

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**O COMPONENTE GENÉTICO DA OBESIDADE HUMANA:
INVESTIGAÇÃO DE GENES CANDIDATOS ENVOLVIDOS
NO CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR**

Janaína Pacheco Jaeger

Dissertação 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 Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre, Dezembro de 2005

Humanity needs practical men, who get the most out of their work, and, without forgetting the general good, safeguard their own interests. But humanity also needs dreamers, for whom the disinterested development of an enterprise is so captivating that it becomes impossible for them to devote their care to their own material profit.

Marie Curie (1867-1934)

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) e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq.

Agradecimentos

Agradeço em especial à minha orientadora Mara H. Hutz, não somente pela confiança no meu trabalho, mas, principalmente, pela dedicação e profissionalismo que foram fundamentais, e continuam sendo, para a minha formação como pesquisadora.

Às minhas colegas de laboratório, agradeço do fundo do meu coração. Vê e Fabi, valeu pelas festas, pelas risadas, pelos Cavanhas, pelas sinucas, pelo verão de 2005 (com certeza foi um dos melhores que eu já tive!), valeu pela amizade! “Julieta”, tenho que admitir que as tuas gargalhadas foram muitas vezes necessárias para momentos de descontração, mesmo que estivéssemos a duas salas de distância! Agradeço à Marilu pelos conhecimentos e, muitas vezes, pelos socorros estatísticos. À Sil pelos chimarrões na hora do intervalo, foram poucos, mas muito proveitosos. À Tati Gonzalez, que não é do laboratório, mas se tornou uma “agregada”, obrigada pela disposição e estar sempre pronta para ajudar!

Agradeço especialmente à Ana Paula (Chimarruts), que foi muito mais do que uma colega, mas uma verdadeira amiga, desde a faculdade. Muito obrigada pela cumplicidade, pelas conversas, pelos estudos, pelas ajudas no lab e pelo apoio, que foram importantíssimos para a conclusão desse trabalho.

Ao Elmo, anjo da guarda do Programa de Pós-Graduação, pela ajuda e pela paciência em diversos assuntos.

À Prfa. Sídia Callegari-Jacques pelas análises estatísticas e à Dra. Vanessa S. Mattevi pelo suporte intelectual e ensinamentos de toda a parte laboratorial.

Aos meus pais, Marlene e José Ignácio, por tanto e por tudo! Dedico essa dissertação a vocês, pelo amor, pelo carinho, pelo apoio... e por tantas outras razões que não caberiam aqui descrevê-las.

Agradeço às minhas irmãs Christiane e Francesca simplesmente por existirem na minha vida.

Ao meu namorado Marcelo pela confiança, amor e cumplicidade. Obrigada pelas conversas, pelas risadas e, principalmente, por ter reaparecido na minha vida!

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	07
Resumo	08
Abstract	10
I. Introdução	12
I.1. Considerações Gerais - Definindo o Problema da Obesidade	13
I.2. Predisposição Genética e Interações Ambientais	15
I.3. Controle da Ingestão Alimentar	16
I.4. Genes Candidatos	23
I.4.1. O Gene CART – Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina	25
I.4.2. O Gene CNR1– Receptor Canabinóide 1	30
I.5. Justificativa e Objetivos	36
II. Obesity-related phenotypes are associated with CART and CNR1 gene polymorphisms	38
III. Discussão	61
III.1. A Importância do Contexto Ambiental	63
III.2. Aspectos Gênero-Específicos	65
III.3. Implicações Terapêuticas	67
III.4. Perspectivas Futuras	69
IV. Referências Bibliográficas	71
Anexo	86

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

AgRP – proteína relacionada a agouti

CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

GHRL – precursor da grelina

GPR24 (ou **MCHR1**) – receptor 24 acoplado à proteína G (ou receptor hormônio concentrador de melanina 1)

HCRTR1 – receptor hipocretina (orexina) 1

ICV - intracerebroventricular

IMC – índice de massa corporal

MC4R – receptor melanocortina 4

α -MSH – alfa-hormônio estimulador de melanócitos

NPY – neuropeptídeo Y

POMC – pro-opiomelanocortina

PYY – peptídeo YY

RETN – gene da resistina

SNC – sistema nervoso central

TRH – hormônio liberador de tirotrofina

WC – “waist circumference” (circunferência da cintura)

Resumo

A prevalência da obesidade tem aumentado em todo o mundo, alcançando proporções epidêmicas em muitos países desenvolvidos e de transição. A obesidade é uma doença complexa de origem multifatorial, a qual, em muitos casos, aparece como uma condição poligênica influenciada por fatores ambientais. 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 dissertação, foi realizado um estudo de associação entre variantes em dois genes candidatos de susceptibilidade à obesidade e parâmetros de massa e de distribuição da gordura corporal em uma amostra da população euro-descendente de Porto Alegre. Esse trabalho teve a finalidade de verificar se esses polimorfismos estariam envolvidos na patogênese do excesso de massa corporal nessa população.

Foram analisados dois polimorfismos localizados nos genes transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e no receptor canabinoide 1 (CNR1), sendo eles: CART - 156A>G e CNR1 1359G>A. Os genótipos para cada polimorfismo foram determinados pela técnica da reação em cadeia da polimerase e posterior clivagem com endonucleases de restrição específicas. Os fragmentos de DNA resultantes foram separados e identificados por eletroforese em gel de agarose.

Dentre os indivíduos da amostra, a maioria deles (43%) apresentavam peso normal ($IMC < 25 \text{Kg/m}^2$), enquanto que 36,8% foram classificados como sobrepeso e 20,2% como obesos ($IMC \geq 30 \text{Kg/m}^2$). As frequências genótípicas observadas para o polimorfismo no gene CART foram A/A= 21,4%, A/G= 46,7% e G/G= 31,9%, enquanto que as alélicas foram A= 44,7% e G= 55,3%. Nesse gene, as médias do IMC e da WC foram significativamente maiores em homens portadores do alelo A ($m = 26,9$ e $m = 96,6$, respectivamente), quando comparados com aqueles homocigotos para o alelo G ($m = 25,6$ e $m = 93,7$) (ANOVA, $P = 0,035$ e $P = 0,038$, respectivamente). Já para o gene CNR1, as frequências dos alelos e dos genótipos observadas para o polimorfismo foram A= 22,2% e G= 77,8%; A/A= 5%, A/G= 34,5% e G/G= 60,6%. As médias do IMC e da WC foram

significativamente maiores em homens portadores do alelo G (m= 26,5 e m= 95,7), quando comparados com os homozigotos para o alelo A (m= 23,8 e m= 87,7) (Mann-Whitney, P=0,037 e P=0,012).

Esses resultados evidenciam que tanto o gene CART quanto o gene CNR1 estão associados com fenótipos da obesidade humana de uma forma gênero-dependente, já que em mulheres não foi encontrado algum resultado significativo.

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.

Abstract

The prevalence of obesity is rising throughout the world and it is reaching epidemic proportions in many developed and transition countries. Obesity is a complex disease with multifactorial origin, which in many cases appears as a polygenic condition affected by environmental factors. Despite the contribution of genetic factors to the development of weight gain be widely recognized, the real quantitative contribution of them to related phenotypes is a complex question yet to be answered.

In the present study, the association between two candidate gene variants and body fat mass-related phenotypes was evaluated in an European descent sample from Porto Alegre city. This work aimed to identify if those polymorphisms were involved in the etiology of obesity in this population.

Two polymorphisms were investigated in the cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) and the cannabinoid receptor 1 (CNR1) genes, which are the following: CART -156A>G and CNR1 1359G>A. Genotypes for each variant were determined by the polymerase chain reaction coupled to endonuclease restriction digestion. The DNA fragments generated were separated and identified by electrophoresis in agarose gel.

Most individuals in our sample (43%) had a normal weight ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$), while 36.8% could be classified as overweight and 20.2% were obese ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$). The genotype frequencies observed in the CART polymorphism were A/A= 21.4%, A/G= 46.7% and G/G= 31.9%, while the allele frequencies were A= 44.7% and G= 55.3%. In that same gene, both BMI and WC means were significantly higher in A-carrier males ($m = 26.9$ and $m = 96.6$, respectively) when compared to G-homozygote males ($m = 25.6$ and $m = 93.7$) (ANOVA, $P = 0.035$ e $P = 0.038$, respectively). However for the CNR1 gene, the allele and genotype frequencies were A= 22.2% and G= 77.8%; A/A= 5%, A/G= 34.5% and G/G= 60.6%. The BMI and WC means were higher in G-carrier males ($m = 26.5$ and $m = 95.7$) than in A-homozygote males ($m = 23.8$ and $m = 87.7$) (Mann-Whitney, $P = 0.037$ and $P = 0.012$).

This results show that either the CART or the CNR1 gene are associated with

human obesity-related phenotypes in a gender-dependent way, since no significant result was found in females.

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

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1. Considerações Gerais - Definindo o Problema da Obesidade

A obesidade é o resultado de uma disfunção crônica do balanço energético. O equilíbrio entre o consumo alimentar e o gasto energético determina, inicialmente, a quantidade de energia estocada no corpo. Quando a ingestão excede o gasto, ocorre uma expansão dos adipócitos e, em alguns casos, o aumento do número dessas células. Hipertrofia e hiperplasia de adipócitos representam a única patologia da obesidade. Entretanto, o aumento dessas células pode induzir outros distúrbios metabólicos e levar, eventualmente, a outras doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, complicações respiratórias, entre outras. Desconhece-se se o ganho de peso é causado por um aumento da ingestão de alimentos, ou pela diminuição da perda de energia, podendo variar em cada caso. Provavelmente, a obesidade seja o resultado desse gasto prejudicado e de um ambiente sem atividade física, no qual alimentos altamente palatáveis estão facilmente disponíveis. Desta forma, a consequência desse desbalanço é o acúmulo de gordura (Ravussin e Bouchard, 2000). A obesidade pode ser definida, assim, como um estado do aumento do peso corporal, mais especificamente do tecido adiposo, de magnitude suficiente para produzir consequências adversas à saúde (Spiegelman e Flier, 2001).

São muitos os fatores que atuam contra o aumento do ganho de peso, sendo, provavelmente, o maior deles nas sociedades ocidentais, a discriminação social pelos quais passam indivíduos com sobrepeso ou obesos (Puhl e Brownell, 2001). A obesidade carrega um estigma social de gula e preguiça. Outro fator que desfavorece o aumento de peso é o desconforto físico associado com a obesidade, o qual reduz substancialmente a qualidade de vida dessas pessoas (Han e cols., 1998). Para alguns indivíduos obesos, a insatisfação com o corpo, o desconforto físico e a estigmatização social podem desencadear ou aumentar eventos de depressão, ansiedade, sentimentos de baixa auto-estima e culpa. Algumas das consequências 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 ganho de peso (Swinburn e Egger, 2004).

O aumento da prevalência da obesidade em todo o mundo 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). Em países desenvolvidos, a condição socioeconômica está fortemente associada com a obesidade, onde existe uma alta prevalência da doença em grupos com baixa renda familiar (Swinburn e Egger, 2002). A obesidade leva à redução de oportunidades para trabalho, educação, relacionamentos e inclusão social (Stunkard, 1996) e isso parece ser mais potente em mulheres do que em homens. Igualmente, um baixo salário diminui a possibilidade de uma alimentação saudável. Desta forma, bairros com baixo status socioeconômico tendem 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.

O excesso de peso (ou sobrepeso) e a obesidade são definidos clinicamente pelo índice de massa corporal (IMC). Esse índice, que é calculado pela razão peso em kg/(altura em m)², 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 kg/m² é classificado como sobrepeso e que um IMC igual ou superior a 30 kg/m² é classificado como obesidade. Um IMC igual ou superior a 40 kg/m² é diagnóstico de obesidade mórbida.

A prevalência de obesidade aumentou em todo o mundo mais de 75% desde 1980. A urbanização, as rápidas mudanças tecnológicas e a disponibilidade de alimentos palatáveis têm alterado o modo de vida das pessoas. No mundo, mais de um bilhão de adultos apresentam sobrepeso ou são obesos. 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).

I.2. Predisposição Genética e Interações Ambientais

A atual epidemia da obesidade no mundo tem se desenvolvido somente há três décadas, não podendo, assim, ser explicada somente por modificações do genoma humano. O rápido ganho de peso de uma população é, provavelmente, melhor explicado por alterações ambientais que promovem um aumento do consumo e uma redução do gasto energético. Assim, a maioria dos casos de obesidade surge não como um resultado de um defeito biológico, mas através de comportamentos mal adaptados conduzidos por um ambiente obesogênico. Dessa forma, a susceptibilidade à obesidade é parcialmente determinada por fatores genéticos, mas um ambiente “obesogênico” é necessário para a sua expressão fenotípica (Loos e Rankinen, 2005).

Existe uma relação sinérgica entre genótipo e ambiente: na presença da predisposição genética à obesidade, a severidade da doença é amplamente determinada pelo estilo de vida e pelas condições ambientais. 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 peso ou nenhum. Desta forma, é aceito que o estilo de vida, bem como fatores ambientais têm influência no balanço energético positivo e na deposição de gordura (Loos e Bouchard, 2003). 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).

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. Atualmente, 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

desordens 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: controle da ingestão alimentar, controle do gasto energético e controle do armazenamento de energia. Por ser o foco de estudo desse trabalho, apenas o controle da ingestão alimentar será discutido 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. Por último, devemos considerar que todos esses processos são coordenados por mecanismos integrativos (Palou e cols., 2000).

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 e insulina 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). 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 (doença gerada pela falta de insulina) 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).

Quando o gene *ob* foi clonado em dezembro de 1994 (Zhang e cols., 1994) e seu produto protéico (posteriormente chamado leptina) foi descrito, os mecanismos do controle da ingestão alimentar, do gasto energético e das reservas de gordura começaram a ser entendidos e relacionados. 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).

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 α -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 α -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 1a)(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 α -MSH e CART, já que estimulam o apetite e diminuem o metabolismo (Figura 1b)(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).

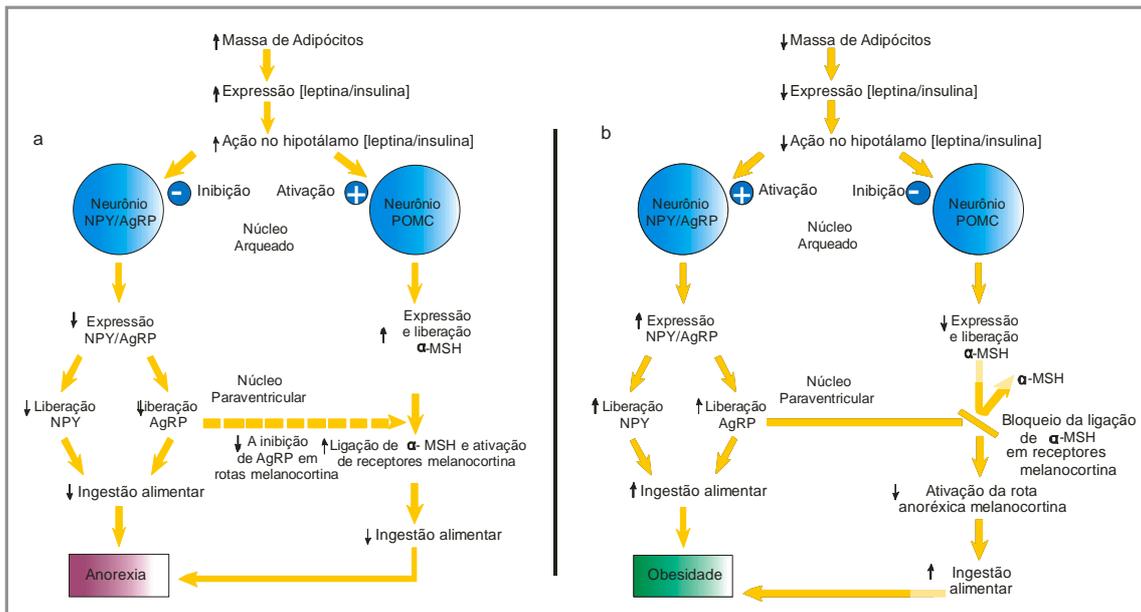


Figura 1 - Papel dos neurônios hipotalâmicos na sinalização da adiposidade. **a.** Leptina/insulina no núcleo arqueado inibe a rota anabólica NPY/AgRP e estimula a rota catabólica POMC, resultando na redução da ingestão alimentar e anorexia. **b.** Rota de sinalização na deficiência de leptina/insulina, onde ocorre o bloqueio dos receptores MC4 e aumento da ingestão alimentar, levando à obesidade (adaptado de Schwartz e cols., 2000).

AgRP e α -MSH têm efeitos antagônicos. Ambos ligam-se ao receptor MC4. Enquanto que o α -MSH é o agonista desse receptor, AgRP é o antagonista natural, que bloqueia a estimulação por α -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, a 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 β estão entre a crescente lista de peptídeos que promovem o balanço energético negativo quando estimulados por leptina (Figura 2)(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.

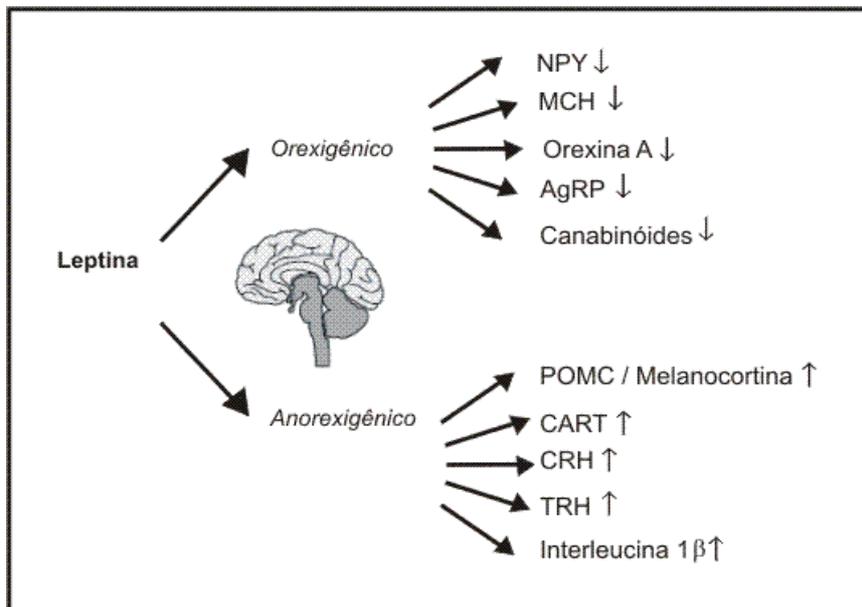


Figura 2 – Visão esquemática do efeito da leptina na regulação da ingestão alimentar através de fatores neuroendócrinos. NPY, neuropeptídeo Y; MCH, hormônio concentrador de melanina; AgRP, proteína relacionada a agouti; POMC, pro-opiomelanocortina; CART, transcrito regulado por cocaína e anfetamina; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; TRH, hormônio liberador de tirotrófina (adaptado de Trayhurn, 2005).

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; Fiegenbaum e Hutz, 2003). Esses estudos já identificaram associação em 6 genes dos 12 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, desses genes estudados, três envolvidos no controle da ingestão alimentar apresentaram resultados estatisticamente significativos em estudos de associação com fenótipos relacionados à obesidade humana. Mattevi e cols. (2002) encontraram associação de um polimorfismo no gene neuropeptídeo Y (NPY) em mulheres na pré-menopausa e de um outro no gene receptor da leptina (LEPR) em indivíduos não fumantes, enquanto que Fiegenbaum e Hutz (2003) detectaram associação de variantes do gene APOA-IV apenas em homens. Ao lado desses, Mattevi e cols. (2004) encontraram associação de um polimorfismo no gene da resistina (RETN), o qual está relacionado com o processo de termogênese, também em mulheres na pré-menopausa. Esses dados nos indicam que tais genes, de uma forma geral, parecem contribuir para o desenvolvimento da obesidade nessa população de um modo gênero-dependente. Além disso, tais resultados demonstram o relevante papel dos estudos de associação na identificação de variantes gênicas que interferem na susceptibilidade às doenças complexas, especialmente dentro de um contexto biológico e ambiental.

Anualmente, 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 haviam sido relatados com associação positiva em estudos publicados.

Para este trabalho, foram selecionados dois genes candidatos à obesidade, ambos atuantes no sistema nervoso central e incluídos em uma das três vias principais envolvidas na homeostase energética: a ingestão alimentar. São eles: o transcrito regulado por cocaína e anfetamina - CART e o receptor canabinóide - CNR1. Cabe ressaltar que este segundo gene, CNR1, ainda não consta na lista de genes com associação positiva no Mapa Genético da Obesidade. Este trabalho seria, então, um dos pioneiros na inclusão desse gene como um possível candidato à obesidade humana.

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.

I.4.1. O Gene CART – Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina

Como mencionado anteriormente, a regulação do apetite e do balanço energético é um sistema composto por duas rotas opostas, orexigênica e anorexigênica, onde o equilíbrio entre ambas é determinado pelo comportamento alimentar do indivíduo. Cada uma dessas rotas é um sistema com múltiplos fatores regulatórios, incluindo-se os neuropeptídeos. O peptídeo transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) é um componente da via anorexigênica desse sistema de regulação (Kristensen e cols., 1998). Esse peptídeo foi primeiramente isolado a partir do hipotálamo de ovinos (Spiess e cols., 1981) e, então, descoberto como um transcrito de mRNA regulado no cérebro pela administração de cocaína e anfetamina em ratos (Douglass e cols., 1995).

O transcrito CART, em ratos, apresenta 700 ou 900pb de comprimento, sendo esta variação, provavelmente, um resultado de “splicing” alternativo ou de diferentes comprimentos de poliadenilação na extremidade 3’ do transcrito. Além disso, o mesmo é formado por 3 exons e codifica uma propeptídeo de 116 ou 129 aminoácidos, sendo pouco conhecido seu processamento e sua forma bioativa (Barrett e cols., 2002). A clivagem da sequência sinal na região aminoterminal do propeptídeo resulta em dois peptídeos contendo 89 e 102 aminoácidos, respectivamente. Embora o mRNA e o peptídeo CART sejam altamente conservados entre roedores e humanos, não existe ocorrência de “splicing” alternativo nesses últimos. Dessa forma, o mRNA de humanos apresenta 92% de homologia como o transcrito menor de ratos e 95% de homologia quando se trata de aminoácidos. A maioria dos trabalhos que investigam os efeitos do CART na regulação da homeostase energética foram desenvolvidos utilizando o peptídeo de 102 aminoácidos e, embora o transcrito endógeno seja processado de forma tecido-específico, todos os peptídeos isolados até o momento apresentaram o menor tamanho. Isso sugere que a forma maior do peptídeo possa não ser relevante fisiologicamente (Murphy, 2005).

O peptídeo CART mostra-se com ampla distribuição de expressão dentro do cérebro, sendo abundante em muitas áreas envolvidas na regulação do apetite e do balanço energético, tanto em humanos quanto em murinos. Tal fato reflete a possibilidade de que esse neuropeptídeo tenha uma função similar em regiões hipotalâmicas de ambos os

grupos. Entre essas áreas, encontram-se o núcleo arqueado hipotalâmico, o núcleo ventromedial, o núcleo medial dorsal, o hipotálamo lateral e o núcleo paraventricular (Douglass e cols., 1995; Broberger, 1999; Vrang e cols., 1999). O CART é também expresso em outras regiões do eixo adrenal pituitário hipotalâmico, principalmente na glândula pituitária e na medula da glândula adrenal (Couceyro e cols., 1997). O papel deste peptídeo derivado periféricamente é desconhecido, mas pode ter uma importante função neuroendócrina. Entretanto, a presença do CART em regiões hipotalâmicas do cérebro sugere um possível envolvimento do mesmo na regulação do apetite. Esse fato está sendo confirmado através de muitas observações, incluindo a ativação da expressão do transcrito no núcleo arqueado após a administração intracerebroventricular (ICV) do hormônio leptina em ratos não alimentados (Kristensen e cols., 1998). Dentro do núcleo arqueado, o mRNA CART colocaliza-se com o peptídeo anorexigênico precursor de melanocortina (POMC), sendo que ambos mostram uma resposta coordenada à leptina (Elias e cols., 1998). Concomitantemente, existem evidências de que a expressão de CART no cérebro seja regulada por dopamina de maneira recíproca (Beaudry e cols., 2004). Isso porque a adição de cocaína pode ocasionar mudanças no sistema mesolímbico dopaminérgico, fazendo com que o CART apresente uma série de efeitos sobre a dopamina no SNC. Até o momento não foi identificado algum receptor de CART, um fato que limita um maior entendimento da função desse transcrito.

A expressão de CART é inibida em dois modelos murinos de obesidade, os quais apresentam a sinalização de leptina defeituosa: o camundongo *ob/ob* e o rato *fa/fa*. Nesses animais, em jejum, a expressão de CART é diminuída. Ao lado disso, observa-se que a administração ICV de CART inibe o neuropeptídeo Y (NPY). Quando se realiza a administração ICV de anticorpos para CART obtêm-se um aumento de absorção noturna de alimentos (alimentação induzida) (Kristensen e cols., 1998). Associados aos efeitos alimentares, esse trabalho verificou que a administração de CART gerou distúrbios motores severos nos primeiros quatro dias de tratamento. A presença dessas anormalidades comportamentais sugere que a redução da ingestão alimentar posterior à administração desse neuropeptídeo possa ser, mais provável, um resultado dessas mudanças no comportamento, do que um verdadeiro efeito anorético. Entretanto, não se tem conhecimento se a administração ICV de baixas doses de CART, as quais levam a

pequenas, mas significativas, reduções na ingestão alimentar, também cause efeitos comportamentais. Larsen e cols. (2000) mostraram que a contínua administração ICV em ratos de doses moderadas de CART durante sete ou dez dias diminui a alimentação e o peso corporal de forma dose-dependente, embora esses efeitos sejam restritos somente aos cinco primeiros dias de tratamento. Rohner-Jeanrenaud e cols. (2002) verificaram, além desses efeitos, uma redução dos níveis plasmáticos de insulina e leptina e um aumento da oxidação lipídica. O fato de longos tratamentos estarem associados a pequenos efeitos foi corroborado por Kong e cols. (2003), através da observação de que injeções do peptídeo CART em ratos duas vezes ao dia durante uma semana reduz a ingestão alimentar diária, mas não afeta a ingestão energética e o peso corporal de uma forma geral.

Em camundongos transgênicos com ausência do transcrito CART, foi descrito que a deleção desse gene não tem grande impacto na aquisição alimentar (calorias) quando alimentados segundo uma dieta regular, mas apresenta uma predisposição à obesidade, quando as dietas alimentares são altamente calóricas (Asnicar e cols., 2001). Entretanto, apesar das evidências de que o NPY tenha um papel central na indução do apetite, camundongos com o gene que codifica esse neuropeptídeo nocauteado apresentam a alimentação e o crescimento normalizados, o que sugere uma forte evidência de que exista um mecanismo compensatório relacionado com o sistema de regulação da ingestão alimentar. Devido a esses resultados, tais estudos têm mostrado o papel do CART na regulação do apetite e do balanço energético, os quais podem ser relevantes para a regulação do peso em populações humanas.

Diferente dos resultados observados após a administração ICV de CART (Kristensen e cols., 1998), Abbott e cols. (2001) encontraram que a administração desse neuropeptídeo diretamente em determinadas áreas hipotalâmicas de ratos não alimentados aumentou significativamente a ingestão alimentar. Nesse caso, os efeitos de CART no gasto energético parecem ser contraditórios aos esperados por neuropeptídeos orexigênicos. Entretanto, tal contradição torna-se menos evidente se considerarmos que o CART tem um importante papel no processo adaptativo a baixas temperaturas. Dessa forma, se esse transcrito faz parte de um sistema que aumenta a produção de calor sob condições estressantes de temperatura, é plausível de se imaginar que o mesmo possa tanto aumentar a ingestão alimentar, quanto a produção de calor. Resultados similares foram encontrados em

animais que superexpressavam CART, os quais perderam mais peso do que os controles após 24 horas de jejum, sugerindo um alto gasto energético. Entretanto, a exposição crônica a baixas temperaturas aumentou dramaticamente a expressão desse neuropeptídeo no núcleo arqueado, o que, juntamente com os efeitos termogênicos e orexigênicos, sugere que o CART tenha um papel relevante na adaptação ao frio nessa região (Kong e cols., 2003). Outro aspecto importante de se observar, é que a resposta alimentar após a administração de CART (Abbott e cols., 2001) é atrasada quando comparada com a ação imediata de outros neuropeptídeos orexigênicos. As razões para que isso ocorra ainda não estão claras, contudo, é possível que o CART possa influenciar a liberação de outros efetores dentro do hipotálamo, estimulando a liberação de peptídeos orexigênicos e/ou reduzindo a de anorexigênicos, causando, portanto, esse eventual efeito no apetite. Assim, pode-se assumir que o CART apresente múltiplos papéis com diferentes funções na homeostase energética, onde um distinto circuito no apetite dentro do hipotálamo deva sinalizar para ambas vias orexigênica e anorexigênica. Certamente, parece viável que o CART, como um intermediário de sistemas neuronais aparentemente distintos, possa transmitir mensagens opostas entre diferentes populações neuronais em diversas regiões do hipotálamo (Murphy, 2005).

São diversos os estudos que relacionam o gene CART com a obesidade humana. Esse gene é um candidato posicional para a obesidade já que localiza-se no cromossomo 5q13-14 (Douglass e Daoud, 1996; Echwald e cols., 1999), o qual tem-se mostrado um loco de susceptibilidade para essa doença (Hager e cols., 1998). Muitos desses trabalhos identificaram polimorfismos nesse gene em indivíduos obesos. Os dados mais convincentes que sugerem o papel desse transcrito na obesidade humana provêm de dois principais estudos. O primeiro deles identificou uma família italiana com história de obesidade precoce (del Giudice e cols., 2001). Os membros heterozigotos para uma mutação com sentido trocado, Leu34Phe, eram severamente obesos na infância e apresentavam, em média, um IMC=39 na vida adulta. Essa mutação não foi observada nos indivíduos não afetados da família, os quais apresentaram um IMC=27, em média. Adicionalmente, um estudo funcional demonstrou que essa mutação pode ter um papel em fenótipos da obesidade por alterar os níveis desse peptídeo no seu local de ação (Dominguez e Kuhar, 2004). No segundo trabalho, Yamada e cols. (2002) seqüenciaram e caracterizaram o

promotor do gene CART de 30 japoneses obesos, com o objetivo de verificar se haveria alguma contribuição deste gene para o desenvolvimento dessa doença. A partir desse estudo, foram encontrados seis polimorfismos comuns nessa região: -156A>G, -390T>C, -484T>G, -915G>T, -929G>C e -967C>T, a partir do sítio de início de transcrição. Esse promotor é composto por uma região CRE e quatro motivos de consenso CANNTG (designados Ebox), localizados a 5' do TATA box, elemento de regulação da expressão gênica (Yamada e cols., 2002; Barrett e cols., 2002). Como resultado, dos seis sítios polimórficos identificados, somente a transposição -156A>G foi associada com um alto IMC nessa população. Recentemente, Guérardel e cols. (2005) realizaram estudos de associação em uma população francesa e verificaram que um outro polimorfismo na região promotora, -3608T>C, tem um papel importante na susceptibilidade para a obesidade. Esse trabalho demonstrou, ainda, através de estudos funcionais, que esse polimorfismo pode modular o sítio de ligação da proteína. Portanto, esse terceiro trabalho contribui ainda mais para aumentarem as evidências de que esse gene seja relevante para o desenvolvimento dessa doença em humanos.

Em adição a esses polimorfismos, foi encontrada uma rara substituição de aminoácidos com sentido trocado, Ser66Thr, no exon 2 do gene CART, a qual não está claramente relacionada com o fenótipo obeso. Em contrapartida, dois polimorfismos comuns foram descritos dentro da região 3' não traduzida (3' UTR) do exon 3. A primeira mutação, 1475A>G, localiza-se a 39pb em 3' a partir do códon de terminação. A segunda variante é uma deleção de adenina na posição 1457 (Δ A1457), a 21 nucleotídeos em 3' a partir do códon de terminação. Ambos polimorfismos (1475A>G e Δ A1457) encontram-se em desequilíbrio de ligação e não apresentaram qualquer associação significativa com IMC. Em contraste, homens heterozigotos para a variante 1475A>G mostram significativamente menor proporção cintura-quadril e níveis diminuídos de insulina plasmática e triglicerídios em jejum (Challis e cols., 2000). Também na região 3' UTR foi encontrado um polimorfismo de inserção/deleção de uma adenina na posição 1355, igualmente não associado à obesidade (Yamada e cols., 2002).

Dentre esses sítios polimórficos, foi escolhida, para esse trabalho, a substituição -156A>G, principalmente, pelo fato do alelo variante apresentar alta frequência (aproximadamente 0,34) e estar significativamente associado com alto IMC em uma

amostra de pacientes japoneses (Yamada e cols., 2002).

I.4.2. O Gene CNR1– Receptor Canabinóide 1

A *Cannabis sativa* (marijuana) tem sido cultivada por mais de 5 mil anos, tanto para a obtenção de fibras para a fabricação de têxteis, quanto para prover uma variedade de extratos de uso medicinal e recreativo. Até o presente, a marijuana e outros derivados psicoativos de *Cannabis sativa* representam a maioria das drogas ilegais consumidas no mundo ocidental. Contudo, paralelamente aos problemas sociais relacionados ao abuso dessas substâncias, comunidades sociais e científicas têm, recentemente, começado a ficar atentas aos potenciais terapêuticos dos canabinóides e aos novos compostos sintéticos que interferem no sistema canabinóide endógeno (Burstein, 1997; Di Marzo e cols., 1998).

O efeito estimulante do apetite que a marijuana causa em humanos tem sido observado durante séculos, estando esse estímulo relacionado, principalmente, a doces e a alimentos palatáveis (Abel, 1975). Muitos trabalhos já demonstraram que a administração de canabinóides estimula a ingestão alimentar em modelos animais (Williams e cols., 1998; Koch, 2001). Entretanto, somente há poucos anos esse fenômeno foi seriamente levado em consideração nas pesquisas. Desde a descoberta dos receptores canabinóides e seus ligantes endógenos (endocanabinóides), está sendo proposta a existência de um sistema canabinóide endógeno, fornecendo bases fisiológicas para os efeitos biológicos induzidos pela marijuana e seus derivados (Cota e cols., 2003). Ao lado disso, o alto grau de conservação evolutiva entre diferentes espécies enfatiza o papel fisiológico fundamental dos canabinóides nas funções cerebrais (De Petrocellis e cols., 1999).

Após inúmeras investigações científicas dentro dos numerosos constituintes químicos da *Cannabis* e seus mecanismos de ação (Porter e Felder, 2001), identificou-se a estrutura de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) como o principal ingrediente psicoativo da marijuana (Revisão em Cota e cols., 2003). Esse composto, bem como o seu análogo sintético nabilone, estão sendo prescritos para amenizar sintomas de náusea e vômitos em pacientes com câncer desde a metade dos anos 80 e para prevenir a perda de peso em

pacientes com AIDS desde 1992 (Di Marzo e Matias, 2005). Os dois primeiros canabinóides endógenos, ou endocanabinóides, foram descobertos no início dos anos 90, sendo eles a anadâmida (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. 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 Δ^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. Também foi verificado que o mRNA hipotalâmico de CB1 colocaliza com o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), com o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e com o hormônio concentrador de melanina (MCH). Nesse estudo, camundongos que tiveram o receptor CB1 bloqueado (gene nocauteado – *CB1* *-/-*) apresentaram a expressão de CRH aumentada no núcleo paraventricular e níveis reduzidos de CART no núcleo medial dorsal e no hipotálamo lateral. Ao lado disso, os mesmos exibiram uma redução na ingestão calórica e, como consequência, uma redução na massa de gordura total, diminuindo, assim, o peso corporal. Na mesma direção, Di Marzo e cols. (2001) observaram que camundongos deficientes de CB1, ou tratados com antagonistas do receptor, também 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 endocanabinóides através de seus receptores CB1 previamente estabelecido (Di Marzo e cols., 2004), sugerem que esse sistema controla a ingestão alimentar em dois principais níveis. 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 endocanabinóides nessas áreas estimula a ingestão alimentar em ratos (Jamshidi e Taylor, 2001; Kirkham e cols., 2002). Além disso, os níveis de endocanabinóides são maiores nessas regiões durante a privação e menores durante o consumo alimentar, como o esperado para um mediador orexigênico. No hipotálamo, essas mudanças nos níveis parecem ser inversamente correlacionadas com aquelas que ocorrem

nos níveis de leptina na circulação. De fato, a leptina diminui os níveis de endocanabinóides no hipotálamo mais do que o faz para outros neuropeptídeos orexigênicos (Di Marzo e Matias, 2005).

O sistema endocanabinóide cerebral parece ser bastante relevante no controle da ingestão alimentar em roedores jovens (Cota e cols., 2003), principalmente em camundongos recém-nascidos. Isso, porque o bloqueio farmacológico de receptores CB1 no primeiro dia após o nascimento leva à supressão da sucção e da ingestão de leite, podendo, eventualmente, conduzi-los à morte (Fride, 2004). Camundongos recém-nascidos deficientes de CB1 também ingerem menos leite, mas com conseqüências letais inferiores. Essas observações são particularmente notáveis pelo fato de os canabinóides endógenos, como o 2-AG, apresentarem um pico em seus níveis no cérebro de ratos após o nascimento, assim como altas concentrações no leite materno, o que evidencia o papel crítico dos receptores CB1 no controle motor da sucção durante o desenvolvimento neonatal. Entretanto, Hanus e cols. (2003) relataram que o 2-AG hipotalâmico diminui após 12 dias de restrição alimentar. Para explicar esses resultados, os autores sugerem que essa diminuição ocorra como estratégia adaptativa comportamental em decorrência de uma restrição alimentar aguda ou crônica. Assim, durante um período inicial de jejum, é benéfico que o animal apresente altos níveis de endocanabinóides para induzi-lo a procurar alimento. Porém, durante um longo período de restrição alimentar, quando, aparentemente nenhum alimento foi encontrado, conservar a energia através da redução na motivação pela procura de alimento pode ser necessário para ajudar na sobrevivência desses animais (Fride e cols., 2005).

Em suma, estes estudos com animais sugerem a relevância do sistema endocanabinóide na indução da ingestão alimentar, já que a mesma é ativada após um breve período de jejum e/ou de exposição a alimentos palatáveis, tendo como resultado a indução do apetite, a redução da sensação de saciedade, estímulo da lipogênese e diminuição do gasto energético (Di Marzo e Matias, 2005). O efeito desse sistema na lipogênese é corroborado pela presença de receptores CB1 em adipócitos brancos. Nessas células, a indução de CB1 leva à ativação da lipoproteína lipase (Cota e cols., 2003) e o bloqueio causa a superexpressão de adiponectinas, um hormônio crucial para a redução da expressão de enzimas envolvidas na lipogênese (Bensaid e cols., 2003; Poirier e cols.,

2005). O sustento da indução desse sistema, limitado aos tecidos controladores do balanço energético, pode, então, contribuir para o desenvolvimento da obesidade e de outras síndromes metabólicas. Essa hiperatividade deve ser a consequência de uma dieta rica em ácidos graxos, a qual aumenta a disponibilidade desses precursores para a biossíntese dos endocanabinóides, bem como deve ser sustentada pela resistência à leptina, que normalmente contribui para o desenvolvimento dessa doença (Di Marzo e Matias, 2005).

A ampla expressão de CB1 no núcleo hipotalâmico constitui uma forte indicação de que o sistema endocanabinóide está diretamente envolvido na regulação alimentar (Breivogel e Childers, 1998). Ao passo que defeitos em rotas sinalizadoras anorexigênicas quase sempre levam à obesidade, a perda de NPY em camundongos mutantes não resulta em um fenótipo magro (Erickson e cols., 1996). Este resultado sugere a presença de um mecanismo compensatório que é ativado quando a sinalização de NPY está ausente. Os endocanabinóides podem ser possíveis candidatos na substituição da ativação por NPY, já que a administração do antagonista de CB1, SR141716A (ou Rimonabante), suprime a ingestão alimentar tanto em camundongos com NPY nocauteado, quanto nos selvagens. Tais dados parecem confirmar que o NPY e os endocanabinóides promovem a ingestão alimentar de forma independente um do outro (Di Marzo e cols., 2001). Assim como essa, outras evidências sugerem que o sistema canabinóide possa ser no futuro um importante alvo terapêutico no tratamento da obesidade.

Em adição ao papel modulador na ingestão alimentar, o sistema canabinóide está envolvido em muitas funções psicológicas. Uma variedade de efeitos foi sumarizada por Di Marzo e cols. (1998): “diminuição na sensação de dor, redução do controle dos movimentos, relaxamento, fome, esquecimento, sono e proteção”. A ativação do sistema canabinóide endógeno parece representar um componente importante e crucial para cada uma dessas funções.

Diversos estudos demonstraram alguma relação do sistema endocanabinóide com a obesidade em modelos murinos e também em humanos. Entretanto, tais investigações, até o presente, não foram suficientes para incluir o gene CNR1 (o qual codifica o receptor canabinóide 1 – CB1) no Mapa Genético da Obesidade Humana (Pérusse e cols., 2005) como um gene candidato em estudos de associação. Uma das principais dificuldades apresentada nesses trabalhos são os diferentes efeitos no apetite causados pelo Δ^9 -THC,

presente em cigarros de marijuana. Observa-se que altas doses geram uma diminuição inicial na ingestão alimentar, seguida por um subsequente acréscimo, enquanto que baixas doses levam somente ao estímulo do apetite (Gagnon e Elie, 1975). Na mesma direção desses dados, antigos escritos indígenas descrevem o uso de *Cannabis* para superar a sensação de fome. Este efeito pode ser explicado pelas diferenças no potencial das preparações da droga. Desde 1939, verificou-se que a preparação fraca atua como um estimulante, enquanto que a preparação mais forte inibe o apetite (Revisão em Cota e cols., 2003). Ao lado disso, o uso recreativo da marijuana comumente ocorre em um grupo social, podendo o efeito estimulante do apetite também ser dependente da facilitação social e de um ambiente de familiaridade.

Gerard e cols. (1991) isolaram o cDNA codificante do receptor canabinóide e descreveram uma seqüência de aminoácidos de um único exon que codifica uma proteína de 472 resíduos, a qual apresenta sete regiões altamente hidrofóbicas, comuns entre a família dos receptores acoplados à proteína G. O receptor CB1 também apresenta algumas características farmacológicas, incluindo a inibição de AMP cíclico (Howlett e Fleming, 1984), a inibição dos canais de cálcio (Mackie e Hille, 1992) e a alteração nos canais de potássio (Hampson e cols., 1995). O gene CNR foi geneticamente e fisicamente mapeado no cromossomo 6q14-q15 (Hoehe e cols., 1991).

Diferentes polimorfismos foram descritos para o gene humano CNR. Gadzicki e cols. (1999) descreveram uma mutação silenciosa muito comum em populações germânicas, que resulta na substituição do nucleotídeo G pelo A na posição 1359 do códon 453 (Thr). Outro polimorfismo está localizado em um íntron na região 5' a aproximadamente 14Kb do códon de iniciação, o qual é constituído por um RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) para a enzima de restrição HindIII (Caenazzo e cols., 1991). Somando-se a estes, Dawson (1995) descreveu um polimorfismo do tipo microssatélite no gene CNR. Essa variante possui nove alelos contendo seqüências de repetição AAT que variam de 12 a 20 cópias. Outras quatro mutações na região codificante foram descritas para esse gene em pacientes com epilepsia, sendo que as três primeiras levam à substituição de aminoácidos (Kathmann e cols., 2000).

Muitos desses polimorfismos estão sendo utilizados em estudos de associação do gene CNR1 com doenças psiquiátricas e abuso de drogas em diferentes populações.

Entretanto, não são encontradas referências na literatura relacionando tais polimorfismos com a obesidade. Para esse trabalho, foi escolhido o polimorfismo silencioso 1359G>A do códon 453 (Thr), principalmente, pelo fato do alelo variante apresentar alta frequência (0,24) em populações européias (Gadzicki e cols., 1999). A frequência desse polimorfismo é significativamente diferente entre populações derivadas de europeus, afro-americanas e japonesas, sendo mais alta nas primeiras do que nas demais (Onaivi e cols., 2002).

1.5. Justificativa e Objetivos

A obesidade tem sido reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como um dos dez principais problemas de saúde nas mais diversas sociedades (World Health Organization, 1998). Nos últimos 50 anos, a disponibilidade ilimitada de alimentos nos países desenvolvidos tem comprometido seriamente nossos sistemas biológicos controladores da ingestão alimentar e do balanço energético. 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. Espera-se que esses estudos sejam capazes de conduzir-nos a novos conceitos terapêuticos contra a obesidade (Gura, 2003).

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 e cols., 2002; Fiegenbaum e Hutz, 2003), decidiu-se verificar polimorfismos de genes relacionados à via de sinalização da leptina, os quais estejam, possivelmente, envolvidos na patogênese da obesidade humana.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

1. Determinar as frequências alélicas e genotípicas em dois polimorfismos, localizados nos genes CART (-156 A>G) e no gene CNR1 (1359 G>A).
2. Realizar estudos de associação entre essas variantes, o índice de massa corporal (IMC) e a circunferência da cintura em uma amostra da população derivada de europeus de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Capítulo II

**Obesity-related phenotypes are associated with CART and
CNR1 gene polymorphisms**

Manuscrito em preparação

Obesity-related phenotypes are associated with CART and CNR1 gene polymorphisms.

Janaína P. Jaeger ¹, Vanessa S. Mattevi ², Mara H. Hutz ¹

¹ Departamento de Genética, Universidade federal do Rio grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, ² Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Campus II - RS 239, nº 2755, 93352-000 Novo Hamburgo, RS, Brazil.

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 3316-6720
Fax . 55 51 3343-5850
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Short running head: CART and CNR1 polymorphisms and obesity

Correspondence: Prof. Mara H. Hutz, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil Tel 55 51 3316-6720
Fax . 55 51 3343-5850, E-mail: mara.hutz@ufrgs.br.

Abstract

OBJECTIVE: To investigate the association between CART and CNR1 gene polymorphisms with obesity-related traits in a Brazilian population of European descent.

METHODS: A total of 693 individuals were genotyped for CART -156A>G and CNR1 1359G>A gene polymorphisms by PCR-RFLP methods. Differences in allele and genotype frequencies between normal-weight and overweight/obese groups were tested by chi-square test. Adjusted mean BMI and WC were compared among genotypes by analysis of variance or Student's *t*-test.

RESULTS: The CART -156A allele was associated with higher BMI and WC in males ($P= 0.035$ and $P= 0.038$, respectively). Carriers of the CNR1 1359G allele had a larger waist circumference and higher body mass index than individuals homozygous for the 1359A allele ($P= 0.012$ and $P= 0.037$, respectively). No significant association of both CART and CNR1 polymorphisms with BMI and waist circumference was seen in the female sample.

CONCLUSION: Our findings suggest that CART and CNR1 gene polymorphisms are associated with obesity-related traits. However, these associations are restricted to males.

KEYWORDS: obesity, association, CART, CNR1, polymorphisms

Introduction

Obesity is a major predisposing factor for several chronic diseases including coronary artery disease and diabetes. It arises from complex interactions between 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. This biochemical process is one of the main types related to obesity. Thus, the list of genetic markers associated with it has increased in the last few years.¹

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 neuropeptide cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) is one component of the anorexigenic arm of the appetite and energy-balance regulation system.² CART is expressed abundantly in several areas of the brain involved in this regulation system. These areas include the hypothalamic arcuate nucleus, dorsal medial nucleus, lateral hypothalamus, and paraventricular nucleus.³⁻⁵ Leptin has been shown to be one of the strongest regulators of CART mRNA levels in the hypothalamus. This neuropeptide acts reducing food intake² and increasing thermogenic response in rats.⁶ The human CART gene maps to human chromosome 5q13-14,^{7,8} which has been shown to be a susceptibility locus for obesity.⁹ The 2004 update of the Human Obesity Gene Map¹ reported two previous studies with evidence for the presence of an association of the CART gene and obesity-related phenotypes. Challis *et al*¹⁰ demonstrated that homozygous men for the 1475A>G variant had significantly lower waist-to-hip ratio (WHR), fasting plasma

insulin, and fasting triglycerides than homozygous individuals for the wild allele in a British population sample from the Isle of Ely cohort. The second study that supports a role for CART in human obesity, examined polymorphisms in the promoter region of the CART gene. As a result, six common polymorphisms were identified, and from all the six polymorphic sites, only the substitution of A to G at -156 was associated with increased BMI.¹¹ Recently Guéradel *et al*¹² screened the CART gene for sequence variation in relation to obesity in a French population and concluded that this gene has a modest contribution to the genetic susceptibility to obesity. In addition, a Leu to Phe mutation at position 34 from the CART gene has been reported to cosegregate with obesity in an Italian family.¹³ Cota *et al*¹⁴ have demonstrated that CART colocalizes with CB1 cannabinoid receptors, involved in feeding behavior in the paraventricular nucleus, dorsal medial nucleus, and lateral hypothalamus.

The cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene was genetically and physically mapped to chromosome 6q14-15.¹⁵ This first cannabinoid receptor, which is also the most abundant in the brain, was named CB1 after the cloning of the second cannabinoid receptor subtype CB2, mostly present in immune cells.¹⁶ The endocannabinoid system may influence food intake by regulating the expression and/or action of several hypothalamic anorectic and orexigenic mediators.^{14,17} In the hypothalamus, the changes in endocannabinoid levels seemed to be inversely correlated with some changes that are known to occur in leptin blood levels. Indeed, leptin decreases endocannabinoid levels in the hypothalamus, as much as it does for other orexigenic mediators.¹⁸ These findings are in agreement with the devastating impact that the disruption of CB1 signaling has on feeding and growth in young mice.^{14,19} A frequent polymorphism that corresponds to a silent mutation (1359G>A) in

codon 453 (Thr) at the coding exon of the human cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene was described.²⁰ Although studies performed in animal models pointed out the relevant role of the endocannabinoid system in positive energy-balance, so far no association studies between variants of this gene and obesity has been performed in humans.¹

This study aimed to verify if sequence variants at the CART and CNR1 genes are associated with obesity related traits in subjects from a Brazilian population of European descent.

Material and Methods

Subjects

The European-derived population from south Brazil where this study was performed is mainly of Portuguese descent, but Italians, Spaniards and Germans have also contributed to its gene pool.²¹ The study was performed in 693 individuals of European descent who were randomly selected from a clinical center at the Federal University of Rio Grande do Sul. All individuals gave their informed consent prior to investigation. A questionnaire was completed, including smoking habits, alcohol consumption, medication intake, regular physical activity in leisure time, menopausal status and hormone consumption (these last two only in women). 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/l²² were excluded from the analysis to avoid the confounding effects of diabetes and its treatment on obesity-related traits.

Anthropometric measurements

The subjects attended the laboratory in the morning after a 12h fast. Blood samples were collected and weight and height were measured. WC was measured at mid-level between the lower rib margin and the iliac crest.²³ Anthropometric variables were used to calculate BMI (weight (Kg) divided by height (m) squared). Overweight was defined for a BMI over 25 Kg/m² and obesity for a BMI over 30 Kg/m², according to the World Health Organization criteria.²⁴

DNA analysis

Genomic DNA was extracted from 5ml anticoagulated venous blood samples using a salting out method.²⁵ The two polymorphic sites at the CART and CNR1 genes were genotyped by PCR-RFLP methods as previously described.^{11,20}

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/m²) and overweight/obese (BMI≥25 kg/m²) groups were compared by chi-square tests. Multiple linear regression models were constructed separately for each sex to perform adjustments of BMI and WC for the effects of biological and environment variables. The variables tested

were age, physical activity, smoking, and hormone consumption (this last one only in women). Age was entered as a continuous variable, and lifestyle factors were included in the regression models as ‘dummy’ variables. Menopausal status and alcohol consumption were not included in the models due to their high correlation with age and smoking respectively.

Mean adjusted BMI and WC were compared among genotypes through analysis of variance (ANOVA) or Student’s *t*-test. Homogeneity of variances was tested using the Levene’s statistic, and *t*-test for unequal variances or nonparametric tests were applied when necessary. The statistical analysis was performed using the SPSS 8.0.0 statistical package.

Results

Subjects’ characteristics

Anthropometric, biological and lifestyle characteristics of the investigated subjects are summarized in Table 1. The individuals were between 15 and 85 years old (43.8 ± 15.1), being 36.8% males. Most of the individuals in our sample (43%) had a normal weight ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$), while 36.8% could be classified as overweight and 20.2% were obese ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$). No differences in age and BMI were observed between male and female subjects but, as expected, a statistically significant finding was the smaller waist circumference in women ($P < 0.0001$). Smoking and physical activity were more frequent in males than in females ($P = 0.035$ and $P < 0.0001$, respectively).

Genotype and allele frequencies

Genotype and allele frequencies of the CART and CNR1 gene variants are shown in Table 2. None of the genotype counting for both CART and CNR1 genes deviated significantly from those expected according to the Hardy-Weinberg equilibrium. No differences in allele frequencies were observed between normal-weight and overweight/obese groups.

Association with body mass index and waist circumference

Adjusted BMI means according to CART genotypes are presented in Table 3. In males, carriers of -156A allele in the CART gene showed a significantly higher BMI than homozygous G/G individuals ($P= 0.035$). Results in the same direction were found when adjusted waist circumference was compared between genotypes (Table 4). Carriers of the -156A allele presented higher WC than non-carriers ($P= 0.038$).

The BMI and WC associations with the CNR1 polymorphism investigated are presented in Table 3 and 4, respectively. Significant associations between BMI and WC with CNR1 1359G>A variant were observed. These results showed that male carriers of at least one copy of the 1359G allele had higher BMI and WC than homozygotes for the A/A genotype ($P= 0.037$ and $P= 0.012$, respectively).

No significant associations of both CART and CNR1 polymorphisms with BMI and waist circumference were seen in the female sample.

Discussion

In the present study, an association of two common polymorphisms in CART and CNR1 genes, which are possibly involved in feeding control, with obesity-related traits was observed in non-diabetic males of European descent.

Although several evidences link the CART gene to the regulation of feeding and body weight,²⁶⁻²⁸ genetic association studies between polymorphic variants of this gene and obesity related phenotypes are still scanty. The data presented here showed that the presence of at least one copy of the –156A allele was associated with a higher BMI and WC in males (Tables 3 and 4). These results concur with those recently reported by Guérardel *et al*¹² who also observed a higher prevalence of the –156A allele in obese French subjects. These two studies, however are discordant in relation to the results reported for Japanese where the –156G allele was the one associated with obesity.¹¹ These conflicting results might be explained by ethnic differences or by a particular environmental influence. CART-deficient animals did not show an increase in body-weight until after the 14th week of a high-fat diet, suggesting that the CART role in obesity requires interactions with the environment.²⁹ Recently an interaction effect between CART A1475G polymorphism and a MC4R variant were observed in association with physical activity.³⁰ Alternatively, it is possible that this common variant in the promoter region is associated with obesity-related phenotypes through linkage disequilibrium with other functional variants in or near the CART gene, as suggested by electrophoretic mobility shift assay data showing no protein-binding at this site.¹² According to these last authors the CART SNP – 3608 T>C might be functional, and may possible contribute to the genetic risk of obesity.

Clearly more investigations with this and other SNPS at the CART gene, as well as more functional studies are clearly needed to understand the genetic contribution of this gene on feeding behavior and the etiology of obesity.

The effect of endocannabinoid system in food intake and energy balance has been addressed previously in animal models.^{14,18,31} The administration of CB1 antagonist SR141716 (Rimonabant)³² has been shown to have an anorexic action in a variety of feeding rodent models.³¹ Di marzo and coworkers¹⁸ reported that SR141716-treated mice and CB1 -/- mice ate significantly less than did control mice following 18 hours of food deprivation. The observation that SR141716 decreases food intake in obese animals suggests that endocannabinoids in the hypothalamus may play a role in hyperphagic responses. In the same direction, Cota *et al*¹⁴ demonstrated that the germline deletion of CB1 in mice results in a phenotype characterized by decreased body weight, reduced fat mass and hypophagia. This study also indicates that even the high number of endogenous orexigenic factors is unable to compensate for the lack of endogenous cannabinoid action, reflecting its crucial role in balancing energy homeostasis. Nevertheless, to the best of our knowledge there is no association study relating CNR1 polymorphisms to obesity. In our present work, we found that males who carry CNR1 1359G allele presented higher BMI and WC than non-carriers homozygotes A/A (Tables 3 and 4). This finding suggests that the CNR1 gene might be a new candidate gene for obesity. However, before reaching definitive conclusions, the results of this study need to be confirmed in other samples and populations.

In addition, it is important to notice that for both CART and CNR1 genes the association was positive only in males. Gender-specific effects of genetic variation on

measures of body mass and composition have been repeatedly demonstrated in several different gene studies.^{1,33,34} These findings reinforce the relevance of the interaction between biological, environmental, and genetic factors in the determination of obesity and other common diseases.

In summary, the results presented here showed further evidence for the association of CART gene variation with obesity-related phenotypes. This work also demonstrated that the CNR1 1359G>A polymorphism was associated with body mass index and waist circumference. As the current study is the first one describing an association between this last gene and obesity, replication in other populations are obviously warranted. The mechanisms by which CART and CNR1 genes could affect BMI and central adiposity are still an open question.

Acknowledgments

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil).

References

1. Pérusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Snyder EE, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res* 2005; **13**: 381-490.
2. Kristensen P, Judge MM, Thim L, *et al.* Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; **393**: 72-6.
3. Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat-brain messenger-RNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 1995; **15**: 2471-81.
4. Broberger C. Hypothalamic cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 1999; **848**: 101-13.
5. Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 1999; **19**: RC5.

6. Kong WM, Stanley S, *et al.* A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J* 2003; **17**: 1688-90.
7. 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.
8. 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.
9. Hager J, Dina C, *et al.* A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 1998; **20**: 304-8.
10. Challis BG, Yeo GS, *et al.* The CART gene and human obesity: mutational analysis and population genetics. *Diabetes* 2000; **49**: 872-5.
11. 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* 2002; **26**: 132-6.

12. Guérardel A, Barat-Houari M, et al. Analysis of sequence variability in the CART gene in relation to obesity in a caucasian population. *BMC Genet* 2005; **6**: 19
doi:10.1186/1471-2156-6-19
13. del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, D'Urso L, Di Toro R, Perrone L. Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes* 2001; **50**: 2157-60.
14. Cota D, Marsicano G, et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; **112**: 423-31.
15. Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh W-T, Modi WS, Gershon ES, Bonner TI. Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biologist* 1991; **3**: 880-5.
16. Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; **68-69**: 619-31.
17. Horvath TL. Endocannabinoids and the regulation of body fat: the smoking is clearing. *J Clin Invest* 2003; **112**: 323-6.

18. Di Marzo V, Goparaju SK, *et al.* Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; **410**: 822-5.
19. Fride E, Ginzburg Y, Breuer A, Bisognot T, Di Marzo V, Mechoulam R. Critical role of the endogenous cannabinoid system in mouse pup suckling and growth. *Eur J Pharmacol* 2001; **419**: 207-14.
20. Gadzicki D, Müller-Vahl K, Stuhmann M. A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Mol Cell Probes* 1999; **13**: 321-3.
21. Salzano FM, Bortolini MC. *The evolution and genetics of Latin American populations*. Cambridge University Press, Cambridge; 2002.
22. Alberti KGMM, 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.
23. World Health Organization. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. World Health Organization: Geneva; 1995.
24. 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.

25. Lahiri DK, Nurnberger JI. Rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 5444.
26. Johansen JE, Broberger C, Lavebratt C, Johansson C, Kuhar MJ, Hokfelt T, Schalling M. Hypothalamic CART and serum leptin levels are reduced in the anorectic (*anx/anx*) mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **84**: 97-105.
27. 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.
28. 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.
29. Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Huhar M. CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2004; **15**: 454-9.
30. Loos RJF, 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 Relat Metab Disord* 2005; **29**: 420-8.
31. Berry EM, Mechoulam R. Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol Ther* 2002; **95**: 185-90.

32. Rinaldi-Carmona M, Barth F, *et al.* SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 1994; **350**: 240-4.

33. Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; **26**:1179-85.

34. Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH. A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. *Hum Genet* 2004; **115**: 208-12.

Table 1: Anthropometric, biological, and lifestyle characteristics of 438 women and 255 men investigated (Data are mean \pm SD)

	Women	Men
Age (years) ^a	42.97 \pm 15.59	45.09 \pm 14.00
Weight (Kg) ^b	65.74 \pm 12.84	77.15 \pm 13.13
Height (cm) ^b	158.31 \pm 6.92	170.87 \pm 6.79
Body mass index (Kg/m ²) ^a	26.26 \pm 4.99	26.44 \pm 4.27
Waist circumference (cm) ^b	88.5 \pm 12.28	95.63 \pm 10.84
Physically inactive (%) ^c	66.2	51.0
Current smokers (%) ^d	34.2	42.4
Hormone consumption	24.9	-

^a Unpaired *t*-test, not significant (P>0.05)

^b Unpaired *t*-test, P<0.0001

^c χ^2 - test, P<0.0001

^d χ^2 - test, P<0.05

Table 2: Genotype and allele frequencies of two 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
CART -156 A>G							
A/A	65	0.22	82	0.21	A	0.45	0.45
A/G	134	0.46	187	0.47	G	0.55	0.55
G/G	94	0.32	125	0.32			
CNR1 1359 G>A							
A/A	16	0.05	18	0.05	A	0.22	0.23
A/G	97	0.33	138	0.36	G	0.78	0.77
G/G	181	0.62	232	0.59			

n= number of individuals

f= genotype frequencies

Table 3: Mean adjusted BMI according to CART and CNR1 genotypes

	Men			Women		
	n	Mean ± SD	P-value	n	Mean ± SD	P-value
CART						
-156 A>G						
A/A	52	26.4 ± 4.3	0.063 ^a	95	26.5 ± 4.9	0.846 ^a
A/G	131	27.1 ± 4.1		188	26.3 ± 4.9	
G/G	68	25.6 ± 3.8		151	26.1 ± 4.8	
CNR1						
1359 G>A						
A/A	9	23.8 ± 3.5	0.107 ^b	25	26.6 ± 4.4	0.628 ^a
A/G	93	26.4 ± 4.7		141	26.5 ± 4.4	
G/G	147	26.5 ± 3.7		265	26.1 ± 5.0	

^aANOVA

^bKruskal-Wallis test

^cMann-Whitney test

Table 4: Adjusted waist circumference mean by CART and CNR1 genotypes

	Men			Women		
	n	Mean ± SD	P-value	n	Mean ± SD	P-value
CART						
-156 A>G						
A/A	52	96.1±10.0	0.102 ^a	95	88.6±11.4	0.665 ^a
A/G	131	96.9±10.0		188	88.0±11.8	
G/G	68	93.7 ± 9.5		151	89.2±11.4	
CNR1						
1359 G>A						
A/A	9	87.7 ± 8.1	0.038 ^b	25	87.9±10.4	0.428 ^a
A/G	93	95.5±11.4		141	89.5±11.2	
G/G	147	95.9 ± 9.0		265	88.0±11.7	

^a ANOVA

^b Kruskal-Wallis test

^c Mann-Whitney test

Capítulo III
DISCUSSÃO

Os aspectos específicos referentes aos resultados obtidos para cada gene analisado foram discutidos no capítulo 2 da presente Dissertação. Nesse capítulo, serão, portanto, abordadas questões mais gerais, buscando situar e integrar os resultados obtidos no capítulo anterior dentro do contexto dos aspectos ambientais e gênero-específicos das doenças multifatoriais, bem como serão discutidas as perspectivas para a continuidade dessa linha de pesquisa.

No artigo científico que constitui o cerne da presente Dissertação, foram analisadas variantes polimórficas em dois genes candidatos e suas possíveis associações com parâmetros de massa (IMC) e distribuição da gordura corporal (circunferência da cintura) 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 36,8% dos participantes apresentaram sobrepeso e 20,2% foram obesos, sugerindo que a amostra investigada é representativa da população do Estado em relação a essa característica.

Dos dois polimorfismos analisados, foram observadas associações significantes para ambas as variantes, CART -156A>G e CNR1 1359G>A, tanto com o IMC, quanto com a circunferência da cintura (WC). Entretanto, essas associações foram restritas ao sexo masculino, não sendo encontrado algum resultado estatisticamente significativo em mulheres. Questões relacionadas a esse padrão gênero-específico observado serão discutidas a seguir.

III.1. A Importância do Contexto Ambiental

Como mencionado anteriormente, a obesidade é uma doença complexa com origens multifatoriais, a qual, em muitos casos, apresenta uma condição poligênica afetada por uma grande quantidade de fatores ambientais (Froguel e Boutin, 2001). Mesmo com a recente publicação do Mapa Genético da Obesidade Humana (Pérusse e cols. 2005) de que, pelo menos, 113 genes apresentam associação positiva para essa doença, a real contribuição quantitativa desse componente genético para o fenótipo obeso é uma questão que ainda precisa ser respondida. Ao lado disso, fatores genéticos também contribuem para uma resposta individual na ingestão energética (Vincent e cols., 2002; Collaku e cols., 2004), o que pode ser observado através de diversos estudos de associação que descrevem a interação entre as dietas e os diferentes polimorfismos de genes candidatos à obesidade (Nieters e cols., 2002; Martinez e cols., 2003). Esse tipo particular de interação gene-nutriente enfatiza a dificuldade que existe em se examinar o impacto dessas variantes gênicas no ganho de peso. Entretanto, é necessário que se estabeleça como os fatores ambientais afetam o desenvolvimento da obesidade em indivíduos com um determinado “background” genético, com a finalidade de se controlar a propagação dessa doença (Moreno-Aliaga e cols., 2005).

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 frequentemente 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). Existem grandes diferenças étnicas em relação à prevalência de obesidade: em povos asiáticos, como os japoneses, a prevalência é quase três vezes menor do que em descendentes de europeus. No entanto, a prevalência de doenças relacionadas à obesidade nesses dois grupos é quase similar (Misra, 2003). Entretanto, estudos recentes observaram que asiáticos apresentam um menor IMC, mas uma maior percentagem de gordura corporal quando comparados aos euro-descendentes (Wang e cols., 1994; Ko e cols., 2001). Deurenberg e cols. (2002) também sugerem que essa relação entre o IMC e a

percentagem de gordura corporal difere entre grupos étnicos. Kagawa e cols. (2002) ressaltaram a existência de diferenças nas frequências de alelos de risco para a obesidade entre os diferentes grupos étnicos. Esses autores atribuem essas diferenças a pressões seletivas diferenciadas sofridas por esses grupos, devidas a fatores climáticos e aos diferentes tipos de alimentação a que esses grupos foram submetidos. Essa especulação proposta por esses autores levanta questões interessantes, uma vez que os efeitos de algumas variantes possam ser contrabalançados pelos efeitos de outras, dependendo da população. Isso poderia perfeitamente explicar essa diferença na frequência de SNPs observada entre diferentes grupos étnicos, como foi observada para o polimorfismo CART -156A>G entre populações asiáticas e a população analisada na presente Dissertação, já discutida no capítulo 2. Por esse motivo, o estudo de populações compostas por povos de diferentes origens pode revelar efeitos de variantes que não existiriam caso os mesmos fossem analisados separadamente. Nesse caso, a heterogeneidade dos participantes, os diferentes tipos de tratamentos e de dietas e os aparentes resultados contraditórios obtidos em algumas intervenções tornam difíceis a comparação e a interpretação de estudos relacionados à obesidade humana. Esse fato enfatiza ainda mais a importância de se replicar estudos em diferentes populações, a fim de buscar-se a real contribuição das variantes alélicas no acúmulo de peso corporal.

Ao lado da heterogeneidade étnica, existem outros fatores que contribuem para os diferentes resultados obtidos em estudos relacionados à obesidade. Um deles é o envelhecimento, o qual está intimamente associado a mudanças no peso corporal. A maioria dos indivíduos tende a aumentar a massa de gordura corporal com a idade independente da ingestão energética ou da atividade física, especialmente entre os 65 e os 70 anos. Adicionalmente, outro aspecto a ser considerado é a diferença relacionada ao local de moradia da população. Um estudo em uma população indiana constatou que existem prevalências distintas de obesidade de acordo com a área residencial, as quais podem refletir o grau de industrialização do país e sugerir que as diferenças entre as localidades urbanas e rurais possam ocorrer devido ao estilo de vida dos residentes, incluindo a alimentação e a atividade física (Reddy e cols., 2002). Chung e cols. (2005) detectaram a existência de um aumento na prevalência da obesidade em indivíduos mais velhos nas populações de grandes cidades, as quais são mais industrializadas e, por conseguinte,

proporcionam uma alimentação rica em gordura e uma baixa atividade física. Essas observações estão de acordo com a hipótese proposta por Neel (1999), na qual o desequilíbrio energético vivenciado pelos indivíduos adultos nos países industrializados é o resultado de um genoma de caçadores-coletores vivendo de maneira sedentária em um meio onde os alimentos são abundantes. Essa idéia está sendo revista de forma a comportar os conhecimentos atuais sobre a natureza poligênica da predisposição à obesidade, assim como demonstra a necessidade de avanços tecnológicos, bem como na ciência básica, para que consigamos entender e relacionar todos os mecanismos envolvidos com o ganho de peso, tanto dentro do seu contexto biológico quanto ambiental.

III.2. Aspectos Gênero-Específicos

Um dos principais aspectos observados no presente estudo foi que as variantes apresentaram efeito restrito ao sexo masculino, tanto no gene CART quanto no CNR1. Esse tipo de efeito tem sido observado de forma tão freqüente em estudos relacionados à obesidade que alguns autores, como Arner (2000) e Price (2003), chegaram a sugerir a construção de mapas sexo-específicos para os locos relacionados a essa doença. Já se tem conhecimento de que os padrões de distribuição da gordura corporal apresentam marcado dimorfismo sexual na espécie humana. Não somente está estabelecido que os hormônios esteróides desempenham um papel importante na determinação dos padrões de distribuição do tecido adiposo (Prins e cols., 1996), mas também existem estudos demonstrando que aspectos fisiológicos do tecido adiposo, como a taxa de lipólise, são diferentes entre homens e mulheres (Nielsen e cols., 2003). Aspectos comportamentais que podem ter influência sobre o acúmulo de adiposidade também mostram-se diferentes nos dois sexos, como foi observado em nossa amostra (capítulo 2, Tabela 1), onde a prática de atividade física foi mais freqüente no sexo masculino do que do feminino. Ao lado das diferenças de distribuição de gordura corporal, sabe-se que os homens apresentam um progressivo ganho de massa corporal do início até a metade da vida adulta, enquanto que nas mulheres esse ganho estende-se após a menopausa (Chung e cols., 2005). Isso demonstra que a

associação da idade com as mudanças na composição corporal também ocorre de forma gênero-específica.

As diferenças de resposta em relação à obesidade estão também sendo observadas em modelos murinos. No trabalho desenvolvido por Asnicar e cols. (2001), em que camundongos transgênicos com a ausência do transcrito CART apresentaram predisposição à obesidade sob dietas altamente calóricas, as fêmeas heterozigotas para a deleção mostraram-se similares aos controles quanto ao aspecto alimentar. Entretanto, os machos heterozigotos apresentaram uma redução da alimentação quando comparados com os mesmos. Essas diferenças na expressão de CART em regiões mesolímbicas de machos e fêmeas foram observadas em estudos prévios (Fagergren e Hurd, 1999), o que indica que possam ser as responsáveis pelos fenótipos distintos desses animais. Os autores ainda sugerem que um dos fatores limitantes das conseqüências geradas pela deficiência de CART possa ser a existência de um mecanismo compensatório relacionado ao desenvolvimento.

Recentemente, Bottner e cols. (2004) verificaram a relação entre os níveis de adiponectina, uma molécula liberada do tecido adiposo com grande atividade antidiabética e antiaterogênica, e o IMC em meninos e meninas de uma população alemã. Contrastando com a maioria das outras adipocitocinas que aumentam com o excesso de massa corporal, a adiponectina apresenta baixas concentrações em indivíduos obesos (Arita e cols., 1999). O trabalho de Bottner e cols. (2004) buscou elucidar o impacto do gênero, do desenvolvimento sexual e da obesidade nos níveis de adiponectinas dessas crianças e encontrou, além de uma relação inversa entre esses níveis e o IMC, uma tendência de redução desses níveis em meninos, quando comparado com meninas. Além disso, os mesmos foram inversamente relacionados com os parâmetros de desenvolvimento físico e da puberdade, como idade, altura e concentrações do fator de crescimento IGF-I. Em meninos, foi observado um declínio nos níveis de adiponectina com a progressão da puberdade, o qual não foi observado em meninas. Esses resultados estão de acordo com a correlação negativa existente entre a adiponectina e a testosterona, a qual não existe com a concentração de estradiol em meninas. Tais dados foram observados igualmente em camundongos (Nishizawa e cols., 2002; Combs e cols., 2003). Devido às ações antidiabética e antiaterogênica da adiponectina e a associação de seus baixos níveis com o

alto risco de doenças cardiovasculares (Hotta e cols., 2000), essa baixa concentração pode contribuir para a alta incidência de doenças cardiovasculares e de obesidade em homens, já que leva a uma diminuição do efeito protetor dessa molécula (Kumada e cols., 2003). Ao lado disso, a leptina também apresentou uma relação inversa com os níveis de adiponectina, bem como Lyoussy e cols. (2005) detectaram níveis diferenciados desse hormônio entre homens e mulheres.

Além dos efeitos gênero-dependentes encontrados pelas duas variantes, CART – 156A>G e CNR1 1359 G>A, analisadas nesse trabalho, estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo já observaram esse mesmo padrão de resposta, sejam associações restritas a mulheres (Mattevi e cols., 2002; 2004), ou a homens (Fiegenbaum e Hutz, 2003). As questões discutidas acima nos indicam que o gênero e a puberdade apresentam forte influência no diferencial fenotípico apresentado entre homens e mulheres quanto aos fenótipos relacionados à obesidade. Entretanto, as ações específicas desses fatores em genes específicos são ainda uma questão em aberto que precisa ser sistematicamente investigada em populações humanas.

III.3. Implicações Terapêuticas

Pelo fato de uma série de estudos epidemiológicos indicarem que o excesso de peso corporal está associado com um alto risco de desenvolvimento de outras doenças crônicas, o tratamento ou a prevenção da obesidade se faz necessário para reverter ou evitar que as mesmas ocorram. Atualmente, o gerenciamento da obesidade é direcionado primeiramente para a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético. Existe uma grande quantidade de estratégias (Korner e Aronne, 2003) que podem ser usadas para se induzir o balanço energético negativo e a perda de peso. Entre elas, encontra-se a modificação do estilo de vida, incluindo a redução da ingestão energética, o aumento da atividade física e modificações comportamentais (Kopelman e Grace, 2004), bem como tratamentos farmacológicos (Korner e Aronne, 2004) e cirúrgicos (Cumings e cols., 2004). Nesse contexto, é relevante considerar que a perda de peso é uma característica complexa que

depende de muitos fatores ambientais, comportamentais e genéticos, os quais devem ser incluídos em programas de tratamento de sobrepeso ou obesidade em diferentes populações humanas.

Um dos principais objetivos da identificação dos genes responsáveis pela obesidade humana é o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais racionais, seja pela elucidação da patofisiologia subjacente à doença, ou através da possível estratificação dos pacientes em grupos, nos quais a efetividade de diferentes tratamentos possa ser determinada empiricamente (Barsh e cols., 2000). Atualmente, os recursos terapêuticos para o tratamento da obesidade são bastante limitados. A obesidade como resultado de níveis reduzidos de melanocortinas, por exemplo, deve responder bem à administração de agonistas de receptores de melanocortina, caso os mesmos estejam disponíveis em clínicas de tratamento. Um estudo recente em camundongos com o gene POMC nocauteado demonstrou que esses animais tiveram a obesidade revertida através da administração de agonistas do receptor MC4 (Yaswen e cols., 1999). Da mesma forma, crianças obesas com deficiência de leptina congênita apresentaram redução de peso após a administração desse hormônio, concordando com os resultados anteriormente observados em modelos murinos (Farooqi e cols., 1999). A obesidade causada por resistência à leptina, entretanto, parece ser comum e improvável de responder ao tratamento com esse hormônio, a menos que essa resistência seja superada. Essas considerações indicam que uma maior compreensão das bases patofisiológicas da obesidade humana será útil no direcionamento de tratamentos de indivíduos afetados.

Recentemente, Groop e cols. (2005) demonstraram uma evidência direta do papel da AgRP na regulação da homeostase energética, descrevendo sua relevante função no controle da ingestão alimentar. Entretanto, esses estudos indicaram que a patogênese da obesidade envolve rotas adicionais, provavelmente posteriores à ativação do receptor MC4. Esse fato enfatiza ainda mais a importância de elucidarem-se os mecanismos que controlam a ingestão alimentar e a homeostase energética. Ao lado disso, o enorme custo que esse transtorno acarreta aos sistemas públicos de saúde demonstra a necessidade de um entendimento mais completo nessa área. Espera-se que, portanto, que o mesmo 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.

III.4. Perspectivas Futuras

No presente estudo, foi realizada uma avaliação em dois genes candidatos à obesidade. 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. Conforme sugerido por Hebebrand e cols. (2003), a melhor estratégia consiste na identificação de genes relevantes à regulação do peso corporal em amostras populacionais para, posteriormente, proceder à análise do efeito de alelos específicos em amostras caracterizadas para outros fenótipos comportamentais, fisiológicos, ou endócrinos, mais detalhados.

A prevalência da obesidade vem aumentando no mundo todo em todas as faixas etárias. Este fato preocupante também tem sido observado no Brasil. Levantamentos efetuados em 1975 e 1997 revelam que a prevalência da obesidade no país aumentou de 8 para 13% em mulheres, de 3 para 7% em homens e de 3 para 15% em crianças. A diferença no aumento foi maior em crianças por duas razões: a diminuição da atividade física, onde as crianças estão trocando as brincadeiras ao ar livre por televisão, computadores e vídeo-games; e uma alimentação saudável por alimentos industrializados, promovidos pela mídia, muito palatáveis e altamente calóricos. Isso nos indica que devemos não somente nos preocupar com o tratamento, mas principalmente com a prevenção dessa doença.

O fator genético, sem dúvida, é extremamente importante na gênese da obesidade. Os genes não mudaram significativamente nas duas últimas décadas e, no entanto, a prevalência da obesidade aumentou muito. Por esse motivo a obesidade é uma condição multideterminada em cuja etiologia, além da genética, estão os fatores ingestão de alimentos e diminuição da atividade física. Além desses, 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, que também podem refletir a influência de fatores genéticos e tornarem-se componentes importantes na etiologia da obesidade. Nesse sentido, os indivíduos estão sujeitos a constantes mudanças

no peso corporal, o que acarreta, para uma grande quantidade de estudos, uma representação meramente momentânea dos mesmos. Entretanto, com a finalidade de tentar-se contornar essa situação, o acompanhamento de uma amostra por períodos mais longos, 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, 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.

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. Frente a isso, seria de suma importância o fechamento da rota de controle da ingestão alimentar, através de estudos de associação de outros genes envolvidos tanto na via orexigênica quanto na anorexigênica de regulação, assim como daqueles envolvidos na via periférica de sinalização. Cada vez mais o número de genes candidatos promissores tem aumentado, muitos dos quais não tiveram seus resultados iniciais confirmados. Sem dúvida, outros genes candidatos importantes recentemente identificados, como a grelina e o peptídeo YY, merecem ser alvos de futuras investigações. Os rápidos avanços nessa área, aliados à grande quantidade de perguntas ainda sem respostas, fazem com que seja necessária a continuidade de estudos com esses genes promissores. Pretende-se com isso compreender os mecanismos fundamentais da homeostase energética, com o objetivo de buscarem-se novas estratégias de prevenção e tratamento da obesidade humana.

Capítulo IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, Zollner AN, Morgan DG, Morgan I, Ghatei MA, Small CJ and Bloom SR (2001) Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 142(8): 3457-3463.

Abel EL (1975) Cannabis: effects on hunger and thirst. *Behav Biol* 15: 255-281.

Arita Y, Kihara S, et al. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 79-83.

Arner P (2000) Hunting for human obesity genes? Look in the adipose tissue! *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: S57-S62.

Asnicar MA, Smith DP, et al. (2001) Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 142: 4394-43400.

Bagdade JD, Bierman EL and 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(10): 1549-1557.

Barret P, Davidson J and Morgan P (2002) CART gene promoter transcription is regulated by a cyclic adenosine monophosphate response element. *Obes Res* 10(12): 1291-1298.

Barsh GS, Farooqi IS and O'Rahilly S (2000) Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404(6778): 644-651.

Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP and Dorsa DM (1988) Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 11(3): 107-111.

Baskin DG, Breininger JF and Schwartz MW (1999) Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48(4): 828-833.

Baura GD, Foster DM, Porte D Jr, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C and 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(4): 1824-1830.

Beaudry G, Zekki H, Rouillard C and Levesque D (2004) Clozapine and dopamine D3 receptor antisense reduce cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse* 51(4): 233-240.

Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclançon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F and Soubrie P (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63(4): 908-914.

Billington CJ, Briggs JE, Grace M and Levine AS (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260(2 Pt 2): R321-327.

Bjorntorp P and Rosmond R (2000) Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(suppl 2): S80-S85.

Black SC (2004) Cannabinoid receptor antagonists and obesity. *Curr Opin Investig Drugs* 5(4): 389-394.

Blundell JE and Gillett A (2001) Control of food intake in the obese. *Obes Res* 9 (suppl 4): S263-S270.

Bottner A, Kratzsch J, Muller G, Kapellen TM, Bluher S, Keller E, Bluher M and Kiess W (2004) Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8): 4053-4061.

Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S and Fournier G (1990) The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 322(21): 1477-1482.

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 and Weigle S (eds) *Obesity: from laboratory investigation to clinical practice*. NAASO, Québec City, pp 15-16.

Bray GA, Fisler J and York DA (1990) Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front Neuroendocrinol* 11: 128-181.

Breivogel CS and Childers SR (1998) The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5: 417-431.

Broberger C (1999) Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 848: 101-113.

Burstein S (1997) Marijuana as a medicine. *Nature* 386: 320.

Caenazzo L, Hoehe MR, Hsieh W-T, Berrettini WH, Bonner TI and Gershon ES (1991) HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR). *Nucleic Acids Research* 19: 4798.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R and Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269(5223): 546-549.

Challis BG, Yeo GSH, Farooqi IS, Luan J, Aminian S, Halsall DJ, Keogh JM, Wareham NJ and O'Rahilly S (2000) The CART gene and human obesity. *Diabetes* 49: 872-875.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI and 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.

Cheung CC, Clifton DK and 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 and Leibel RL (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (Leptin) receptor. *Science* 271: 994-996.

Chung SJ, Han YS, Lee SI and Kang SH (2005) Urban and rural Differences in the Prevalence of Gender and Age specific Obesity and related Health Behaviors in Korea. *J Korean Med Sci* 20(5): 713-720.

Clément K (1999) Leptin and the genetics of obesity. *Acta Paediatr. Suppl.* 428: 51-57.

Collaku A, Rankinen T, Rice T, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH and Bouchard C (2004) A genome-wide linkage scan for dietary energy and nutrient intakes: the Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics (HERITAGE) Family Study. *Am J Clin Nutr* 79(5): 881-886.

Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS and Scherer PE (2003) Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52(2): 268-276.

Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C and 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(5): 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.

Couceyro PC, Koylu EO and Kuhar MJ (1997) Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* 12: 229-241.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD and Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836): 480-484.

Cowley MA (2003) Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *Eur J Pharmacol* 480(1-3): 3-11.

Cummings DE, Overduin J and Foster-Schubert KE (2004) Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2608-2615.

Dawson E (1995) Identification of a polymorphic triplet marker for the brain cannabinoid receptor gene: use in linkage and association studies of schizophrenia. *Psychiatr. Genet.* 5: S50.

De Petrocellis L, Melck D, Bisogno T, Milone A and Di Marzo V (1999) Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience* 92: 377-387.

del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, D'Urso L, Di Toro R and Perrone L (2001) Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes* 50: 2157-2160.

Deurenberg P, Deurenberg-Yap M and Guricci S (2002) Asians are different from Caucasians and from each other in their body mass index/body fat per cent relationship. *Obes Rev* 3(3): 141-146.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A and Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090): 1946-1949.

Dhillon WS, Small CJ, Stanley SA, Jethwa PH, Seal LJ, Murphy KG, Ghatei MA and 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(9): 725-730.

Di Marzo V, Melck D, Bisogno T and De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* 21: 521-528.

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T and Kunos G (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410: 822-825.

Di Marzo V, Bifulco M and De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3(9): 771-784.

Di Marzo V and Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 8(5): 585-589.

Dominguez G and Kuhar MJ (2004) Transcriptional regulation of the CART promoter in CATH.a cells. *Brain Res Mol Brain Res* 126(1): 22-29.

Douglass J, Mckinzie AA and Couceyro P (1995) PCR differential display identifies a rat-brain messenger-RNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15: 2471-2481.

Douglass J and Daoud S (1996) Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 169: 241-245.

Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Hansen C, Tommerup N and Pedersen O (1999) Sequence variants in the human cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) gene in subjects with early onset obesity. *Obes Res* 7: 532-536.

Edwards CM, Abbott CR, Sunter D, Kim M, Dakin CL, Murphy KG, Abusnana S, Taheri S, Rossi M and 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(1-2): 128-134.

Elias CF, Lee C, et al. (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21: 1375-1385.

Erickson JC, Clegg KE and Palmiter RD (1996) Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381: 415-421.

Erlanson-Albertsson C (2005) How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(2): 61-73.

Fagergren P and Hurd YL (1999) Mesolimbic gender differences in peptide CART mRNA expression: effects of cocaine. *Neuroreport* 10(16): 3449-3452.

Fan W, Boston B, Kesterson R, Hruby V and Cone R (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165-168.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA and O'Rahilly S (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341(12): 879-884.

Fiengenbaum M and 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.

Fride E (2004) The endocannabinoid-CB(1) receptor system in pre- and postnatal life. *Eur J Pharmacol* 500(1-3): 289-297.

Fride E, Bregman T and Kirkham TC (2005) Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp Biol Med (Maywood)* 230(4): 225-234.

Froguel P and Boutin P (2001) Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. *Exp Biol Med* (Maywood) 226: 991-996.

Gadzicki D, Müller-Vahl K and Stuhmann M (1999) A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Mol Cell Probes* 13: 321-323.

Gagnon MA and Elie R (1975) Effects of marijuana and D-amphetamine on the appetite, food consumption and various cardio-respiratory variables in man. *Union Med Can* 104: 914-921.

Gerard CM, Mollereau C, Vassart G and Parmentier M (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279: 129-134.

Groop E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL and Brüning JC (2005) Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8(10): 1289-1291.

Guérardel A, Barat-Houari M, et al. (2005) Analysis of sequence variability in the CART gene in relation to obesity in a caucasian population. *BMC Genet* 6: 19 doi:10.1186/1471-2156-6-19.

Gura T (2003) Obesity drug pipeline not so fat. *Science* 299 (5608): 849-852.

Gus I, Fischmann A and 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

Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, Vaillant E, Lorentz N, Basdevant A, Clement K, Guy-Grand B and Froguel P (1998) A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 20: 304-308.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG and Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1(4): 271-272.

Hainer V, Stunkard AJ, Kunesova M, Parizkova J, Stich V and 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(8): 1051-1057.

Hampson RE, Evans GJ, Mu J, Zhuang SY, King VC, Childers SR and Deadwyler SA (1995). Role of cyclic AMP-dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "a-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci* 56: 2081-2088.

Han TS, Tijhuis MA, Lean ME and Seidell JC (1998) Quality of life in relation to overweight and body fat distribution. *Am J Public Health* 88: 1814-1820.

Hanus L, Avraham Y, Ben-Shushan D, Zolotarev O, Berry EM and Mechoulam R (2003) Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain. *Brain Res* 983(1-2): 144-151.

Hathout EH, Sharkey J, Racine M, Ahn D, Mace JW and Saad MF (1999) Changes in plasma leptin during the treatment of diabetic ketoacidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 84(12): 4545-4548.

Hebebrand J, Friedel S, Schauble N, Geller F and Hinney A (2003) Perspectives: molecular genetic research in human obesity. *Obes Rev* 4(3): 139-146.

Hildebrandt AL, Kelly-Sullivan DM and Black SC (2003) Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol* 462: 125-132.

Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh W-T, Modi WS, Gershon ES and Bonner TI (1991) Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol* 3: 880-885.

Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP and Leranth 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(5): 2461-2467.

Horvath TL (2005) The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 8(5): 561-565.

Hotta K, Funahashi T, et al. (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1595-1599.

Howlett AC and Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26(3): 532-538.

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 and Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88(1): 131-141.

Jamshidi N and Taylor DA (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol* 134(6): 1151-1154.

Kagawa Y, Yanagisawa Y, Hasegawa K, Suzuki H, Yasuda K, Kudo H, Abe M, Matsuda S, Ishikawa Y, Tsuchiya N, Sato A, Umetsu K and Kagawa Y (2002) Single nucleotide polymorphisms of thrifty genes for energy metabolism: evolutionary origins and prospects for intervention to prevent obesity-related diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 295(2): 207-222.

Kathmann M, Haug K, Heils A, Nothen MM and Schlicker E (2000) Exchange of three amino acids in the cannabinoid CB1 receptor (CNR1) of an epilepsy patient. In: Proceedings of the Symposium on the Cannabinoids, Burlington, Vermont, ICRS, p. 18.

Kirkham TC, Williams CM, Fezza F and 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(4): 550-557.

Ko GT, Tang J, Chan JC, Sung R, Wu MM, Wai HP and Chen R (2001) Lower BMI cut-off value to define obesity in Hong Kong Chinese: an analysis based on body fat assessment by bioelectrical impedance. *Br J Nutr* 85(2): 239-242.

Koch JE (2001) Delta(9)-THC stimulates food intake in Lewis rats: effects on chow, high-fat and sweet high-fat diets. *Pharmacol Biochem Behav* 68: 539-543.

Kong WM, Stanley S, Gardiner J, Abbott C, Murphy K, Seth A, Connoley I, Ghatei M, Stephens D and Bloom S (2003) A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J* 17(12): 1688-1690.

Kopelman PG and Grace C (2004) New thoughts on managing obesity. *Gut* 53(7): 1044-1053.

Korner J and Aronne LJ (2003) The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* 111(5): 565-570.

Korner J and Aronne LJ (2004) Pharmacological approaches to weight reduction: therapeutic targets. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2616-2621.

Kow LM and Pfaff DW (1991) The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 38(2): 359-364.

Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ and Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.

Kumada M, Kihara S, et al. (2003) Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1): 85-89.

Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC and Kristensen P (2000) Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 8(8): 590-596.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W and Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283: 401-404.

Leedom LJ and Meehan WP (1989) The psychoneuroendocrinology of diabetes mellitus in rodents. *Psychoneuroendocrinology* 14(4): 275-294.

Loss RJJ and Bouchard C (2003) Obesity – is it a genetic disorder? *J Intern Med* 254: 401-425.

Loos RJJ and Rankinen T (2005) Gene-diet interactions on body weight changes. *J Am Diet Assoc* 105(5 suppl 1): S29-S34.

Luheshi GN, Gardner JD, Rushforth DA, Loudon AS and Rothwell NJ (1999) Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(12): 7047-7052.

Lyoussi B, Ragala MA, Mguil M, Chraibi A and Israili ZH (2005) Gender-specific leptinemia and its relationship with some components of the metabolic syndrome in Moroccans. *Clin Exp Hypertens* 27(4): 377-394.

Mackie K and Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Indian Natl Sci Acad B Biol Sci* 89: 3825-3829.

Maffei M, Stoffel M, Barone M, Moon B, Dammerman M and Ravussin E (1996) Absence of mutations in the human OB gene in obese/diabetic subjects. *Diabetes* 45: 679-682.

Martinez JA, Corbalan MS, Sanchez-Villegas A, Forga L, Marti A and Martinez-Gonzalez MA (2003) Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism. *J Nutr* 133(8): 2549-2554.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC and Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.

Mattevi VS, Zembrzuski VM and 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 (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 and Hutz MH (2004) A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. *Hum Genet* 115: 208-212.

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(1): 83-90.

Misra A (2003) We need ethnic-specific criteria for classification of BMI. In: Medeiros-Neto G, Halpern A and Bouchard C (eds) *Progress in obesity research: 9. Proceedings of the 9th International Congress on Obesity*, São Paulo 2002. John Libbey Eurotext, Paris, pp 547-553.

Moreno-Aliaga MJ, Santos JL, Marti A and Martinez JA (2005) Does weight loss prognosis depend on genetic make-up? *Obes Rev* 6(2): 155-168.

Munro S, Thomas KL and Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.

Murphy KG (2005) Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4(2): 95-111.

Neel JV (1999) The "thrifty genotype" in 1998. *Nutr Rev* 57(5 Pt 2): S2-S9.

Nielsen S, Guo Z, Albu JB, Klein S, O'Brien PC and Jensen MD (2003) Energy expenditure, sex, and endogenous fuel availability in humans. *J Clin Invest* 111: 981-988.

Nieters A, Becker N and Linseisen J (2002) Polymorphisms in candidate obesity genes and their interaction with dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids affect obesity risk in a sub-sample of the EPIC-Heidelberg cohort. *Eur J Nutr* 41(5): 210-221.

Niki T, Mori H, Tamori Y, Kishimoto-Hashimoto M, Ueno H and Araki S (1996) Human obese gene: molecular screening in Japanese and Asian Indian NIDDM patients associated with obesity. *Diabetes* 45: 674-678.

Nishizawa H, Shimomura I, et al. (2002) Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51(9): 2734-2741.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I and Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278(5335): 135-138.

Onaivi ES, Leonard CM, Ishiguro H, Zhang PW, Lin Z, Akinshola BE and Uhl GR (2002) Endocannabinoids and cannabinoid receptor genetics. *Prog Neurobiol* 66: 307-344.

Page GP, George V, Go RC, Page PZ and 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(4): 711-719.

Palou A, Serra F, Bonet ML and Picó C (2000) Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 39: 127-144.

Pérusse L, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Snyder EE and Bouchard C (2005) The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res* 13: 381-490.

Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, Janiak P and Herbert JM (2005) The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab* 7(1): 65-72.

Porter AC and Felder CC (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90: 45-60.

Price RA (2003) Fine localization of genes influencing human obesity. In: Medeiros-Neto G, Halpern A and Bouchard C (eds) *Progress in obesity research: 9. Proceedings of the 9th International Congress on Obesity, São Paulo 2002*. John Libbey Eurotext, Paris, pp 234-236.

Prins JB, O'Rahilly S and Chatterjee VK (1996) Steroid hormones and adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 26: 259-261.

Puhl R and Brownell KD (2001) Bias, discrimination and obesity. *Obes Res* 9: 788-805.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pellemounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R and Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380(6571): 243-247.

Ravussin E and Bouchard C (2000) Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. *Eur J Pharmacol* 410: 131-145.

Reddy KS, Prabhakaran D, Shah P and Shah B (2002) Differences in body mass index and waist: hip ratios in North Indian rural and urban populations. *Obes Rev* 3(3): 197-202.

Reidpath D, Burns C, Garrard J, Mahoney M and Townsend M (2002) An ecological study of the relationship between social and environmental determinants of obesity. *Health Place* 8: 141-145.

Rohner-Jeanrenaud F, Craft LS, Bridwell J, Suter TM, Tinsley FC, Smiley DL, Burkhart DR, Statnick MA, Heiman ML, Ravussin E and Caro JF (2002) Chronic central infusion of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART 55-102): effects on body weight homeostasis in lean and high-fat-fed obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(2): 143-149.

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(4): 573-585.

Schlicker E and Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 565-572.

Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ and 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 and Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778): 661-671.

Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R and 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(5): 593-602.

Sipols AJ, Baskin DG and Schwartz MW (1995) Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44(2): 147-151.

Spiegelman BM and Flier JS (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543.

Spiess J, Villarreal J and Vale W (1981) Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry* 20: 1982-1988.

Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S and Leibowitz SF (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7(6): 1189-1192.

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 and Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215(1): 89-97.

Swinburn B and Egger G (2002) Preventive strategies against weight gain and obesity. *Obes Rev* 3: 289-301.

Swinburn B and Egger G (2004) The runaway weight gain train: too many accelerators, not enough brakes. *BMJ* 329: 736-739.

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 and Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.

Trayhurn P (2005) The biology of obesity. *Proc Nutr Soc* 64(1): 31-38.

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B and Froguel P (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20(2): 113-114.

Vincent S, Planells R, Defoort C, Bernard MC, Gerber M, Prudhomme J, Vague P and Lairon D (2002) Genetic polymorphisms and lipoprotein responses to diets. *Proc Nutr Soc* 61(4): 427-434.

Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT and Kristensen P (1999) Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 19: RC5.

Wang J, Thornton JC, Russell M, Burastero S, Heymsfield S and Pierson RN Jr (1994) Asians have lower body mass index (BMI) but higher percent body fat than do whites: comparisons of anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr* 60(1): 23-28.

Wardle J (1999) Aetiology of obesity VII: psychological factors. In: *Force BNFT*, ed. Obesity. Oxford: Blackwell Science 83-91.

Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C and Kuijper JL (1995) Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 96(4): 2065-2070.

Weinsier RL, Hunter GR, Heini AF, Goran MI and Sell SM (1998) The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. *Am J Med* 105(2): 145-150.

Williams CM, Rogers PJ and Kirkham TC (1998) Hyperphagia in pre-fed rats following oral delta9-THC. *Physiol Behav* 65: 343-346.

Woods SC, Lotter E, MacKay L and 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 and 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.

Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W and 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(1): 132-136.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB and Hochgeschwender U (1999) Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5(9): 1066-1070.

Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG and O'Rahilly S (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20(2): 111-112.

Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L and 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 and Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 96: 5780-5785.

ANEXO

**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: 3316-6720