, L. Caenazzo, M.M. Martinez, W.T. Hsieh, W.S. Modi, E.S. Gershon and T.L. Bonner, Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15, *The New biologist* **3** (1991), 880–885.
- [14] T.L. Horvath, Endocannabinoids and the regulation of body fat: the smoking is clearing, *The Journal of clinical investigation* **112** (2003), 323–326.
- [15] A.C. Howlett, The cannabinoid receptors, *Prostaglandins & other lipid mediator* **68–69** (2002), 619–631.
- [16] A.C. Howlett, M. Glass, M. Dragunow and R.L. Faull, Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain, *Neuroscience* **77** (1997), 299–318.
- [17] N. Jamshidi and D.A. Taylor, Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats, *British journal of pharmacology* **134** (2001), 1151–1154.
- [18] L. de Koning, A.T. Merchant, J. Pogue and S.S. Anand, Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies, *European heart journal* **28** (2007), 850–851.
- [19] D.K. Lahiri and J.I. Nurnberger, Rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic acids research* **19** (1991), 5444.



- [20] J.C. Long, R.C. Williams and M. Urbanek, An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes, *American journal of human genetics* **56** (1995), 799–810.
- [21] P. Monteleone, I. Matias, V. Martiadis, L. De Petrocellis, M. Maj and V. Di Marzo, Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa, *Neuropsychopharmacology* **30** (2005), 1216–1221.
- [22] T.D. Müller, K. Reichwald, A.K. Werner, G. Bröner, T.T. Nguyen, S. Friedel, K. Koberwitz, S. Engeli, P. Lichtner, T. Meisinger, H. Schäfer, J. Hebebrand and A. Hinney, No evidence for an involvement of variants in the cannabinoid receptor gene (CNRI) in obesity in German children and adolescents, *Molecular genetics and metabolism* **90** (2007), 429–434.
- [23] A. Peeters, S. Beckers, I. Mertens, W. Van Hul and L. Van Gaal, The G1422A variant of the cannabinoid receptor gene (CNRI) is associated with abdominal adiposity in obese men, *Endocrine* **31** (2007), 138–141.
- [24] T.V. Perneger, What's wrong with Bonferroni adjustments, *BMJ* **316** (1998), 1236–1238.
- [25] R.G. Pertwee, Cannabinoids and the gastrointestinal tract, *Gut* **48** (2001), 859–867.
- [26] D. Piomelli, The molecular logic of endocannabinoid signaling, *Nature reviews Neuroscience* **4** (2003), 873–884.
- [27] M. Rinaldi-Carmona, F. Barth, M. Héaulme, D. Shire, B. Calandra, C. Congy, S. Martinez, J. Maruani, G. Néliat, D. Caput, P. Ferrara, P. Soubrié, J.C. Brelière and G. Le Fur, SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor, *FEBS letters* **350** (1994), 240–244.
- [28] P. Russo, P. Strazzullo, F.P. Cappuccio, D.A. Tregouet, F. Lauria, M. Loguercio, G. Barba, M. Versiero and A. Siani, Genetic variations at the endocannabinoid type 1 receptor gene (CNRI) are associated with obesity phenotypes in men, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92** (2007), 2382–2386.
- [29] F.M. Salzano and M.C. Bortolini, The evolution and genetics of Latin American populations, Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- [30] W.C. Willett, Anthropometric measures and body composition, Oxford University Press, New York, 1998.
- [31] World Health Organization, Physical status: the use and interpretation of anthropometry, World Health Organization, Geneva, 1995.
- [32] World Health Organization, Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 3–5 June 1997, World Health Organization, Geneva, 1998.
- [33] P.W. Zhang, H. Ishiguro, T. Ohtsuki, J. Hess, F. Carillo, D. Walther, E.S. Onaivi, T. Arinami and G.R. Uhl, Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse, *Molecular psychiatry* **9** (2004), 916–931.



Capítulo III

**Association studies of AgRP, CART, MC4R and POMC gene  
polymorphisms with obesity in a Brazilian population of European  
descent**

---

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista *Metabolism  
Clinical and Experimental*

**Association studies of *AgRP*, *CART*, *MC4R* and *POMC* gene polymorphisms with obesity in a Brazilian population of European descent**

Janaína P. Jaeger,<sup>1</sup> Vanessa S. Mattevi,<sup>2</sup> , Sídia M. Callegari-Jacques,<sup>3</sup> and Mara H. Hutz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Physiological Sciences Department, Federal University of Health Sciences from Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Statistics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Acknowledgments:** The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We are also grateful to Fabiana M Andrade, Marilu Fiegenbaum, Silvana de Almeida and Marcel Arsand for help in sample collection.

**Address to which proofs should be sent**

Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Instituto de Biociências, UFRGS  
Caixa Postal 15053  
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel 55 51 3308-6720  
Fax . 55 51 3343-5850  
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

## Abstract

Obesity arises from complex interactions between genetic factors and environment that alter the mechanism regulating energy expenditure and food intake. Although the list of genetic markers associated with obesity has increased in the last few years, its precise contribution is not well defined. We have investigated if sequence variants at the Agouti-related protein (*AgRP*), Cocaine and Amphetamine-regulated transcript (*CART*), Melanocortin receptor 4 (*MC4R*) and Proopiomelanocortin (*POMC*) genes are associated with obesity-related traits in subjects from a Brazilian population of European descent. This study consisted of 756 individuals genotyped by PCR-RFLP methods. Clinical data were assessed and the genotypes were tested for its independent contribution to body mass index (BMI) and waist to hip ratio (WHR) using chi-square tests and binomial multiple logistic regression models. The *CART* -156G allele had increased frequency in central obese individuals in the univariate analysis (P=0.003; P=0.012 after Bonferroni correction). The multivariate analysis showed that this *CART* -156G allele was associated with WHR adjusted for covariates (P=0.004; P=0.016 after Bonferroni correction). No significant association was observed between the polymorphisms at *AgRP*, *MC4R* and *POMC* genes and any of the qualitative variables investigated. These results showed further evidence for the association of *CART* gene variation with central obesity, possibly modulated by an interaction of genetic risk and additional environmental factors.

## 1. Introduction

Obesity is a major risk factor for several chronic diseases, such as coronary artery disease and diabetes. Given the heterogeneous and polygenic nature of human obesity, it is expected that gene-gene and gene-environmental interactions to be important for its etiology. It turns extremely important to study candidate gene variants in populations with different genetic backgrounds and living in different regions of the world.

Appetite and energy-balance regulation is a system composed of opposing orexigenic and anorexigenic pathways, where the balance between the two components will determine feeding behavior. The hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) plays a key role in the regulation of food intake and energy homeostasis [1]. The orexigenic neuropeptides Agouti-related protein (*AgRP*) and Neuropeptide Y (*NPY*) co-express in the same hypothalamic neurons and are downregulated by leptin. On the other hand the Proopiomelanocortin (*POMC*) and Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript (*CART*) are anorexigenic and co-express in the same neurons (but separately from *AgRP/NPY*) [2]. In this model, activation of *POMC* neurons by leptin [3,4] triggers the release of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -*MSH*) from *POMC* axon terminals, which in turn activates melanocortin receptor 4 (*MC4R*), leading to suppressed food intake and increased energy expenditure. Simultaneously, leptin suppresses the activity of *NPY/AgRP* neurons [3,4], which otherwise would antagonize the effect of  $\alpha$ -*MSH* on *MC4R* through the release of *AgRP* [5]. Not only does the *NPY/AgRP* system antagonize anorexigenic melanocortin cells, but it also directly inhibits *POMC* perikarya [4], whenever the

*NPY/AgRP* neurons are active. Although this bias toward positive energy balance is necessary from an evolutionary perspective, it is also likely to contribute to the etiology of metabolic disorders, such as obesity.

Due to their functional importance on appetite regulation, the *AgRP*, *POMC*, *CART* and *MC4R* genes have been extensively investigated in search of variants that could be important in human obesity genetic susceptibility [6-12]. The gene encoding *AgRP* is located on chromosome 16q22 and expresses two alternatively spliced transcripts, one in the arcuate nucleus of the hypothalamus and the other in peripheral tissues. Argyropoulos et al. [13] reported a significant association of a 199G>A (Ala67Thr) functional polymorphism with body mass index (BMI), fat mass, percent body fat and abdominal visceral fat, in adults with age over 50 years. The human *CART* gene maps to chromosome 5q13-14 [14,15], which has been shown to be a susceptibility locus for obesity [16]. A previous study that supports a role for *CART* in human obesity examined polymorphisms in the promoter region of this gene. As a result, six common polymorphisms were identified, but only the A to G substitution at the -156 site was associated with increased BMI [17]. Recently Guéradel et al. [10] screened the *CART* gene for sequence variation in relation to obesity in a French population and found a significant association of this polymorphism with morbid obesity (BMI  $\geq 40\text{kg/m}^2$ ). The region 2p21-2 contains the *POMC* gene and was associated to leptin concentrations in Mexican-American, French and African-American cohorts [16]. Association analysis of five polymorphisms genotyped on 811 Hispanic individuals showed that the 8246C>T variant in the 3'UTR had the strongest evidence of association with multiple obesity quantitative traits. Homozygous 8246T/T individuals had lower BMI and waist circumference (WC) than carriers of the 8246C allele

[18]. Finally, *MC4R* gene (18q22) mutations currently constitute the best available model for genetic predisposition to obesity, as demonstrated by their significant association with severe early-onset and/or morbid obesity [19-22]. Loss et al. [23] studied 200 French-Canadian families and found a significant association of the -2745C>T variant with physical activity phenotypes in the offspring. The homozygous -2745T/T individuals had the highest inactivity scores and the lowest BMI.

Since there is compelling evidence for the aforementioned gene variants to confer susceptibility to the development of obesity in human populations, this study aimed to verify whether genetic polymorphisms at the *AgRP*, *CART*, *MC4R* and *POMC* genes contribute to variation in obesity-related phenotypes in a Southern Brazilian population of European ancestry.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Subjects**

Subjects of European ancestry, as ascertained by skin color and morphological characteristics, most of them of low socio-economic status, were selected at random at a clinical center from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, among those who came from several city health centers for free routine blood determinations. The sample collection was performed between 2001-2002. Pregnant women, as well as those

individuals with secondary hyperlipidemia due to renal, liver or thyroid disease, and diabetes were not invited to participate in the study; and for those who consented to participate, a questionnaire was completed by an interviewer, which included details on medicine intake and lifestyle variables such as smoking and physical activity. From an initial sample of 834 subjects, we also excluded those with fasting blood glucose levels higher than 6.9 mmol/l [24]. Individuals on lipid lowering medication were also excluded. Therefore we remained with 756 individuals (447 females and 309 males) to be included in the study. The Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the study protocol and all individuals gave their written informed consent prior to the investigation.

Anthropometric measurements were taken in the morning after a 12h fast and blood samples were collected. Height was measured to the nearest centimeter using a rigid stadiometer. Weight was measured to the nearest 0.1 kg using an electronic calibrated balance scale. Body mass index (BMI) was expressed as weight (kg) divided by the square of height ( $m^2$ ). Waist circumference was measured at mid-level between the lower rib margin and the iliac crest [25], and hip circumference at the widest trochanters to the nearest mm; all measurements were performed by the same person. Overweight was defined for a BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> and obesity for a BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, according to the World Health Organization criteria [26]. Central obesity was determined as waist to hip ratio (WHR) over 0.95 in men and 0.80 in women [27].

## 2.2 Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leucocytes by a salting out method [28]. Amplification by polymerase chain reaction (PCR) was performed using published oligonucleotide sequences to amplify the DNA regions of interest: *AgRP* 199G>A (rs5030980) [13], *CART* -156A>G (rs35862863) [17], *MC4R* -2745C>T (rs7242169) [23] and *POMC* 8246C>T (rs1042571) [29]. Restriction analyses were employed to determine genotypes for the four variants. The amplicons were digested with restriction endonucleases *BsmAI* (for *AgRP* 199G>A), *BpmI* (for *CART* -156A>G), *NcoI* (for *MC4R* -2745C>T) and *MboII* (for *POMC* 8246C>T). The genotypes were determined after electrophoresis on agarose gels stained with ethidium bromide.

## 2.3 Statistical Analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies to Hardy-Weinberg expectations was tested using the goodness of fit chi-square test. Allele and genotype frequencies for all polymorphisms were compared by chi-square tests. Binomial multiple logistic regression analyses were used to model BMI and WHR on genotypes. The analyses were performed with BMI and WHR as dependent variables and age, physical activity, smoking and gender as covariates. Age was entered as a continuous variable, and lifestyle factors were included as dichotomic variables. Interactions between SNPs and all covariates were tested. The statistical analysis was performed using the SPSS<sup>®</sup> 13.0.0 package. Two sided p-values <0.05 were considered for statistical



significance. Bonferroni correction for multiparametric testing was applied when appropriate.

### 3. Results

The characteristics of the study population are summarized in Table 1. The individuals were on average 44.1 (s.d.  $\pm$  15.1) years old and had a BMI of 26.4 kg/m<sup>2</sup> (s.d.  $\pm$  4.8). Differences in age were observed between genders (P=0.004), and physical activity was more frequent in males than in females (P<0.0001). Although men had both a higher body weight and height compared to women, the BMI values did not differ between genders (P= 0.596). Furthermore, as expected, statistically significant findings were smaller waist circumference (P<0.0001) and waist to hip ratio (P<0.0001) in women.

Genotype frequencies at all sites were in agreement with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. The association analyses were performed according to a dominant model, due to the low number of individuals homozygous for the minor allele; they were pooled with subjects with a heterozygous genotype. No differences in genotype and/or allele frequencies were observed between normal-weight and overweight/obese groups for the four polymorphisms investigated (Table 2). However, a significant difference was observed for the *CART* -156A>G genotypes between subjects not presenting central obesity and presenting central obesity. There was a clear increase in the frequency

of genotype -156G/G in central obese individuals ( $X^2=9.323$ ,  $P=0.003$ ;  $P=0.012$  after Bonferroni correction).

In order to control for potential confounders, multiple logistic regression analyses checking for independent predictors of BMI and WHR was performed (Table 3). When controlled by confounders, the *CART* -156 G/G genotype was associated with WHR ( $P=0.004$ ;  $P=0.016$  after Bonferroni correction), but not with BMI ( $P=0.645$ ). The interaction effect between *CART* genotypes and smoking status on WHR is shown in Table 3. In the first instance, the interaction term *CART*\*Smoking status was statistically significant ( $P=0.018$ ), where smoking individuals homozygous for G allele appears to have an increased risk to develop central obesity than non-smoking individuals with the same genotype. However, this P-value was above the threshold of statistical significance after Bonferroni correction ( $P=0.072$ ). Interactions with physical inactivity, gender and age were also tested for BMI and WHR, but no significant results were observed (data not shown). Therefore, a contribution of this genetic variant at *CART* gene to central obesity is suggested and it does not exclude the effect of other polymorphisms at *AgRP*, *MC4R* and *POMC* genes not investigated in the present study.

#### **4. Discussion**

In this study, we have examined an association of common functional polymorphisms in *AgRP*, *CART*, *MC4R* and *POMC* genes with obesity-related traits in non-diabetic individuals of European descent. Our findings showed that the polymorphic *CART*

-156A>G variant was significantly associated with abdominal obesity, while *AgRP* 199G>A, *MC4R* -2745C>T and *POMC* 8246C>T gene variants did not appear to exert an influence on obesity-related traits in this population.

Although several evidences link the *CART* gene to the regulation of feeding and body weight [30-32], genetic association studies between polymorphic variants of this gene and obesity-related phenotypes are still scanty. The data presented here showed that the -156 G/G genotype was associated with WHR (Table 2 and Table 3). This result concurs with those reported for Japanese where the -156G allele was the one associated with obesity [17]. However, these two studies are discordant in relation to the results reported by Guérardel et al. [10] who observed a higher prevalence of the -156A allele in obese French subjects. *CART*-deficient animals did not show an increase in body-weight until after the 14<sup>th</sup> week of a high-fat diet, suggesting that the *CART* role in obesity requires interactions with the environment [33].

Gene-environment interactions have been reported as a major cause of the apparent inconsistencies between published studies. Stalenhoef et al. [34] stated that power of a particular sample to detect an association is crucially dependent on the relative proportions of different subgroups of individuals. Therefore, if the effect of a polymorphism is greater in smokers than in non-smokers, a sample composed mainly of non-smokers will not detect the association with the study trait. In the present work, a significant interaction effect was observed between smoking status and *CART* -156A>G variant. Despite numerous reports of association between smoking and obesity-related phenotypes [35-37], this association did not survive Bonferroni correction. Although we are not able to maintain this evidence of gene-environment interaction, we are aware that as the number of variants studied

increases, larger samples are needed to have statistical power to detect significant interactions.

Previous reports have linked the *AgRP*, *MC4R* and *POMC* genes with obesity in association studies [8,9,11-13], whereas several other investigations were not able to replicate these findings [6,7,38,39] including the present study. Despite of the moderate sample size, our investigation displayed sufficient statistical power to detect differences of at least 9% on the frequencies of the risk genotypes of *AgRP* 199G>A (power=95%), *MC4R* -2745C>T (power=70%) and *POMC* 8246C>T (power=71%) on both parameters of body weight analyzed. To date these findings could not exclude a relevant role of these genes in gain weight. It is because there are several potential limitations in association studies. The complex disorders are polygenic, where the cumulative result of variants in several genes resulting from a large number of genetic variants, each one contributing with small effects. Still these disorders result from an interaction between one or more genetic variants and environmental or nongenetic disease risk factors. The linkage disequilibrium of a series of genetic markers or alleles implies that a large number of loci need to be tested to cover the chromosome region that contain these variants, and this increases the possibility of false-positive findings [40]. To decrease the risk of a spurious association, in this study, we performed the Bonferroni procedure for multiple testing corrections. Besides, testing only known functional variants has the advantage of biological plausibility and applying the control by confounding factors is another important aspect to consider a trustworthy result.

In summary, the results presented here showed evidence for the association of *CART* gene variation with central obesity phenotype in this southern Brazilian population, while the *AgRP*, *MC4R* and *POMC* genes do not seem to have an important role in the

susceptibility to excessive fat accumulation in this population. Clearly more investigations in other samples and populations with this and other SNPs at the *CART* gene, as well as more functional studies are needed to understand the genetic contribution of this gene on feeding behavior and the etiology of obesity.

## References

- [1] Bai F, Sözen MA, Lukiw WJ, Argyropoulos G. Expression of AgRP, NPY, POMC and CART in human fetal and adult hippocampus. *Neuropeptides* 2005;39:439-43.
- [2] Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 1999;19:RC5.
- [3] Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999;23:775-86.
- [4] Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411:480-4.
- [5] Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997;278:135-8.
- [6] Brown AM, Mayfield DK, Volaufova J, Argyropoulos G. The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein. *Gene* 2001;277:231-8.
- [7] Feng N, Adler-Wailes D, Elberg J, Chin JY, Fallon E, Carr A, et al. Sequence variants of the POMC gene and their associations with body composition in children. *Obes Res* 2003;11:619-24.

- [8] Baker M, Gaukrodger N, Mayosi BM, Imrie H, Farrall M, Watkins H, et al. Association between common polymorphisms of the proopiomelanocortin gene and body fat distribution: a family study. *Diabetes* 2005;54:2492-6.
- [9] Chen Y, Snieder H, Wang X, Kaviya B, McCaffrey C, Spector TD, et al. Proopiomelanocortin gene variants are associated with serum leptin and body fat in a normal female population. *Eur J Hum Genet* 2005;13:772-80.
- [10] Guérardel A, Barat-Houari M, Vasseur F, Dina C, Vatin V, Clément K, et al. Analysis of sequence variability in the CART gene in relation to obesity in a Caucasian population. *BMC Genet* 2005;6:19.
- [11] Bonilla C, Panguluri RK, Taliaferro-Smith L, Argyropoulos G, Chen G, Adeyemo AA, et al. Agouti-related protein promoter variant associated with leanness and decreased risk for diabetes in West Africans. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:715-21.
- [12] Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:529-644.
- [13] Argyropoulos G, Rankinen T, Neufeld DR, Rice T, Province MA, Leon AS, et al. A polymorphism in the human agouti-related protein is associated with late-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4198-202.
- [14] Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Hansen C, Tommerup N, Pedersen O. Sequence variants in the human cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) gene in subjects with early onset obesity. *Obes Res* 1999;7:532-6.

- [15] Douglass J, Daoud S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 1996;169:241-5.
- [16] Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, et al. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 1998;20:304-8.
- [17] Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W, Makita Z. Sequencing of the putative promoter region of the cocaine- and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:132-6.
- [18] Sutton BS, Langefeld CD, Williams AH, Norris JM, Saad MF, Haffner SM, et al. Association of proopiomelanocortin gene polymorphisms with obesity in the IRAS family study. *Obes Res* 2005;13:1491-8.
- [19] Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 1998;20:113-4.
- [20] Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, et al. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1483-6.
- [21] Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, et al. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 2000;106:271-9.



- [22] Valli-Jaakola K, Lipsanen-Nyman M, Oksanen L, Hollenberg AN, Kontula K, Bjørbaek C, et al. Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese finnish children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:940-5.
- [23] Loos RJ, Rankinen T, Tremblay A, Pérusse L, Chagnon Y, Bouchard C. Melanocortin-4 receptor gene and physical activity in the Québec Family Study. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:420-8.
- [24] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
- [25] World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. World Health Organization, Geneva; 1995.
- [26] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000;894:1-253.
- [27] Han TS, Bijnen FC, Lean ME, Seidell JC. Separate associations of waist and hip circumference with lifestyle factors. *Int J Epidemiol* 1998;27:422-30.
- [28] Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
- [29] Hixson JE, Almasy L, Cole S, Birnbaum S, Mitchell BD, Mahaney MC, et al. Normal variation in leptin levels is associated with polymorphisms in the proopiomelanocortin gene, POMC. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3187-91.

- [30] Johansen JE, Broberger C, Lavebratt C, Johansson C, Kuhar MJ, Hökfelt T, et al. Hypothalamic CART and serum leptin levels are reduced in the anorectic (anx/anx) mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;84:97-105.
- [31] Robson AJ, Rousseau K, Loudon AS, Ebling FJ. Cocaine and amphetamine-regulated transcript mRNA regulation in the hypothalamus in lean and obese rodents. *J Neuroendocrinol* 2002;14:697-709.
- [32] Wortley KE, Chang GQ, Davydova Z, Fried SK, Leibowitz SF. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. *Regul Pept* 2004;117:89-99.
- [33] Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Kuhar MJ. CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:454-9.
- [34] Stalenhoef AF, Aalto-Setälä K, Armstrong VW, Benlian P, Dieplinger H, Humphries S, et al. The 19th annual meeting of the European Lipoprotein Club. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2316-25.
- [35] Han TS, Bijnen FC, Lean ME, Seidell JC. Separate associations of waist and hip circumference with lifestyle factors. *Int J Epidemiol* 1998;27:422-30.
- [36] Visser M, Launer LJ, Deurenberg P, Deeg DJ. Past and current smoking in relation to body fat distribution in older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999;54:M293-8.
- [37] Fiegenbaum M, Hutz MH. Further evidence for the association between obesity-related traits and the apolipoprotein A-IV gene. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:484-90.

- [38] Delplanque J, Barat-Houari M, Dina C, Gallina P, Clément K, Guy-Grand B, et al. Linkage and association studies between the proopiomelanocortin (POMC) gene and obesity in caucasian families. *Diabetologia* 2000;43:1554-7.
- [39] van Rossum CT, Pijl H, Adan RA, Hoebee B, Seidell JC. Polymorphisms in the NPY and AGRP genes and body fatness in Dutch adults. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:1522-8. Epub 2006 Mar 28.
- [40] Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet* 2004;75:353-62. Epub 2004 Jul 22.

Table 1: Characteristics of 756 individuals investigated (continuous data are expressed as mean  $\pm$  SD)

	All	Women	Men	P-value*
n	756	447	309	
Age (years) <sup>a</sup>	44.1 $\pm$ 15.1	42.8 $\pm$ 15.6	46.0 $\pm$ 14.3	0.004
Weight (kg) <sup>a</sup>	70.5 $\pm$ 14.3	65.9 $\pm$ 13.2	77.0 $\pm$ 13.3	<0.0001
Height (cm) <sup>a</sup>	163.4 $\pm$ 9.1	158.4 $\pm$ 6.9	170.6 $\pm$ 6.9	<0.0001
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	26.4 $\pm$ 4.8	26.3 $\pm$ 5.1	26.5 $\pm$ 4.3	0.596
Waist to hip ratio (cm) <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.08	0.85 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.10	<0.0001
Waist circumference (cm) <sup>a</sup>	91.4 $\pm$ 12.4	88.7 $\pm$ 12.5	95.4 $\pm$ 11.1	<0.0001
Physically inactive (%) <sup>b</sup>	56.7	66.0	43.4	<0.0001
Current smokers (%) <sup>b</sup>	36.9	34.5	40.5	0.107
BMI classification (%) <sup>b</sup>				
BMI<25	42.6	45.2	38.8	
25 $\leq$ BMI<30	36.9	33.3	42.1	0.049
BMI $\geq$ 30	20.5	21.5	19.1	

\* Female vs male subjects

<sup>a</sup> Unpaired *t*-test

<sup>b</sup> Chi-Square ( $\chi^2$ ) test

Table 2: Genotype and allele frequencies of *AgRP* 199G>A, *CART* -156A>G, *MC4R* -2745C>T and *POMC* 8246C>T gene variants in normal-weight (BMI <25; n=322) and obese plus overweight (BMI ≥25; n=434) individuals, and in without obesity (WHR ≤0.95 in men and WHR ≤0.80 in women; n=310) and with central obesity (WHR >0.95 in men and WHR >0.80 in women; n=446) individuals

Genotypes	BMI					WHR				
	Normal weight	Obese + overweight	Alleles	Normal weight	Obese + overweight	Without central obesity	With central obesity	Alleles	Without central obesity	With central obesity
<i>AgRP</i> 199 G>A										
A/A + A/G	0.08	0.095	A	0.04	0.05	0.093	0.087	A	0.05	0.05
G/G	0.92	0.905	G	0.96	0.95	0.907	0.913	G	0.95	0.95
P-value <sup>a</sup>	0.515			1.0		0.793			1.0	
<i>CART</i> -156 A>G										
A/A + A/G	0.671	0.677	A	0.45	0.44	0.738	0.631	A	0.48	0.42
G/G	0.329	0.323	G	0.55	0.56	0.262	0.369	G	0.52	0.58
P-value <sup>a</sup>	0.875			1.0		0.003			0.48	
<i>MC4R</i> -2745C>T										
C/C	0.646	0.634	C	0.81	0.79	0.62	0.652	C	0.79	0.81
C/T + T/T	0.354	0.366	T	0.19	0.21	0.38	0.348	T	0.21	0.19
P-value <sup>a</sup>	0.754			0.86		0.431			0.86	
<i>POMC</i> 8246C>T										
C/C	0.675	0.639	C	0.83	0.80	0.667	0.645	C	0.82	0.80
C/T + T/T	0.325	0.361	T	0.17	0.20	0.333	0.355	T	0.18	0.20
P-value <sup>a</sup>	0.331			0.72		0.569			0.86	

<sup>a</sup>  $\chi^2$ - test between genotype and allele frequencies – Dominant model

Table 3: Binomial multiple logistic regression of BMI (overweight plus obese) and WHR (central obesity) with *CART* -156A>G genotypes and other potential confounders

Variables	BMI (overweight plus obese)			WHR (central obesity)		
	OR	CI 95%	P-value	OR	CI 95%	P-value
<i>CART</i> -156A>G	0.93	0.67-1.28	0.645	2.0	1.25-3.20	0.004
Age (years)	1.03	1.02-1.04	0.00001	1.05	1.03-1.06	0.00001
Smoke	0.85	0.62-1.15	0.287	1.45	0.95-2.21	0.087
Physical activity	0.94	0.69-1.29	0.714	1.61	1.14-2.27	0.007
Gender	1.20	0.87-1.64	0.268	0.15	0.10-0.22	0.00001
<i>CART</i> * Smoke	-	-	-	0.40	0.19-0.86	0.018

Genotypes: AA + AG = 0; GG = 1

Smoke: no = 0; yes = 1

Physical activity: no = 0; yes = 1

Gender: female = 0; male = 1

Capítulo IV

**The reward system and obesity: the D2 receptor is associated with  
central obesity in an age-dependent way**

---

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista Human Genetics

# The reward system and obesity: the D2 receptor is associated with central obesity in an age-dependent way

Janaína P. Jaeger<sup>1</sup>, Vanessa S. Mattevi<sup>2</sup>, Sidia M. Callegari-Jacques<sup>1,3</sup>, Mara H. Hutz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91509-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding author

**Abstract.** Obesity arises as a result of a chronic disruption of energy balance, and its prevalence has increased dramatically in the past 10 years. Several lines of research indicate that abnormal dopaminergic neurotransmission could be involved in pathophysiological processes leading to obesity. The present study sought to verify if four functional variants in the *DRD2*, *COMT* and *MAOA* genes influenced the risk of obesity in 756 individuals of European descent in the Brazilian population. The *MAOA* u-VNTR and *DRD2* Taq1A gene variants showed no association with any analyzed parameter. The *COMT* 158Met allele was associated with increased body mass index (BMI) (OR=1.4; P=0.036). However, the main evidence for association was observed with the *DRD2* -141C *Del* allele and waist-to-hip ratio (WHR), where the presence of the deletion allele increased the risk of central obesity in older individuals of this population (OR=1.04; P=0.009). This result suggests that the gene variant might influence central obesity through the dopaminergic reward pathway in an age-dependent way and, therefore, supports the indication that dopamine bioavailability is involved in human obesity.

**Keywords:** obesity, *DRD2*, polymorphisms, age-dependent association, WHR

## Address to which proofs should be sent

Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Instituto de Biociências, UFRGS  
Caixa Postal 15053  
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel 55 51 3308-6720  
Fax 55 51 3343-5850  
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br



## **Introduction**

Obesity results from a chronic imbalance between energy intake and energy expenditure. Its prevalence has been steadily increasing during recent years and this trend is particularly pronounced in children and adolescents (Mokdad et al. 2001; Styne 2001). Indeed, obesity has reached epidemic proportions in many developed and transitional countries and has become a serious health problem in these regions. Environmental factors, such as the increased availability of high caloric food and decreased physical activity, contribute to its development. However, these environmental factors cannot totally explain a person's susceptibility to developing the disorder. A role for genetic predisposition to obesity has been observed (van Rossum et al. 2002; Loktionov 2003), with heritability estimates in adults ranging from 55% to 85% (Bulik et al. 2003; Schousboe et al. 2003, Romeis et al. 2004; Malis et al. 2005). Although the molecular mechanisms involved in the regulation of energy balance have been extensively studied in recent years, our understanding of the precise organization and hierarchy of regulatory networks is far from complete.

Rare forms of obesity caused by defects in energy homeostasis regulatory mechanisms operating in the brain have been described in animals and humans (Schwartz et al. 2000). However, eating is as much a means of achieving energy balance as it is a form of pleasure and reward. This makes the drive to eat one of the most powerful urges of animal and human behavior (Del Parigi et al. 2003). Food is the most common and natural source of pleasure in everyday life, and the neurophysiology of reward in humans has been extensively studied in the context of drug abuse (Volkow and Fowler 2000), but little is

known about how the human brain specifically processes food reward. As with a variety of reinforcing substances, such as alcohol and other abused drugs, the ingestion of food can produce pleasure. Despite limited knowledge about the reinforcing properties of these substances, there is general agreement that they are manifested in the dopaminergic reward pathways of the brain (Wise and Rompre 1989; Saper et al. 2002; Schultz 2002).

Multiple aspects of food intake, including food selection, satiety, and energy expenditure, could be modulated by changes in central dopaminergic transmission (Berthoud 2002; Kelley 2004). Several lines of research indicate that abnormal dopaminergic neurotransmission could be involved in the pathophysiological process leading to obesity. Food consumption increases brain dopamine levels in both animals and humans (Hernandez and Hoebel 1988, 1990; Small et al. 2003), and the dopamine release correlates with the degree of pleasure experienced from eating (Small et al. 2003). The central effects of dopamine are mediated by five subtypes of dopamine receptors that are primarily involved in the control of movement, pleasure/reward, and neuroendocrine regulation of the pituitary gland (Baik et al. 1995; Kandel 2000). The receptor most convincingly associated with energy balance is the dopamine receptor subtype 2 (*DRD2*) (Baptista 1999; Jenkinson et al. 2000; Tataranni et al. 2001). In fact, obese people have significantly lower dopamine D2 receptor availability relative to lean individuals, and the receptor availability in obese people decreases in inverse proportion to their body mass index (BMI) (Wang et al. 2001). As in humans, dopamine levels and D2 receptor expression are reduced in obese rats compared to lean rats (Orosco et al. 1996; Fetissov et al. 2002). Dopamine activity is related both to the density of dopamine receptors and to the amount of the enzymes involved in its metabolism. Thus, one way to indirectly study

individual differences in brain dopamine levels is by studying polymorphisms in dopamine receptors and dopamine-metabolizing enzyme genes.

Catechol-O-methyltransferase (*COMT*) is an important modulator in the catabolism of extraneural dopamine since it is the only dopamine-metabolizing enzyme that can act on extracellular dopamine. In addition, monoamine oxidase A (*MAOA*) is a flavin-containing mitochondrial enzyme that catalyzes the degradation of several different biological amines, including the neurotransmitter dopamine. In both man and rat, the activity of *MAOA* is higher intraneuronally than extraneuronally. This enzyme is located in intraneuronal mitochondria, and is only able to deaminate the dopamine that has been taken back up into the dopaminergic synaptosomes by its transporter (Fowler et al. 1984). Due to a well-established relationship between catecholamines and food intake control (Halford et al. 2004), these enzyme activities may influence the bioavailability of catecholamines and thereby influence weight gain and/or fat distribution.

Several genetic studies have shown an association of dopamine-related genes with obesity. While some studies reported significant associations of *DRD2* polymorphisms with weight gain (Comings et al. 1993; Noble et al. 1994; Jenkinson et al. 2000; Spitz et al. 2000; Thomas et al. 2000; Hutz et al. 2003), at least two failed to confirm these associations (Southon et al. 2003; Zhang et al. 2003). The *DRD2* TaqIA (rs1800497) polymorphism is associated with dopamine D2 receptor density and plays an important role in the context of reward behavior. Individuals carrying the A1 allele are more likely to be obese than those without this allele (Blum et al. 1996; Spitz et al. 2000, Tataranni et al. 2001). Furthermore, the presence of the TaqI A1 allele has been associated with a 30%-40% reduction in the density of the D2 receptor and weaker dopamine signaling (Pohjalainen et al. 1998; Jönsson et al. 1999; Ritchie and Noble 2003). Moreover, Arinami

et al. (1997) found a functional polymorphism in the 5'-flanking region of the D2 receptor gene designated as -141C *Ins/Del*. The promoter activity, as determined by luciferase assay of a plasmid containing the -141C *Del* allele, was 21%-43% of the activity assayed with the plasmid containing the -141C *Ins* allele. This result showed that the -141C *Ins* allele may, in part, lead to increased D2 receptor expression in the dorsal striatum. Although studies have pointed out the relevance of this polymorphism in psychiatric disorders and drug dependence (Arinami et al. 1997; Ohara et al. 1998; Konishi et al. 2004; Johann et al. 2005), no association studies between this gene variant and obesity have so far been performed in humans.

Different polymorphisms in the structural and regulatory regions of the COMT and MAOA genes have been shown to exert an influence on its transcriptional activities. The G158A (rs4680) transition in the fourth exon of the *COMT* gene leads to an amino acid change (valine to methionine) that is directly associated with changes in the activity of its enzyme. The Met (A) allele confers low activity of the enzyme, resulting in a 3- to 4-fold reduction in *COMT* enzyme activity as compared with the Val (G) allele (Lachman et al. 1996). The polymorphism, which is located 1.2 kb upstream of the MAOA coding sequence, consists of a 30-bp variable tandem repeat (VNTR) sequence present in 2, 3, 3.5, 4, or 5 copies. Alleles with 3.5 or 4 repeats were reported to present 2- to 10-fold more efficient transcription than alleles containing 3 repeats (Sabol et al. 1998). The activities of the 2- and 5-repeat alleles are still unclear because reports have presented discrepant results (Sabol et al. 1998; Deckert et al. 1999). Two previous reports described an excess of the low-activity allele in obese subjects when compared to non-obese subjects (Camarena et al. 2004; Need et al. 2006). Recently, Fuemmeler et al. (2008) revealed an association between this polymorphism and categories of BMI among men.

It is well known that dopamine availability is controlled largely by its receptor *DRD2* and by the two enzymes discussed earlier, *COMT* and *MAOA*. Considering that the genes for each of these contains a functional polymorphism that affects its expression and/or activity in the brain, the main objective of this study was to evaluate the relationship between these gene variants and obesity-related traits in a Brazilian population of European descent.

## **Materials and Methods**

The study was carried out on 756 individuals of European descent from the southernmost state of Brazil. The sample investigated was fully described elsewhere (Jaeger et al. 2008). Briefly, this cohort consisted of 447 women and 309 men who gave their written, informed consent prior to the investigation. Individuals without the presence of a particular disease, such as diabetes and thyroid disease, were recruited for this study and completed a questionnaire that asked about medicine intake, smoking habits, alcohol consumption, regular physical activity in leisure time, oral contraceptive usage, and menopausal status. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Obesity was evaluated through body mass index (BMI) and waist-to-hip ratio (WHR). Measurements of BMI were taken by dividing the weight in kilograms by height in meters squared ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Waist circumference was measured at mid-level between the lower rib margin and the iliac crest (World Health Organization 1995), and hip circumference was

measured at the widest trochanters to the nearest mm, allowing assessment of WHR. According to the World Health Organization's criteria (World Health Organization 2000), overweight was defined for a BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> and obesity for a BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Central obesity was determined for waist-to-hip ratio (WHR) over 0.95 in men and 0.80 in women (Han et al. 1998).

Total genomic DNA was extracted from whole-blood samples using a salting out method (Lahiri and Nurnberger 1991). Genotyping was performed using direct PCR or PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses. The primer sequences and restriction enzymes used to assay the *DRD2* TaqIA, *DRD2* -141C *Ins/Del*, *COMT* Val158Met and *MAOA* u-VNTR gene variants, as well as the minor allele frequencies of these polymorphisms, are described in Table 1. The amplicons were sized by electrophoresis in agarose or polyacrylamide gels stained with ethidium bromide.

The statistical analyses were performed using the SPSS® 13.0.0 package. A  $\chi^2$  likelihood ratio test was used to assess whether the observed genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. Genotype frequencies were compared between groups of BMI and WHR using the chi-squared ratios calculated under a dominant model. Association between the gene markers and the phenotypes were analyzed using the multiple logistic regression model. Both qualitative BMI and WHR were entered as dependent variables and age, physical activity, smoking habits, alcohol consumption, and gender as covariates. Age was included as a continuous variable and lifestyle factors as dichotomic variables. As the *MAOA* u-VNTR is located in the X chromosome, only the analysis for this gene variant was separated by sex. In women, hormone intake and menopausal status were initially considered in the analysis. Individuals who presented the 2- and/or 5-repeat alleles

were excluded from the analysis due to the undefined activity of these variants. Possible gene-by-covariate interactions were tested for all SNPs by including the interaction terms in the regression model. The linkage disequilibrium between polymorphisms located in the *DRD2* gene was estimated using the Multiple Locus Haplotype Analysis (version 2.0) (Long et al. 1995). Threshold two-sided p-values for significance were 0.05. Bonferroni correction for multiparametric testing was applied when appropriated.

## Results

The phenotypic characteristics of the 756 subjects are shown in Table 2. The physical activity, smoking status, and alcohol consumption were not different between normal-weight (controls) and obese and overweight (cases) individuals for either gender. As expected, the means of weight, BMI, WHR, and waist circumference were significantly higher in cases when compared with controls in male and female subjects ( $P < 0.0001$ ). In addition, female cases presented a higher frequency of menopausal status ( $P = 0.007$ ) which is possibly due to the greater age ( $P < 0.0001$ ) in this same group. Hormone consumption was significantly more frequent in controls than in cases ( $P = 0.001$ ) since oral contraceptive usage is higher in younger women.

Genotype frequencies for the four polymorphisms considered here are distributed in qualitative BMI and WHR groups, as shown in Table 3. The analyses were performed according to a dominant model due to the low frequency of homozygous individuals for the rare allele in all gene variants. In the MAOA u-VNTR, the variants were grouped according

to their function. The alleles of 3.5 and 4 repeats were pooled together and codified as high activity alleles (H) and the 3-repeat alleles were codified as low activity alleles (L). As a result, a higher frequency of the *COMT* 158Met allele was observed in overweight and obese individuals ( $\chi^2=4.82$ ;  $P=0.029$ ) in the first instance but not after the Bonferroni correction ( $P=0.016$ ). Additionally, the presence of at least one copy of the *DRD2*-141C *Del* allele was protective against abdominal obesity ( $\chi^2=4.838$ ;  $P=0.029$ ), although this significance also did not survive the Bonferroni correction ( $P=0.116$ ). None of the other gene variants were different between group in BMI or WHR. The genotypic distributions of all polymorphisms were in agreement ( $P>0.05$ ) with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

To control all polymorphisms by confounders, multiple logistic regression analyses were performed. As neither variant in the *DRD2* gene was in linkage disequilibrium ( $D'=0.028$ ;  $P=0.822$ ), all SNPs were analyzed independently, and gene-by-confounder interactions were tested for both BMI and WHR. In accordance with the chi-square analysis, an initial statistically significant association was found between the *COMT* 158Met allele and BMI (OR=1.4;  $P=0.036$ ;  $P=0.144$  after Bonferroni correction) (Table 4a). Otherwise, the *DRD2* -141C *Del* allele had the strongest evidence of association. Only the interaction term *DRD2*\*Age for the -141C *Ins/Del* polymorphism was statistically significant (OR=1.04;  $P=0.009$ ;  $P=0.036$  after Bonferroni correction) (Table 4b), showing that, in the presence of the deletion allele, the risk of central obesity is higher in older individuals than in younger. This same result is represented graphically in Fig. 1. Overall, the deletion allele was associated with lower waist-to-hip ratios until age ~50; then, it became directly associated with central obesity, suggesting that its protective effect may



only apply in early ages. As in univariate analyses, no associations were observed between *DRD2* TaqIA and *MAOA* u-VNTR gene polymorphisms and the obesity phenotypes investigated when controlling for covariates (data not shown).

## **Discussion**

Few studies have investigated the genetic background of the dopaminergic reward system associated with obesity-related traits. This study sought to investigate if four polymorphisms in the *COMT*, *DRD2* and *MAOA* genes were associated with BMI and central obesity in a Southern Brazilian population of European descent. The *COMT* Val158Met variant was associated with increased BMI, although the significance did not survive the correction for multiple comparisons. However, the main evidence of association occurred between the *DRD2* -141C *Del* allele and WHR, where older individuals presented a higher risk of developing central obesity than younger individuals with the same deletion allele. These results suggest that this gene variant might influence central obesity through the dopaminergic reward pathway in an age-dependent way. The *MAOA* u-VNTR and *DRD2* Taq1A gene variants showed no association with either analyzed parameter.

Despite the fundamental role played by the *COMT* gene in modulating the catabolism of extraneural dopamine, the scarce number of studies associating this gene with obesity has given discrepant results (Hong et al. 2003; Need et al. 2006; Wang et al. 2007; Annerbrink et al. 2008). In this study, we found that the *COMT* 158Met allele was somewhat more frequent in overweight/obese individuals than in normal weight

individuals, but that this association was lost after further adjustment for multiple tests. Hong et al. (2003) reported a significant association between this polymorphism and BMI in premenopausal women, although it disappeared after adjustment for serum growth factors. In contrast, Need et al. (2006) showed that the genotype frequencies for this gene variant were not different between obese and non-obese British women. Additionally, Annerbrink and coworkers found that the low-activity allele (Met) was associated with WHR and abdominal sagittal diameter but not with BMI in a middle-aged male Swedish population (Annerbrink et al. 2008). It should, however, be taken into consideration that our cohort was considerably larger than theirs was, and was comprised of both sexes and subjects of different ages. Moreover, the associations reported elsewhere seem to correspond to a certain age segment of a specific gender only. While our results were in line with a previous study in women (Hong et al. 2003), the association between this polymorphism and BMI was in contrast to other previous findings. Studies from different laboratories yield associations in different directions. This is not uncommon when a polymorphism is repeatedly found to be associated with a certain phenotype. Furthermore, it could be the consequence of other gene variants influencing how the polymorphism in question influences the trait of interest.

Several investigations suggest that the *DRD2* polymorphisms might influence obesity through the dopaminergic reward pathway (Comings et al. 1993; Noble et al. 1994; Jenkinson et al. 2000; Spitz et al. 2000; Thomas et al. 2000; Hutz et al. 2003). Stimulation of this pathway may reduce the effectiveness of satiety factors, promoting overeating and leading to obesity (Hoebel 1985; Wise and Rompre 1989). Our findings extend these considerations, implicating the *DRD2* -141C *Del* allele in central obesity. This result reflects a greater increase in central obesity in the presence of the *Del* allele at older ages

than at younger ages. The age-dependent genetic effects for obesity-related traits have been suggested in previous studies (Argyropoulos et al. 2002; Gorlova et al. 2003). Recently, Lasky-Su et al. (2008) identified an age-varying genetic association between obesity and an SNP (rs1455832) in the roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (*ROBO1*) gene in the Framingham Heart Study (FHS) population. They hypothesized that there may be a gene-age interaction where the CC genotype was associated with increased BMI until age 45, when this effect was diminished. From the same work, this association was replicated in five of the eight study samples, reinforcing the evidence of an age-dependent genetic effect. Additionally, Dreher et al. (2008) were among the first to demonstrate differences in dopamine–reward relationships between older and younger human adults. They found that dopamine acts positively after tasks eliciting a reward mechanism in youth but negatively in aged subjects. This could explain why the -141C *Del* allele decreases the risk of central obesity in younger subjects even when the presence of this variant is thought to confer low bioavailability of the D2 receptor and induce obesity.

It has been postulated that obese individuals have a hypofunctioning reward circuit that leads them to gain weight in order to compensate for a hypofunctioning dopamine reward system (Wang et al. 2002). A recent report supported this hypothesis, particularly that those individuals who presented genetic polymorphisms are thought to attenuate dopamine signaling in this region (Stice et al. 2008). This study provided evidence that the negative relation between striatal response to food receipt and BMI was significantly stronger in individuals who presented the *DRD2* TaqI A1 allele, presumably because these individuals had reduced dopamine signaling capacity in the striatum. Although *DRD2* TaqIA and *MAOA* u-VNTR variants have been associated with obesity in different populations (Comings et al. 1993; Noble et al. 1994; Spitz et al. 2000; Thomas et al. 2000;

Hutz et al. 2003; Camarena et al. 2004; Need et al. 2006; Fuemmeler et al. 2008), no differences were detected in genotype frequencies between the different BMI and WHR groups in our population. However, despite the moderate sample size, our investigation displayed sufficient statistical power to detect differences of at least 9% in the frequencies of the risk genotypes of *DRD2* TaqIA (power=70%), *MAOA* u-VNTR (power=99%) in women, and *MAOA* u-VNTR (power=73%) in men of both analyzed parameters of body weight.

It is reasonable to be aware that our study has limitations that require consideration. First, this preliminary investigation is a cross-sectional study, involving groups of participants of different ages at the same point in time. Thus, a longitudinal study would be required to confirm the observed time-dependent association once this design provides the best information about the continuity or discontinuity of weight gain over time. Second, polygenic traits and physiologic and environmental differences that affect individuals, such as anxiety and diet, can also produce heterogeneous results. To reduce these differences, we controlled all polymorphisms for confounding factors, such as alcohol and smoking habits, that are known to exert influence on weight gain. However, given the complex array of metabolic systems that are implicated in the development of obesity and the probable small genetic effects determined by associated genes, the fact that the present work was a population-based study controlled for confounders can be regarded as a strength. In this sense, it was not restricted to a specific phenotypic range, and the phenotyped cases and controls were provided from the same source population. This is an ideal design to identify multiple genes of relatively small effect and to evaluate effects from interactions in association studies. When the samples are ascertained by case-control status, the effects

from interactions could be missed due to diminished phenotypic variation (Lasky-Su et al. 2008).

The number of polymorphisms associated with obesity has increased quickly, making replication imperative to validate these associations. This study could be characterized as exploratory and suggests an effect of a candidate SNP in central obesity. It is particularly important to replicate these findings to confirm the results in other independent studies. The aim is to elucidate the complex mechanism underlying obesity. Additionally, the objective of the replication study is the assessment of whether the age-varying effect observed in our specific population could be generalized to other samples. To our knowledge, this is the first study describing an association between the *DRD2* - 141C *Ins/Del* variant and obesity. Therefore, it is important to keep in mind that functional testing is required for a better understanding of the role of this promoter SNP on transcriptional activity of the gene. Replication studies in other general populations are obviously needed.

## **Acknowledgments**

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We are also grateful to Fabiana M Andrade, Marilu Fiegenbaum, Silvana de Almeida and Marcel Arsand for help in sample collection.

## References

- Annerbrink K, Westberg L, Nilsson S, Rosmond R, Holm G, Eriksson E (2008) Catechol O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Metabolism* 57:708-711.
- Argyropoulos G, Rankinen T, Neufeld DR et al (2002) A polymorphism in the human agouti-related protein is associated with late-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4198-4202.
- Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M (1997) A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 6:577-582.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A et al (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377:424-428.
- Baptista T (1999) Body weight gain induced by antipsychotic drugs: mechanisms and management. *Acta Psychiatr Scand* 100:3-16.
- Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26:393-428.
- Blum K, Braverman ER, Wood RC (1996) Increased prevalence of the Taq I A1 allele of the dopamine receptor gene (DRD2) in obesity with comorbid substance use disorder: a preliminary report. *Pharmacogenetics* 6:297-305.
- Bulik CM, Sullivan PF, Kendler KS (2003) Genetic and environmental contributions to obesity and binge eating. *Int J Eat Disord* 33:293-298.
- Camarena B, Santiago H, Aguilar A, Ruvinskis E, González-Barranco J, Nicolini H (2004) Family-based association study between the monoamine oxidase A gene and obesity: implications for psychopharmacogenetic studies. *Neuropsychobiology* 49:126-129.

- Comings DE, Flanagan SD, Dietz G, Muhleman D, Knell E, Gysin R (1993) The dopamine D2 receptor (DRD2) as a major gene in obesity and height. *Biochem Med Metab Biol* 50:176-185.
- Deckert J, Catalano M, Syagailo YV et al (1999) Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 8: 621-624.
- Del Parigi A, Chen K, Salbe AD, Reiman EM, Tataranni PA (2003) Are we addicted to food? *Obes Res* 11:493-495.
- Dreher JC, Meyer-Lindenberg A, Kohn P, Berman KF (2008) Age-related changes in midbrain dopaminergic regulation of the human reward system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15106-15111.
- Fetissov SO, Meguid MM, Sato T, Zhang LH (2002) Expression of dopaminergic receptors in the hypothalamus of lean and obese Zucker rats and food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R905-R910.
- Fowler CJ, Magnusson O, Ross SB (1984) Intra- and extraneuronal monoamine oxidase. *Blood Vessels* 21:126-131.
- Fuemmeler BF, Agurs-Collins TD, McClernon FJ et al (2008) Genes implicated in serotonergic and dopaminergic functioning predict BMI categories. *Obesity (Silver Spring)* 16:348-355.
- Gorlova OY, Amos CI, Wang NW, Shete S, Turner ST, Boerwinkle E (2003) Genetic linkage and imprinting effects on body mass index in children and young adults. *Eur J Hum Genet* 11:425-432.
- Halford JC, Cooper GD, Dovey TM (2004) The pharmacology of human appetite expression. *Curr Drug Targets* 5:221-240.
- Han TS, Bijnen FC, Lean ME, Seidell JC (1998) Separate associations of waist and hip circumference with lifestyle factors. *Int J Epidemiol* 27:422-430.
- Hernandez L, Hoebel BG (1988) Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. *Physiol Behav* 44:599-606.



- Hernandez L, Hoebel BG (1990) Feeding can enhance dopamine turnover in the prefrontal cortex. *Brain Res Bull* 25:975–979.
- Hoebel BG (1985) Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am J Clin Nutr* 42:1133-1150.
- Hong CC, Thompson HJ, Jiang C et al (2003) Val158Met Polymorphism in catechol-O-methyltransferase gene associated with risk factors for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:838-847.
- Hutz MH, Mattevi VS, Almeida S, Zembrzuski VM, Salzano FM (2003) Association of the dopamine D2 receptor gene with obesity in native Brazilians. In: Medeiros-Neto G, Halpern A, Bouchard C (eds) *Progress in Obesity Research*: 9, Eastleigh, UK, pp 370-372.
- Jaeger JP, Mattevi VS, Callegari-Jacques SM, Hutz MH (2008) Cannabinoid type-1 receptor gene polymorphisms are associated with central obesity in a Southern Brazilian population. *Dis Markers* 25:67-74.
- Jenkinson CP, Hanson R, Cray K et al (2000) Association of dopamine D2 receptor polymorphisms Ser311Cys and TaqIA with obesity or type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1233-1238.
- Johann M, Putzhammer A, Eichhammer P, Wodarz N (2005) Association of the -141C Del variant of the dopamine D2 receptor (DRD2) with positive family history and suicidality in German alcoholics. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132B:46-49.
- Jönsson EG, Nöthen MM, Grünhage F et al (1999) Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 4:290-296.
- Kandel ER (2000) Disorders of thought and volition: schizophrenia. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, New York, pp 1188–1208.
- Kelley AE (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev* 27:765-776.

- Konishi T, Calvillo M, Leng AS, Lin KM, Wan YJ (2004) Polymorphisms of the dopamine D2 receptor, serotonin transporter, and GABA(A) receptor beta(3) subunit genes and alcoholism in Mexican-Americans. *Alcohol* 32:45-52.
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6:243-250.
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lasky-Su J, Lyon HN, Emilsson V (2008) On the replication of genetic associations: timing can be everything! *Am J Hum Genet* 82:849-858.
- Loktionov A (2003) Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases (review). *J Nutr Biochem* 14:426-451.
- Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799-810.
- Malis C, Rasmussen EL, Poulsen P et al (2005) Total and regional fat distribution is strongly influenced by genetic factors in young and elderly twins. *Obes Res* 13:2139-2145.
- Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP (2001) The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 286:1195-1200.
- Need AC, Ahmadi KR, Spector TD, Goldstein DB (2006) Obesity is associated with genetic variants that alter dopamine availability. *Ann Hum Genet* 70:293-303.
- Noble EP, Noble RE, Ritchie T et al (1994) D2 dopamine receptor gene and obesity. *Int J Eat Disord* 15:205-217.
- Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K (1998) Functional polymorphism of -141C Ins/Del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry Res* 81:117-123.

- Orosco M, Rouch C, Nicolaïdis S (1996) Rostromedial hypothalamic monoamine changes in response to intravenous infusions of insulin and glucose in freely feeding obese Zucker rats: a microdialysis study. *Appetite* 26:1-20.
- Pohjalainen T, Rinne JO, Någren K (1998) The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 3:256-260.
- Ritchie T, Noble EP (2003) Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. *Neurochem Res* 28:73-82.
- Romeis JC, Grant JD, Knopik VS, Pedersen NL, Heath AC (2004) The genetics of middle-age spread in middle-class males. *Twin Res* 7:596-602.
- Sabol SZ, Hu S, Hamer D (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 103: 273-279.
- Saper C, Chou T, Elmquist J (2002) The need to feed. Homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36:199–211.
- Schousboe K, Willemsen G, Kyvik KO et al (2003) Sex differences in heritability of BMI: a comparative study of results from twin studies in eight countries. *Twin Res* 6:409-421.
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36:241–263.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671.
- Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A (2003) Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage* 19:1709–1715.
- Southon A, Walder K, Sanigorski AM et al (2003) The Taq IA and Ser311 Cys polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and obesity. *Diabetes Nutr Metab* 16:72-76.
- Spitz MR, Detry MA, Pillow P, et al (2000) Variant alleles of the D2 dopamine receptor gene and obesity. *Nutr Res* 20:371-380.

- Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM (2008) Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science* 322:449-452.
- Styne DM (2001) Childhood and adolescent obesity. Prevalence and significance. *Pediatr Clin North Am* 48:823-854, vii.
- Tataranni PA, Baier L, Jenkinson C, Harper I, Del Parigi A, Bogardus C (2001) A Ser311Cys mutation in the human dopamine receptor D2 gene is associated with reduced energy expenditure. *Diabetes* 50:901-904.
- Thomas GN, Tomlinson B, Critchley JA (2000) Modulation of blood pressure and obesity with the dopamine D2 receptor gene TaqI polymorphism. *Hypertension* 36:177-182.
- van Rossum CT, Hoebee B, Seidell JC (2002) Genetic factors as predictors of weight gain in young adult Dutch men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:517-528.
- Volkow ND, Fowler JS (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 10:318-325.
- Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS (2002) The role of dopamine in motivation for food in humans: implications for obesity. *Expert Opin Ther Targets* 6:601-609.
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J et al (2001) Brain dopamine and obesity. *Lancet* 357:354-357.
- Wang SS, Morton LM, Bergen AW et al (2007) Genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT) and obesity in the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cancer screening trial. *Hum Genet* 122:41-49.
- Wise RA, Rompre PP (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* 40:191-225.
- World Health Organization (1995) *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization (2000) *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser 894:1-253.

Zhang ZJ, Yao ZJ, Zhang XB et al (2003) No association of antipsychotic agent-induced weight gain with a DA receptor gene polymorphism and therapeutic response. *Acta Pharmacol Sin* 24:235-240.

**Table 1** Polymorphisms investigated, genotyping procedures and minor allele frequencies (MAF)

Gene	dbSNP ID	Primers	Restriction Enzyme	Alleles	MAF (%)
<i>DRD2</i>	rs1800497	5'CCGTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA3' 5'CCGTCGACCCTTCCTGACTGTCATCA3'	TaqI	T (A1)	24.3
<i>DRD2</i>	rs1799732	5'ACTGGCGAGCAGACGGTGAGGACCC3' 5'TGCGCGCGTGAGGCTGCCGGTTCGG3'	MvaI	<i>Del</i> (-)	12.3
<i>COMT</i>	rs4680	5'TCGTGGACGCCGTGATTCAGG3' 5'AGGTCTGACAACGGGTCAGGC3'	Hsp92II	Met (A)	40.9
<i>MAOA</i>	u-VNTR	5'ACAGCCTGACCGTGGAGAAG3' 5'GAACGGACGCTCCATTCGGA3'	-	Low activity (L)	38.9

**Table 2** Study population characteristics (data are mean  $\pm$  SD)

Variables	Women			Men		
	Controls (n=202)	Cases (n=245)	P-value	Controls (n=120)	Cases (n=189)	P-value
Age (years) <sup>a</sup>	39.2 $\pm$ 15.0	45.7 $\pm$ 15.4	<0.0001	43.5 $\pm$ 15.5	47.6 $\pm$ 13.4	0.014
Weight (kg) <sup>a</sup>	56.0 $\pm$ 6.7	74.1 $\pm$ 11.4	<0.0001	66.1 $\pm$ 7.5	84.0 $\pm$ 11.4	<0.0001
Height (cm) <sup>a</sup>	159.1 $\pm$ 7.1	157.8 $\pm$ 6.7	0.046	171.5 $\pm$ 6.9	169.9 $\pm$ 6.8	0.046
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	22.1 $\pm$ 2.1	29.7 $\pm$ 4.1	<0.0001	22.4 $\pm$ 2.0	29.0 $\pm$ 3.2	<0.0001
Waist to hip ratio (cm) <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.07	0.87 $\pm$ 0.07	<0.0001	0.89 $\pm$ 0.07	0.95 $\pm$ 0.07	<0.0001
Waist circumference (cm) <sup>a</sup>	79.7 $\pm$ 8.4	96.0 $\pm$ 10.3	<0.0001	86.1 $\pm$ 6.8	101.4 $\pm$ 9.1	<0.0001
Physically inactive (%) <sup>b</sup>	65.3	66.5	0.841	48.3	40.2	0.195
Current smokers (%) <sup>b</sup>	34.2	34.7	0.921	45.8	37.0	0.153
Alcohol consumption (%) <sup>b</sup>	35.6	31.0	0.314	52.5	63.0	0.076
Menopausal status (%) <sup>b</sup>	30.7	44.7	0.007	-	-	-
Hormone consumption (%) <sup>b</sup>	32.7	18.4	0.001	-	-	-

Controls correspond to normal-weight (BMI <25) and cases to obese plus overweight (BMI  $\geq$ 25) individuals

<sup>a</sup> Unpaired *t*-test

<sup>b</sup> Chi-Square ( $\chi^2$ ) test

**Table 3** Genotype frequencies of *COMT* Val158Met, *DRD2*-141C *Ins/Del*, *DRD2*TaqIA C/T and *MAOA* VNTR gene variants in normal-weight (BMI <25) and obese plus overweight (BMI ≥25) individuals, and in without central obesity (WHR ≤0.95 in men and WHR ≤0.80 in women) and with central obesity (WHR >0.95 in men and WHR >0.80 in women) individuals

Genotypes	BMI		WHR	
	Normal weight	Obese + overweight	Without central obesity	With central obesity
<i>COMT</i> Val158Met				
A/A (Met)	0.15	0.17	0.14	0.17
A/G (Met/Val)	0.46	0.52	0.49	0.51
G/G (Val)	0.39	0.31	0.37	0.32
P-value (AA + AG vs GG) <sup>a</sup>		0.029		0.21
<i>DRD2</i> -141C <i>Ins/Del</i>				
<i>Ins/Ins</i> (C/C)	0.74	0.78	0.72	0.79
<i>Ins/Del</i> (C/-)	0.25	0.21	0.27	0.2
<i>Del/Del</i> (-/-)	0.01	0.01	0.01	0.01
P-value (CC vs C- + --) <sup>a</sup>		0.206		0.029
<i>DRD2</i> TaqIA				
T/T (A1)	0.07	0.06	0.08	0.05
T/C (A1/A2)	0.39	0.33	0.36	0.36
C/C (A2)	0.54	0.61	0.56	0.59
P-value (CC vs CT + TT) <sup>a</sup>		0.107		0.488
<i>MAOA</i> - Women <sup>b</sup>				
L/L	0.12	0.12	0.13	0.11
L/H	0.49	0.47	0.49	0.5
H/H	0.39	0.41	0.38	0.39
P-value (LL vs LH+HH) <sup>a</sup>		1.0		0.599
<i>MAOA</i> - Men <sup>b</sup>				
L	0.39	0.37	0.39	0.36
H	0.61	0.63	0.61	0.64
P-value		0.713		0.707

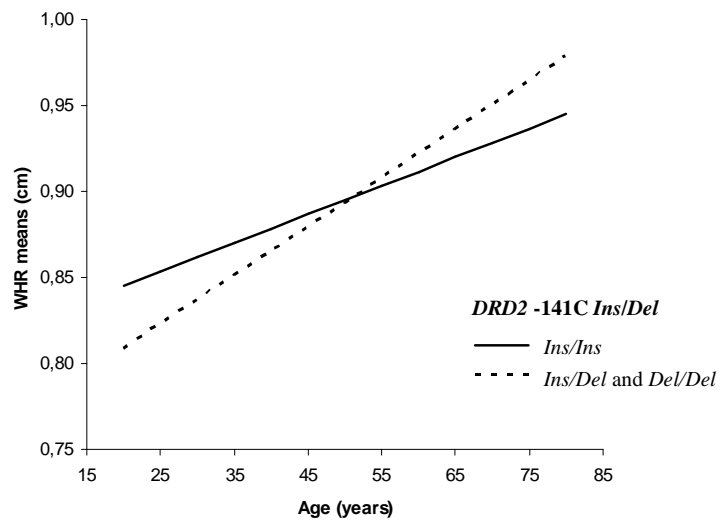
<sup>a</sup>  $\chi^2$ - test between genotype frequencies – Dominant model

<sup>b</sup> = *MAOA* VNTR genotypes are expressed as L for low activity and H for high activity alleles



**Table 4** Binomial multiple logistic regression of BMI (overweight plus obese) and WHR (central obesity) with (a) *COMT* Val158Met genotypes (Val/Val versus Met/Val plus Met/Met) and other potential confounders, (b) *DRD2*-141C Ins/Del genotypes (CC versus C- plus --) and other potential confounders

Variables	BMI			WHR		
	OR	CI 95%	P-value	OR	CI 95%	P-value
(a)						
<i>COMT</i> 158Met (A)	1.40	1.02-1.91	0.036	1.15	0.81-1.64	0.421
Age (years)	1.03	1.02-1.04	0.00001	1.04	1.03-1.06	0.00001
Smoking	0.77	0.56-1.06	0.108	1.13	0.79-1.60	0.508
Alcohol	1.27	0.92-1.75	0.141	0.77	0.55-1.09	0.14
Physical activity	0.94	0.69-1.28	0.688	1.49	1.06-2.10	0.022
Gender	1.09	0.79-1.50	0.607	0.16	0.11-0.23	0.00001
(b)						
<i>DRD2</i> -141C (Del)	0.78	0.55-1.12	0.179	0.13	0.03-0.48	0.002
Age (years)	1.03	1.02-1.04	0.00001	1.03	1.02-1.05	0.00001
Smoking	0.80	0.58-1.11	0.177	1.13	0.79-1.64	0.501
Alcohol	1.32	0.95-1.84	0.101	0.84	0.58-1.21	0.357
Physical activity	0.94	0.68-1.29	0.682	1.50	1.05-2.15	0.027
Gender	1.10	0.79-1.54	0.57	0.15	0.10-0.21	0.00001
<i>DRD2</i> *Age	-	-	-	1.04	1.01-1.07	0.009



**Fig. 1** Waist-to-hip ratio (WHR) expected means by age for *Ins/Ins* and *Ins/Del* or *Del/Del* genotypes. The panel illustrates the different increase in WHR with age, according to different genotypes. Age ~50 seems to be the cross-point for the *DRD2*\*Age interaction observed.

Capítulo V

## **DISCUSSÃO**

---

Os pontos mais específicos referentes aos resultados obtidos para cada gene investigado foram discutidos nas seções correspondentes (capítulo 2 a 4) da presente Tese. Nesse capítulo final serão, portanto, discutidos aspectos mais gerais, que se aplicam a todos os resultados observados, buscando situá-los dentro do contexto dos aspectos ambientais e biológicos das doenças multifatoriais, bem como serão discutidas as perspectivas para a continuidade dessa linha de pesquisa.

Nos artigos científicos que constituem o cerne da presente Tese, foram avaliadas variantes polimórficas em oito genes candidatos e suas possíveis associações com parâmetros de massa (IMC) e distribuição da gordura corporal (WHR) em uma amostra da população euro-descendente de Porto Alegre, RS, com a finalidade de avaliar a contribuição desses genes para a patogênese da obesidade nessa população.

Um levantamento realizado em 19 municípios do Estado do Rio grande do Sul por Gus e cols. (2002) indicou que 36,1% dos indivíduos entrevistados apresentaram excesso de peso e 18,6% foram obesos. Esses dados foram muito semelhantes aos observados na amostra analisada no presente estudo, na qual 36,9% dos participantes apresentaram sobrepeso e 20,5% foram obesos, sugerindo que a amostra investigada é representativa da ocorrência de obesidade da população do Estado.

Dentre os genes candidatos investigados, tentamos abranger variantes já bem estudadas, como DRD2 TaqIA e POMC 8246C/T, assim como variantes onde o enfoque relacionado ao ganho de peso ainda é incipiente, como CNR1 3813 A/G e CNR1 4895A/G, ou até mesmo ausente, como DRD2 -141C *Ins/Del*. As associações relatadas no presente estudo confirmam a importância de alguns genes para o desenvolvimento da obesidade, mas também trazem resultados novos que merecem ser investigados em outras amostras e populações para que se estabeleça sua importância na etiologia dessa doença.

Dos Onze polimorfismos analisados, foram observadas associações significantes para as variantes CART -156A/G (rs35862863), CNR1 4895A/G (rs806368), COMT 158G/A (rs4680) e DRD2 -141C *Ins/Del* (rs1799732), ou com IMC, ou com WHR. Entretanto, algumas dessas associações mostraram-se dependentes de fatores ambientais ou biológicos, através da evidência de interação entre essas variáveis e os polimorfismos.

Os primeiros trabalhos de associação entre marcadores genéticos e características poligênicas abrangiam somente dados como sexo, idade, grupo étnico e quantificação adequada da característica de interesse. Depois de muitos anos de resultados discrepantes, as investigações têm se voltado para coleta de dados sobre hábitos de vida e em como esses fatores podem interagir com determinados genótipos. O método onde indivíduos são genotipados para um determinado loco e o fenótipo comparado entre os diferentes genótipos é uma estratégia robusta, mas que pode ser confundida por interações gene-ambiente.

Apesar de um grande painel de genes e mutações estar sendo investigado em relação a efeitos sobre o acúmulo de massa corporal e adiposidade, a análise da literatura revela que os resultados obtidos são freqüentemente contraditórios. Essas contradições talvez sejam um reflexo do fato de que algumas dessas variantes genéticas possam ter algum efeito significativo em alguns subgrupos de indivíduos, mas não em outros (Bouchard, 2001). Nesse caso, o efeito da interação pode obscurecer tanto fatores biológicos e ambientais (evidentes somente em pessoas suscetíveis), como fatores genéticos (evidenciados em indivíduos somente com uma história prévia de exposição). Conforme Stalenhoef e cols. (1997), o poder de uma determinada amostra em detectar uma associação depende crucialmente das proporções relativas dos subgrupos de indivíduos (fumantes, obesos, idosos, homens, por exemplo), uma vez que o efeito do genótipo pode ser diferente

nesses grupos. Isso pode explicar as aparentes inconsistências encontradas em diferentes estudos.

Em relação ao efeito idade-dependente encontrado com o polimorfismo DRD2 - 141C *Ins/Del* no presente trabalho uma contradição em relação aos resultados poderia ser encontrada caso tivéssemos estudado apenas indivíduos jovens, por exemplo, e, dessa forma, atribuíssemos um papel protetor do alelo de deleção para obesidade central. Por outro lado, se tivéssemos estudado apenas indivíduos idosos, concluiríamos que a deleção apresenta um efeito de risco no desenvolvimento da doença. Entretanto, o que temos na verdade é um efeito do alelo modulado pela idade, o qual tem uma inversão no seu efeito por volta dos 50 anos de idade. Dessa forma, é possível observar que o controle dos polimorfismos por efeitos biológicos também se torna imperativo na detecção dos verdadeiros efeitos que os mesmos desempenham nas doenças multifatoriais. Outro aspecto importante a ser ressaltado foi a interação inicial observada entre o polimorfismo CART - 156A/G e fumo, a qual não se manteve após a correção de Bonferroni para múltiplos testes. Utilizando a mesma amostra desse trabalho, Mattevi e cols. (2002) encontraram um efeito da interação entre um polimorfismo no gene do receptor da leptina (LEPR) e fumo no IMC em 356 indivíduos. Da mesma forma, Fiegenbaum e cols. (2003; 2007) encontraram associações significantes das interações entre fumo e polimorfismos nos genes da apolipoproteína A-IV (APOA-IV) e da apolipoproteína C3 (APOC3) com IMC (n= 391) e níveis de triglicérides (n= 220 mulheres), respectivamente. Recentemente, Almeida e Hutz (2008) encontraram efeito significativo da interação entre um polimorfismo no gene do receptor de estrógeno 1 (ESR1) e fumo nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) em uma amostra de 187 mulheres na pré-menopausa. Tais resultados nos mostram que todos esses trabalhos citados anteriormente utilizaram amostras bem menores do que a

utilizada para essa Tese (n= 756), o que nos indica que a interação encontrada entre a variante CART -156A/G e fumo apresenta um efeito pequeno no desenvolvimento da obesidade abdominal, uma vez que ela não se sustenta aos ajustes para múltiplos testes. Provavelmente, se aumentássemos o número de indivíduos analisados esse efeito poderia ser melhor detectado, já que o teste estatístico teria mais poder em detectar associações com polimorfismos que explicam uma pequena porção da variância da característica.

De uma forma geral, os resultados do presente estudo revelaram que os efeitos dos polimorfismos sobre fenótipos da obesidade podem ser influenciados por fatores ambientais e biológicos e que essas interações são extremamente importantes para a determinação desses parâmetros na população investigada. Não podemos dizer se um determinado “perfil genético” é de susceptibilidade para o aumento do índice de massa corporal (IMC) ou para o desenvolvimento de obesidade abdominal sem o conhecimento do estilo de vida dos indivíduos. Nesse sentido, as interações aqui encontradas precisam ser replicadas por outros pesquisadores em amostras independentes para que se reconheça o seu verdadeiro significado, bem como para trazer soluções práticas para prevenção de doenças.

Outro resultado que merece atenção é o fato de que a maioria das associações significantes desse trabalho foi encontrada com obesidade abdominal, e não com IMC. Alguns autores vêm discutindo a utilização desse índice como um indicador do estado nutricional de adultos e também de idosos. Garn e cols. (1986) enumeraram três limitações para o uso do IMC: a correlação com a estatura, que apesar de baixa ainda é significativa; a correlação com a massa livre de gordura; e a influência da proporcionalidade corporal (relação tamanho das pernas/tronco), tal que indivíduo com menor comprimento da perna tenha um valor de IMC maior, em cerca de cinco unidades. Essas limitações poderiam pôr em risco a utilização do IMC como indicador de gordura corporal. Entretanto, mesmo

baseando-se nesses aspectos e ainda no fato de o IMC não expressar a distribuição de gordura corporal andróide e ginecóide, que tem grande influência na saúde, ainda não se tem um outro indicador que seja tão simples e conveniente. Além dessas limitações que se aplicam à população em geral, somam-se as mudanças que ocorrem na composição corporal com o envelhecimento, tornando ainda mais difícil a utilização do IMC para avaliação do estado nutricional de indivíduos com idade avançada. Segundo Landi e cols. (2000), como o IMC não distingue adequadamente massa gorda e massa magra, pode ser um indicador menos útil de adiposidade entre idosos, que possuem maior quantidade de gordura corporal em um determinado IMC do que entre indivíduos jovens, devido à redução na massa muscular relacionada com a idade. Sendo assim, o IMC não pode ser utilizado como única estimativa de obesidade ou massa corporal gorda, principalmente em idosos. Ainda, a porcentagem de gordura corporal é maior em mulheres do que em homens (Jackson e cols., 2002), mostrando que a relação entre IMC e porcentagem de gordura corporal não é independente somente da idade, mas também do sexo, sendo esses as maiores fontes de variação quando se define a prevalência de obesidade pelo uso do IMC. Já com a utilização da razão cintura-quadril, esse fator sexo-dependente é contornado, uma vez que os pontos de corte são distintos entre homens e mulheres com peso normal e com obesidade abdominal ( $WHR \geq 0,80$  em mulheres e  $WHR \geq 0,95$  em homens) (Han e cols., 1998a). O fato de termos achado um número de associações positivas maior com WHR do que com IMC nos leva a pensar que talvez o parâmetro de obesidade central apresente um componente genético maior do que o parâmetro de massa corporal, não necessitando assim de um alto poder estatístico para a sua detecção.



## **V.1. Perspectivas Futuras**

Na presente Tese, foi realizada uma investigação envolvendo onze polimorfismos distribuídos em oito genes candidatos e fenótipos relacionados à obesidade humana em uma população Euro-descendente de Porto Alegre. É evidente que esse trabalho não tem a pretensão de esgotar o assunto, mas sim a intenção de dar continuidade dessa linha de pesquisa no Brasil. No entanto, ainda existem vários e grandes obstáculos a serem superados, como a compreensão da dinâmica complexidade do genoma humano e da etiologia de doenças com origem multifatorial, assim como muitas barreiras relacionadas a questões éticas precisam ser transpostas.

Desde o início do estudo da obesidade em nosso laboratório no ano de 2000, os avanços na área da genética dessa doença aconteceram de forma muito acelerada. Os dados aqui apresentados reforçam as evidências de que os estudos de associação representam uma ferramenta poderosa na identificação de variantes genéticas que influenciam a susceptibilidade às doenças complexas, principalmente quando essas influências genéticas são analisadas dentro de seu contexto biológico e ambiental. Indivíduos afetados com síndromes pleiotrópicas ou defeitos de um único gene representam apenas uma pequena fração da população de obesos e não podem explicar a magnitude do problema da obesidade na sociedade moderna. Dessa forma, estudos humanos que visem à identificação de genes específicos envolvidos no ganho de peso tornam-se de extrema relevância para que se possa ter um maior entendimento da fisiopatologia do ganho de peso.

As limitações para a realização efetiva e completa desse trabalho já foram descritas anteriormente nos artigos que compõem o corpo desse trabalho. Entretanto, não podemos deixar de levar em consideração que outros fatores comportamentais podem ser muito importantes na determinação do peso corporal, como o estresse, o humor, a ansiedade, a depressão e, até mesmo, as preferências alimentares. Nesse sentido, os indivíduos estão sujeitos a constantes mudanças no peso corporal, o que pode acarretar, tanto para esse como para outros estudos transversais, uma representação meramente momentânea dos mesmos. Dessa forma, com a finalidade de tentar-se contornar essa situação, o acompanhamento de uma amostra por períodos mais longos (estudos longitudinais), sem dúvida, pode trazer um grande número de informações e detectar efeitos de genes que não tenham sido identificados inicialmente.

A definição de uma relação causa-efeito entre polimorfismos e fenótipos complexos, como a obesidade, tem sido difícil e não existe ainda um consenso explícito sobre quais as evidências seriam suficientes para estabelecer tal relação de causalidade a partir dos resultados de estudos de associação. Quando se refere a uma doença complexa, uma relação causal é probabilística, ou seja, o fator causador aumenta a probabilidade de ocorrência da doença (Page e cols., 2003). Dessa forma, somente através de sucessivas replicações e estudos funcionais, preferencialmente através de metodologias diferenciadas e da eliminação de todas as fontes de vieses, será possível afirmar que um dado marcador é fator causador de uma doença complexa.

Muito progresso tem sido feito com os resultados dos estudos de genética em humanos obesos. A utilização da informação genética para aplicação médica será possível no futuro, graças aos avanços no conhecimento do genoma humano. Avanços, por meio de um maior conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do peso,

permitirão pistas para intervenções terapêuticas na obesidade. Além disso, o conhecimento de variantes genéticas poderá identificar melhores respondedores para determinada intervenção, possibilitando, assim, a utilização de novas estratégias de prevenção e tratamento da obesidade humana.

Capítulo VI

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Aberle J, Fedderwitz I, Klages N, George E, Beil FU (2007) Genetic variation in two proteins of the endocannabinoid system and their influence on body mass index and metabolism under low fat diet. *Horm Metab Res* 39: 395-397.
- Adams IB, Martin BR (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91: 1585-1614.
- Almeida S, Hutz MH (2008) Estrogen receptor 1 gene polymorphisms in premenopausal women: interaction between genotype and smoking on lipid levels. *Braz J Med Biol Res* 41: 872-876.
- Annerbrink K, Westberg L, Nilsson S, Rosmond R, Holm G, Eriksson E (2008) Catechol O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Metabolism* 57: 708-711.
- Argyropoulos G, Rankinen T, Neufeld DR, Rice T, Province MA, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C (2002) A polymorphism in the human agouti-related protein is associated with late-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4198-4202.
- Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M (1997) A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 6:577-582.
- Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr (1967) The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* 46: 1549-1557.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377: 424-428.
- Baker M, Gaukrodger N, Mayosi BM, Imrie H, Farrall M, Watkins H, Connell JM, Avery PJ, Keavney B (2005) Association between common polymorphisms of the proopiomelanocortin gene and body fat distribution: a family study. *Diabetes* 54: 2492-2496.
- Ballone GJ (2005) Aspectos Cerebrais da Dependência. In: *PsiquWeb*, Internet, disponível em [www.psiqweb.med.br](http://www.psiqweb.med.br).
- Baptista T (1999) Body weight gain induced by antipsychotic drugs: mechanisms and management. *Acta Psychiatr Scand* 100: 3-16.
- Barnard ND, Noble EP, Ritchie T, Cohen J, Jenkins DJ, Turner-McGrievy G, Gloede L, Green AA, Ferdowsian H (2009) D2 dopamine receptor Taq1A polymorphism, body weight, and dietary intake in type 2 diabetes. *Nutrition* 25: 58-65.

- Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW (1999) Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48: 828-833.
- Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM (1988) Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 11: 107-111.
- Baura GD, Foster DM, Porte D Jr, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 92: 1824-1830.
- Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV (1995) Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* 10: 89-97.
- Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260: R321-R327.
- Bjorbaek C, Kahn BB (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59:305-331.
- Bjorntorp P, Rosmond R (2000) Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: S80-S85.
- Black SC (2004) Cannabinoid receptor antagonists and obesity. *Curr Opin Investig Drugs* 5: 389-394.
- Blum K, Braverman ER, Wood RC (1996) Increased prevalence of the Taq I A1 allele of the dopamine receptor gene (DRD2) in obesity with comorbid substance use disorder: a preliminary report. *Pharmacogenetics* 6: 297-305.
- Blundell JE, Gillett A (2001) Control of food intake in the obese. *Obes Res* 9: S263-S270.
- Bouchard C (2001) Recent progress in the genetics of obesity: are there any practical implications? In: Choban PS, Greenway F, Foster G, Fujioka K, Nonas C, Schumacher D, Vash P, Wadden T, Weigle S (eds) *Obesity: from laboratory investigation to clinical practice*. NAASO, Québec City, pp 15-16.
- Bouchard C (2007) The biological predisposition to obesity: beyond the thrifty genotype scenario. *Int J Obes (Lond)* 31:1337-1339.
- Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G (1990) The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 322: 1477-1482.

- Bray GA, Fisler J, York DA (1990) Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front Neuroendocrinol* 11: 128-181.
- Brown AM, Mayfield DK, Volafova J, Argyropoulos G (2001) The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein. *Gene* 277:231-238.
- Camarena B, Santiago H, Aguilar A, Ruvinskis E, González-Barranco J, Nicolini H (2004) Family-based association study between the monoamine oxidase A gene and obesity: implications for psychopharmacogenetic studies. *Neuropsychobiology* 49: 126-129.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269(5223): 546-549.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstem JP (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor. Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84: 491-495.
- Chen Y, Snieder H, Wang X, Kaviya B, McCaffrey C, Spector TD, Carter ND, O'Dell SD (2005) Proopiomelanocortin gene variants are associated with serum leptin and body fat in a normal female population. *Eur J Hum Genet* 13: 772-780.
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138(10): 4489-4492.
- Chua SCJr, Chung WK, Wu-Peng XSh., Zhang Y, Liu S, Tartaglia L, Leibel RL (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (Leptin) receptor. *Science* 271: 994-996.
- Clément K (1999) Leptin and the genetics of obesity. *Acta Paediatr. Suppl.* 428: 51-57.
- Comings DE, Blum K (2000) Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res* 126: 325-341.
- Comings DE, Flanagan SD, Dietz G, Muhleman D, Knell E, Gysin R (1993) The dopamine D2 receptor (DRD2) as a major gene in obesity and height. *Biochem Med Metab Biol* 50: 176-185.
- Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 51: 287-317; discussion 318.
- Considine RV, Sinha MK, *et al.* (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295.

- Cota D, Marsicano G, *et al.* (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112: 423-431.
- Cowley MA (2003) Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *Eur J Pharmacol* 480: 3-11.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-484.
- de Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS (2007) Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J* 28: 850-856.
- de LAFML, Saad MJ, Velloso LA (1999) Insulin induces tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and SHC, and SHC/GRB2 association in cerebellum but not in forebrain cortex of rats. *Brain Res* 826: 74-82.
- Del Parigi A, Chen K, Salbe AD, Reiman EM, Tataranni PA (2003) Are we addicted to food? *Obes Res* 11: 493-495.
- Delplanque J, Barat-Houari M, Dina C, Gallina P, Clément K, Guy-Grand B, Vasseur F, Boutin P, Froguel P (2000) Linkage and association studies between the proopiomelanocortin (POMC) gene and obesity in caucasian families. *Diabetologia* 43: 1554-1557.
- Després JP (2007) The endocannabinoid system: a new target for the regulation of energy balance and metabolism. *Crit Pathw Cardiol* 6: 46-50.
- Després JP, Golay A, Sjöström L (2005) Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med* 353: 2121-2134.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.
- Dhillon WS, Small CJ, Stanley SA, Jethwa PH, Seal LJ, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR (2002) Hypothalamic interactions between neuropeptide Y, agouti-related protein, cocaine- and amphetamine-regulated transcript and alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol* 14: 725-730.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3: 771-784.



- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410: 822-825.
- Di Marzo V, Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 8: 585-589.
- Edwards CM, Abbott CR, Sunter D, Kim M, Dakin CL, Murphy KG, Abusnana S, Taheri S, Rossi M, Bloom SR (2000) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. *Brain Res* 866: 128-134.
- Eriksson AL, Suuriniemi M, Mahonen A, Cheng S, Ohlsson C (2005) The COMT val158met polymorphism is associated with early pubertal development, height and cortical bone mass in girls. *Pediatr Res* 58:71-77.
- Erlanson-Albertsson C (2005) How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97: 61-73.
- Fan W, Boston B, Kesterson R, Hrubby V, Cone R (1997) Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165-168.
- Feng N, Adler-Wailes D, Elberg J, Chin JY, Fallon E, Carr A, Frazer T, Yanovski JA (2003) Sequence variants of the POMC gene and their associations with body composition in children. *Obes Res* 11: 619-624.
- Fiegenbaum M, de Andrade FM, Hutz MH (2007) Association between plasma lipid parameters and APOC3 genotypes in Brazilian subjects: effect of gender, smoking and APOE genotypes. *Clin Chim Acta* 380: 175-181.
- Fiegenbaum M, Hutz MH (2003) Further evidence for the association between obesity-related traits and the apolipoprotein A-IV gene. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 484-490.
- Fitness Canada (1986) Canadian Standardized Test of Fitness (CSTF): operations manual, 3rd ed., Ottawa.
- Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL (1998) Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 39-47.
- Flier JS (2004) Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116: 337-350.
- Folli F, Bonfanti L, Renard E, Kahn CR, Merighi A (1994) Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. *J Neurosci* 14: 6412-6422.

- Fuemmeler BF, Agurs-Collins TD, McClernon FJ, Kollins SH, Kail ME, Bergen AW, Ashley-Koch AE (2008) Genes implicated in serotonergic and dopaminergic functioning predict BMI categories. *Obesity (Silver Spring)* 16: 348-355.
- Gadzicki D, Müller-Vahl K, Stuhmann M (1999) A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Mol Cell Probes* 13: 321-323.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646–1647.
- Garn SM, Leonard WR, Hawthorne VM (1986) Three limitations of the body mass index. *Am J Clin Nutr* 44: 996-997.
- Gazzerro P, Caruso MG, Notarnicola M, Misciagna G, Guerra V, Laezza C, Bifulco M (2007) Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *Int J Obes (Lond)* 31: 908-912.
- Grandy DK, Zhang Y, Civelli O (1993) PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet* 2: 2197.
- Grigson PS (2002) Like drugs for chocolate: separate rewards modulated by common mechanisms? *Physiol Behav* 76: 389–395.
- Guérardel A, Barat-Houari M, Vasseur F, Dina C, Vatin V, Clément K, Eberlé D, Vasseur-Delannoy V, Bell CG, Galan P, Hercberg S, Helbecque N, Potoczna N, Horber FF, Boutin P, Froguel P (2005) Analysis of sequence variability in the CART gene in relation to obesity in a Caucasian population. *BMC Genet* 6:19.
- Gus I, Fischmann A, Medina C (2002) Prevalência dos fatores de risco da doença arterial coronariana no Estado do Rio grande do Sul. *Arq Bras Cardiol* 78: 478-483
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1: 271-272.
- Hainer V, Stunkard AJ, Kunesova M, Parizkova J, Stich V, Allison DB (2000) Intrapair resemblance in very low calorie diet-induced weight loss in female obese identical twins. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 1051-1057.
- Han TS, Bijnen FC, Lean ME, Seidell JC (1998a) Separate associations of waist and hip circumference with lifestyle factors. *Int J Epidemiol* 27: 422-430.
- Han TS, Tijhuis MA, Lean ME, Seidell JC (1998b) Quality of life in relation to overweight and body fat distribution. *Am J Public Health* 88: 1814-1820.
- Hathout EH, Sharkey J, Racine M, Ahn D, Mace JW, Saad MF (1999) Changes in plasma leptin during the treatment of diabetic ketoacidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4545-4548.

- Health and Welfare Canada (1981) The health of Canadians: report of the Canada Health Survey. Ministry of Supplies and Services, Government of Canada, Ottawa.
- Hildebrandt AL, Kelly-Sullivan DM, Black SC (2003) Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol* 462: 125-132.
- Hixson JE, Almasy L, Cole S, Birnbaum S, Mitchell BD, Mahaney MC, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG (1999) Normal variation in leptin levels is associated with polymorphisms in the proopiomelanocortin gene, POMC. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3187-3191.
- Hong CC, Thompson HJ, Jiang C, Hammond GL, Tritchler D, Yaffe M, Boyd NF (2003) Val158Met Polymorphism in catechol-O-methyltransferase gene associated with risk factors for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 838-847.
- Horvath TL (2005) The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 8: 561-565.
- Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C (1992) Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology* 131: 2461-2467.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141.
- Hutz MH, Mattevi VS, Almeida S, Zembrzuski VM, Salzano FM (2003) Association of the dopamine D2 receptor gene with obesity in native Brazilians. In: Medeiros-Neto G, Halpern A, Bouchard C (eds) *Progress in Obesity Research*: 9. Eastleigh, UK, pp 370-372.
- Jackson AS, Stanforth PR, Gagnon J, Rankinen T, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Bouchard C, Wilmore JH (2002) The effect of sex, age and race on estimating percentage body fat from body mass index: The Heritage Family Study. In *J Obesity* 26: 789-796.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 134: 1151-1154.
- Jenkinson CP, Hanson R, Cray K, Wiedrich C, Knowler WC, Bogardus C, Baier L (2000) Association of dopamine D2 receptor polymorphisms Ser311Cys and TaqIA with obesity or type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 1233-1238.

- Kandel ER (2000) Disorders of thought and volition: schizophrenia. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, New York, pp 1188–1208.
- Kelley AE, Bakshi VP, Haber SN, Steininger TL, Will MJ, Zhang M (2002) Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol Behav* 76: 365–377.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 136: 550-557.
- Kow LM, Pfaff DW (1991) The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 359-364.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6: 243-250.
- Landi F, Onder G, Gambassi G, Pedone C, Carbonin P, Bernabei R (2000) Body mass index and mortality among hospitalized patients. *Arch Intern Med* 160: 2641-2644.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-404.
- Leedom LJ, Meehan WP (1989) The psychoneuroendocrinology of diabetes mellitus in rodents. *Psychoneuroendocrinology* 14: 275-294.
- Loos RJ, Rankinen T, Tremblay A, Pérusse L, Chagnon Y, Bouchard C (2005) Melanocortin-4 receptor gene and physical activity in the Québec Family Study. *Int J Obes (Lond)* 29: 420-428.
- Loos RJJ, Bouchard C (2003) Obesity – is it a genetic disorder? *J Intern Med* 254: 401-425.
- Loos RJJ, Rankinen T (2005) Gene-diet interactions on body weight changes. *J Am Diet Assoc* 105: S29-S34.
- Luheshi GN, Gardner JD, Rushforth DA, Loudon AS, Rothwell NJ (1999) Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7047-7052.

- Maffei M, Stoffel M, Barone M, Moon B, Dammerman M, Ravussin E (1996) Absence of mutations in the human OB gene in obese/diabetic subjects. *Diabetes* 45: 679-682.
- Marks DL, Boucher N, Lanouette CM, Pérusse L, Brookhart G, Comuzzie AG, Chagnon YC, Cone RD (2004) Ala67Thr polymorphism in the Agouti-related peptide gene is associated with inherited leanness in humans. *Am J Med Genet A* 126A: 267-271.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.
- Mattevi VS (2003) O Componente Genético da Obesidade Humana: Investigação de variantes de genes candidatos e sua associação com parâmetros de massa e distribuição da gordura corporal. Tese de Doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH (2002) Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1179-1185.
- Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH (2004) A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. *Hum Genet* 115: 208-212.
- Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH (2006) Impact of variation in ADRB2, ADRB3, and GNB3 genes on body mass index and waist circumference in a Brazilian population. *Am J Hum Biol* 18: 182-186.
- Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH (2007) Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 40: 927-932.
- Mechoulam R (1986) The pharmacohistory of cannabis sativa. In: Mechoulam R (ed) *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp 1-19.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, *et al.* (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83-90.
- Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM (1995) The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr* 49: 105-113.
- Müller TD, Reichwald K, Wermter AK, Brönner G, Nguyen TT, Friedel S, Koberwitz K, Engeli S, Lichtner P, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A (2007) No evidence for an involvement of variants in the cannabinoid receptor gene (CNR1) in obesity in German children and adolescents. *Mol Genet Metab* 90: 429-434.

- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.
- Munzberg H, Myers Jr. MG (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8: 566-570.
- Murphy KG (2005) Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4: 95-111.
- Napolitano A, Cesura AM, Da Prada M (1995) The role of monoamine oxidase and catechol O-methyltransferase in dopaminergic neurotransmission. *J Neural Transm Suppl* 45: 35-45.
- Need AC, Ahmadi KR, Spector TD, Goldstein DB (2006) Obesity is associated with genetic variants that alter dopamine availability. *Ann Hum Genet* 70: 293-303.
- Neel JV (1962) Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14: 353-362.
- Neel JV (1989) The study of natural selection in primitive and civilized human populations. *Hum Biol* 61: 811-823.
- Niki T, Mori H, Tamori Y, Kishimoto-Hashimoto M, Ueno H, Araki S (1996) Human obese gene: molecular screening in Japanese and Asian Indian NIDDM patients associated with obesity. *Diabetes* 45: 674-678.
- Noble EP, Noble RE, Ritchie T et al (1994) D2 dopamine receptor gene and obesity. *Int J Eat Disord* 15: 205-217.
- Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K (1998) Functional polymorphism of -141C Ins/Del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry Res* 81: 117-123.
- Olds J (1976) Brain stimulation and the motivation of behavior. *Prog Brain Res* 45: 401-426.
- Oliveira JM (1999) Síndrome de Deficiência da Recompensa. In: *Cérebro e mente. Revista eletrônica de divulgação científica em neurociência, número 8*, disponível em [www.cerebromente.org.br](http://www.cerebromente.org.br).
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.
- Page GP, George V, Go RC, Page PZ, Allison DB (2003) "Are we there yet?": Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 73: 711-719.

- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27: 73-100.
- Palou A, Serra F, Bonet ML, Picó C (2000) Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 39: 127-144.
- Peeters A, Beckers S, Mertens I, Van Hul W, Van Gaal L (2007) The G1422A variant of the cannabinoid receptor gene (CNR1) is associated with abdominal adiposity in obese men. *Endocrine* 31: 138-141.
- Pelchat ML (2002) Of human bondage: food craving, obsession, compulsion, and addiction. *Physiol Behav* 76: 347-352.
- Pérusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Snyder EE, Bouchard C (2005) The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res* 13: 381-490.
- Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J (2006) Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients. *JAMA* 295: 761-775.
- Plasse TE, Gorter RW, Krasnow SH, Lane M, Shepard KV, Wadleigh RG (1991) Recent clinical experience with dronabinol. *Pharmacol Biochem Behav* 40:695-700.
- Plum L, Schubert M, Bruning JC (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16: 59-65.
- Porter AC, Felder CC (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90: 45-60.
- Prentice AM, Hennig BJ, Fulford AJ (2008) Evolutionary origins of the obesity epidemic: natural selection of thrifty genes or genetic drift following predation release? *Int J Obes (Lond)* 32: 1607-1610.
- Puhl R, Brownell KD (2001) Bias, discrimination and obesity. *Obes Res* 9: 788-805.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.
- Ravussin E, Bouchard C (2000) Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. *Eur J Pharmacol* 410: 131-145.

- Reeder BA, Angel A, Ledoux M, Rabkin SW, Young TK, Sweet LE (1992) Obesity and its relation to cardiovascular disease risk factors in Canadian adults. Canadian Heart Health Surveys Research Group. CMAJ 146: 2009-2019.
- Reidpath D, Burns C, Garrard J, Mahoney M, Townsend M (2002) An ecological study of the relationship between social and environmental determinants of obesity. Health Place 8: 141-145.
- Rosmond R, Ukkola O, Bouchard C, Björntorp P (2002) Polymorphisms in exon 3 of the proopiomelanocortin gene in relation to serum leptin, salivary cortisol, and obesity in Swedish men. Metabolism 51: 642-644.
- Russo P, Strazzullo P, Cappuccio FP, Tregouet DA, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Versiero M, Siani A (2007) Genetic variations at the endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) are associated with obesity phenotypes in men. J Clin Endocrinol Metab 92: 2382-2386.
- Sabol SZ, Hu S, Hamer D (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. Hum Genet 103: 273-279.
- Sakurai T, Amemiya A, *et al.* (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 92: 573-585.
- Saper C, Chou T, Elmquist J (2002) The need to feed. Homeostatic and hedonic control of eating. Neuron 36: 199-211.
- Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol Sci 22: 565-572.
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. Neuron 36: 241-263.
- Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr (1996) Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. Nat Med 2(5): 589-593.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. Nature 404: 661-671.
- Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL (1997) Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. Genes Dev 11: 593-602.
- Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW (1995) Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. Diabetes 44: 147-151.



- Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A (2003) Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage* 19: 1709–1715.
- Speakman JR (2008) Thrifty genes for obesity, an attractive but flawed idea, and an alternative perspective: the 'drifty gene' hypothesis. *Int J Obes (Lond)* 32: 1611-1617.
- Spitz MR, Detry MA, Pillow P, Hu Y, Amos CI, Hong WK, Wu X (2000) Variant alleles of the D2 dopamine receptor gene and obesity. *Nutr Res* 20: 371-380.
- Stalenhoef AF, Aalto-Setälä K, Armstrong VW, Benlian P, Dieplinger H, Humphries S, Steinmetz A (1997) The 19th annual meeting of the European Lipoprotein Club. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2316-2325.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7: 1189-1192.
- Stephens T, Craig CL (1990) The well-being of Canadians: highlights of the 1988 Campbell's Survey. Canadian Fitness and Lifestyle Research Institute, Ottawa.
- Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM (2008) Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science* 322: 449-452.
- Stunkard AJ (1996) Socioeconomic status and obesity. In: Cadwick DJ, Cardew G, eds. *The origins and consequences of obesity*. Chichester: Wiley 174-193.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97.
- Sutton BS, Langefeld CD, Williams AH, Norris JM, Saad MF, Haffner SM, Bowden DW (2005) Association of proopiomelanocortin gene polymorphisms with obesity in the IRAS family study. *Obes Res* 13: 1491-1498.
- Suviolahti E, Ridderstråle M, Almgren P, Klannemark M, Melander O, Carlsson E, Carlsson M, Hedenbro J, Orho-Melander M (2003) Pro-opiomelanocortin gene is associated with serum leptin levels in lean but not in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 1204-1211.
- Swinburn B, Egger G (2002) Preventive strategies against weight gain and obesity. *Obes Rev* 3: 289-301.
- Swinburn B, Egger G (2004) The runaway weight gain train: too many accelerators, not enough brakes. *BMJ* 329: 736-739.

- Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD (2001) Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 30: 819-828.
- Szczypka MS, Rainey MA, Kim DS, Alaynick WA, Marck BT, Matsumoto AM, Palmiter RD (1999) Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12138-12143.
- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093-6096.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Tataranni PA, Baier L, Jenkinson C, Harper I, Del Parigi A, Bogardus C (2001) A Ser311Cys mutation in the human dopamine receptor D2 gene is associated with reduced energy expenditure. *Diabetes* 50: 901-904.
- Tauxe RV, Holmberg SD, Dodin A, Wells JV, Blake PA (1988) Epidemic cholera in Mali: high mortality and multiple routes of transmission in a famine area. *Epidemiol Infect* 100: 279-289.
- Thomas GN, Critchley JA, Tomlinson B, Cockram CS, Chan JC (2001) Relationships between the taqI polymorphism of the dopamine D2 receptor and blood pressure in hyperglycaemic and normoglycaemic Chinese subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55: 605-611.
- Thomas GN, Tomlinson B, Critchley JA (2000) Modulation of blood pressure and obesity with the dopamine D2 receptor gene TaqI polymorphism. *Hypertension* 36: 177-182.
- Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira da Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA (2003) Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E216-E223.
- Trayhurn P (2005) The biology of obesity. *Proc Nutr Soc* 64: 31-38.
- Twoogler SS, Chubak J, Aiello EJ, Yasui Y, Ulrich CM, Farin FM, Stapleton PL, Irwin ML, Potter JD, Schwartz RS, McTiernan A (2004) The effect of CYP19 and COMT polymorphisms on exercise-induced fat loss in postmenopausal women. *Obes Res* 12: 972-981.
- Ungerstedt U (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 95-122.
- Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20: 113-114.

- Van de Graaff KM (2003) *Anatomia humana*. 6 ed. Editora Manole, São Paulo.
- van Rossum CT, Pijl H, Adan RA, Hoebee B, Seidell JC (2006) Polymorphisms in the NPY and AGRP genes and body fatness in Dutch adults. *Int J Obes (Lond)* 30:1522-1528.
- Volicer I, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ (1997) Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 12: 913-919.
- Volkow ND, Fowler JS (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 10: 318-325.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Franceschi D, Wong C, Gatley SJ, Gifford AN, Ding YS, Pappas N (2002) "Nonhedonic" food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse* 44: 175-180.
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS (2001) Brain dopamine and obesity. *Lancet* 357: 354-357.
- Wardle J (1999) Aetiology of obesity VII: psychological factors. In: *Force BNFT*, ed. Obesity. Oxford: Blackwell Science 83-91.
- Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R (2008) Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr* 87: 398-404.
- Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL (1995) Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 96: 2065-2070.
- Weinsier RL, Hunter GR, Heini AF, Goran MI, Sell SM (1998) The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. *Am J Med* 105: 145-150.
- Woods SC, Lotter E, MacKay L, Porte DJ (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight in baboons. *Nature* 282: 503-505.
- Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ (2000) Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 51: 255-277.
- World Health Organization (1998) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 3-5 June 1997. World Health Organization, Geneva, 276pp.

- World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 894:1-253.
- Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS (2005) PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 115: 951-958.
- Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W, Makita Z (2002) Sequencing of the putative promoter region of the cocaine-and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 132-136.
- Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20: 111-112.
- Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, Onaivi ES, Arinami T, Uhl GR (2004) Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 9: 916-931.
- Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5780-5785.

Capítulo VII

**ANEXOS**

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO SOBRE  
FATORES GENÉTICOS QUE AFETAM OS NÍVEIS DE COLESTEROL E  
TRIGLICERÍDEOS NA POPULAÇÃO DE PORTO ALEGRE**

Através deste documento, consinto em ser entrevistado e em doar uma quantidade de 5 (cinco) ml de sangue, a ser obtida juntamente com a retirada de sangue para os exames dos quais necessito, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Estou ciente de que os objetivos deste estudo são conhecer um pouco mais sobre algumas das causas do aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos. Além disso, sei que os benefícios virão somente a longo prazo, quando será possível prever o risco genético de um indivíduo ter problemas cardiovasculares.

Os resultados do presente estudo estarão a minha disposição tão logo forem obtidos.

Tenho a garantia de que meus dados serão mantidos em sigilo, e que meu nome daqui para frente não será revelado.

Porto Alegre,    /    /    .

\_\_\_\_\_

Assinatura do Paciente

Pesquisadora Responsável:

Dra. Mara Helena Hutz

Departamento de Genética da UFRGS

Telefone: 3308-6720

**Tabela 1:** Frequências alélicas das variantes raras na população estudada e em diferentes populações de origem euro-descendente.

Gene	Polimorfismo	dbSNP ID	Frequência da variante rara(%)	Frequência da variante rara(%) em diferentes populações euro-descendentes
AgRP	199G/A	rs5030980	A= 4,6	A= 5,5 (Brown e cols., 2001); A= 4,7 (Brown e cols., 2001); A= 5,5 (Argyropoulos e cols., 2002); A= 3,6 (van Rossum e cols., 2006).
CART	-156A/G	rs35862863	A= 44,6	A= 46,4 (Guérardel e cols., 2005).
CNR1	1359G/A	rs1049353	A= 22	A= 17,9 (Gazzerro e cols., 2007); A= 20,9 (Aberle e cols., 2007); A= 27 (Müller e cols., 2007).
CNR1	3813A/G	rs12720071	G= 11	G= 10 (Russo e cols., 2007).
CNR1	4895A/G	rs806368	G= 27,9	G= 28 (Russo e cols., 2007).
COMT	158G/A	rs4680	A(Met)= 40,9	A(Met)= 48 (Need e cols., 2006); A(Met)= 53 (Annerbrink e cols., 2008).
DRD2	TaqIA	rs1800497	T(A1) = 24,3	T (A1)= 17,6 (Berggren e cols., 2006);

DRD2	-141C <i>Ins/Del</i>	rs1799732	<i>Del(-)</i> = 12,3	
MAOA	u-VNTR 30bp	u-VNTR	Baixa atividade (L)= 38,9	Baixa atividade (L)= 33,1 (Sabol e cols., 1998); Baixa atividade (L)= 33,3 (Need e cols., 2006).
MC4R	-2745C/T	rs7242169	T= 20,2	T= 27,2 (Loos e cols., 2005).
POMC	8246C/T	rs1042571	T= 19,1	T= 20,2 (Feng e cols., 2003); T= 21,3 (Baker e cols., 2005); T= 18,1 (Chen e cols., 2005); T= 17 (Sutton e cols., 2005).