

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Mestrado e Doutorado

**Interação gene e nutriente em pacientes com Diabete Melito tipo 2:
aspectos relacionados às complicações crônicas do diabetes, síndrome
metabólica e efeitos dos polimorfismos rs9939609 (A/T) e rs7204609
(C/T) do gene do *FTO***

Thais Steemburgo

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Jobim de Azevedo

Co-orientador estrangeiro: Prof. Dr. J. Alfredo Martínez

Porto Alegre, 07 de julho de 2009.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Mestrado e Doutorado

**Interação gene e nutriente em pacientes com Diabete Melito tipo 2:
aspectos relacionados às complicações crônicas do diabetes, síndrome
metabólica e efeitos dos polimorfismos rs9939609 (A/T) e rs7204609
(C/T) do gene do *FTO***

Thais Steemburgo

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Jobim de Azevedo

Co-orientador estrangeiro: Prof. Dr. J. Alfredo Martínez

**Tese apresentada ao PPG em
Ciências Médicas: Endocrinologia para obtenção
do título de doutor**

Porto Alegre, 07 de julho de 2009.

A toda a *minha família* e ao meu namorado *Pedro* pelo apoio e incentivo que nunca deixaram que o desânimo me vencesse mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora *Mirela Jobim de Azevedo*, por toda a sua dedicação comigo durante todo este tempo de ensinamento e convivência.

Agradecimentos

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Mirela Jobim de Azevedo, pelo incentivo e carinho em mim depositados. Por ser uma excelente orientadora e pesquisadora, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou de todas as formas que precisei. Agradeço também pela grande amizade, sua disponibilidade e atenção foram indispensáveis neste meu trajeto. Faltam-me palavras para agradecer por tudo que fez por mim durante estes anos de convívio maravilhosos que tivemos.

Ao Prof. Dr. José Alfredo Martínez, que durante meu período de doutorado na Espanha foi meu orientador e contribuiu de forma significativa no desenvolvimento deste trabalho sempre com muita disponibilidade e atenção constante.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, pela sua grande contribuição científica neste trabalho e por sempre incentivar e acreditar no desenvolvimento do grupo de nutrição.

Às colegas e amigas pós-graduandas, Tatiana Pedroso de Paula e Flávia M. da Silva pelo apoio e agradável convivência durante todo este tempo.

Aos colegas e também amigos da Universidade de Navarra: Pedro Prieto Hontoria, Paúl Cordero e Helen H. Hermsdorff pela ajuda e a maravilhosa acolhida oferecida a mim durante o ano de trabalho na Universidade.

À amiga e colega Valesca Dall'Alba por toda a sua amizade e companheirismo que foram imprescindíveis para mim no decorrer de todo o curso.

À colega e companheira Jussara Carnevale de Almeida por toda a sua dedicação auxílio e disponibilidade em todos os momentos necessários.

As demais colegas do grupo Endocrinologia- Nutrição pelo apoio e dedicação.

Aos pacientes do ambulatório do Serviço de Endocrinologia, que foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha mãe Maria Helena e a minha tia Maria de Lourdes pelo carinho e amizade, sempre acreditaram em mim e foram presentes nos momentos que mais necessitei.

Ao meu namorado Pedro, pelo amor e grande paciência neste tempo todo.

Esta Tese de Doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da UFRGS, sendo apresentada na forma de três manuscritos sobre o tema da Tese:

1. Artigo de revisão geral do tema já submetido e aceito para publicação em periódico científico nacional (*Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*);
2. Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito: já submetido para publicação em periódico científico de circulação internacional (*Appetite*);
3. Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito, que será submetido para publicação em periódico científico de circulação internacional (*Diabetes Care*).

Conteúdo

Agradecimentos	iv
Formato da Tese de Doutorado	vi
Lista de Abreviaturas	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
Capítulo I	14
Interação gene - nutriente e sua associação com obesidade e diabetes melito	
Resumo	16
Abstract	17
Introdução	18
Interações gene - nutriente: associações com a genética da obesidade e/ou diabetes melito	19
Genes cuja interação gene - nutriente foi descrita para obesidade ou DM	20
Genes cuja interação gene - nutriente foi descrita para condições ou fatores associados à obesidade ou DM	28
Conclusões	34
Referências	37
Capítulo II	52
The <i>FTO</i> gene and fat intake in patients with type 2 diabetes mellitus	
Abstract	54
Introduction	55

Materials and Methods	56
Patients	56
Dietary Assessment	57
Anthropometric Measurements	58
Laboratory Measurements	58
Genotyping of the <i>FTO</i> polymorphism	58
Statistical Analysis	59
Results	60
Discussion	62
Acknowledgements	64
References	65
Capítulo III	79
Association of <i>FTO</i> rs7204609 polymorphism with metabolic syndrome and microalbuminuria in Brazilian patients with type 2 diabetes	
Abstract	81
Introduction	82
Research design and methods	83
Patients	83
Dietary Assessment	84
Anthropometric Measurements	85
Laboratory Measurements	85
Genotyping of the <i>FTO</i> polymorphism	86
Statistical Analysis	86
Results	87

Conclusions	89
Acknowledgements	92
References	93
Considerações finais	102

Lista de Abreviaturas

AdipoQ: adiponectina

ADRB: Receptor β Adrenérgico

AER: *Urinary albumin excretion rate*

Apo: Apolipoproteína

BMI: *Body Mass Index*

DM: Diabetes Melito

(Diabetes Mellitus)

DCV: Doenças Cardiovasculares

eGFR: *Estimated glomerular filtration rate*

E: energy

EPA: ácido graxo eicosapentaenóico

FABP2: Proteína Transportadora de Ácidos Graxos 2

FTO: *Fat Mass and Obesity Associated*

HDL: *High-density lipoprotein*

HOMA-IR: *Homeostasis model of assessment of insulin resistance*

IDF: *International Diabetes Federation*

IDL: *Intermediary-density lipoprotein*

IMC: Índice de Massa Corporal

IL-6: Interleucina-6

LDL: *Low-density lipoprotein*

LEPR: Receptor da leptina

LIPC: Lipase Hepática

MCR: Receptor da Melanocortina

MetS: *Metabolic Syndrome*

NCEP ATP III: *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*

OR: *Odds Ratio*

PGC-1-alfa: Co-ativador 1 alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma

PPARs: Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomas

P: S: razão de consumo de gordura poli-insaturada: saturada

RI: Resistência à ação da insulina

RR: Risco Relativo

SFA: *Saturated fatty acids*

SM: Síndrome Metabólica

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

UAE: *Urinary albumin excretion*

UCPs: Proteínas Desacoplantes

VET: Valor energético total

VLDL: *Very low-density lipoprotein*

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Estudos de interação gene - nutriente com obesidade e diabetes melito	48
Tabela 2. Estudos de interação gene - nutriente com condições ou fatores associados ao DM e obesidade	50

Capítulo II

Table 1. Clinical characteristics in 236 patients with type 2 DM according to the <i>FTO</i> genotypes	69
Table 2. Biochemical characteristics in 236 patients with type 2 DM according to the <i>FTO</i> genotypes	72
Table 3. Daily intake of nutrients in 236 patients with type 2 DM according to the <i>FTO</i> genotypes	74
Table 4. Association between carriers of A allele in the <i>FTO</i> gene and fat and, saturated fatty acid intakes	77

Capítulo III

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of Brazilian patients with type 2 diabetes according to <i>FTO</i> rs7204609 (C/T) genotypes	97
Table 2. Daily intake of nutrients of Brazilian patients with type 2 DM according to <i>FTO</i> rs7204609 (C/T) genotypes	99

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Esquema representativo das interações gene - nutriente na genômica nutricional	47
--	----

Capítulo II

Figure 1. Association of the presence of the A allele in the <i>FTO</i> gene with total fat consumption >34% of total energy	78
--	----

Capítulo III

Figure 1. Components of the Metabolic Syndrome in Brazilian patients with type 2 diabetes carriers and non-carriers of the C allele of rs7204609 (C/T) in the <i>FTO</i> gene according to gender	100
Figure 2. Odds ratios for the presence of Metabolic Syndrome, its components, obesity and, microalbuminuria in patients with type 2 diabetes carriers of C allele (CC and CT genotypes) of the rs7204609 (C/T) polymorphism of the <i>FTO</i> gene	101

Capítulo I

INTERAÇÃO GENE- NUTRIENTE E SUA ASSOCIAÇÃO COM OBESIDADE E DIABETES MELITO

**INTERAÇÃO GENE- NUTRIENTE E SUA ASSOCIAÇÃO COM OBESIDADE
E DIABETES MELITO**

“Gene x nutrient interaction and association with obesity and diabetes mellitus”

Thais Steemburgo^{1,2}

Mirela Jobim de Azevedo¹

José Alfredo Martínez²

¹ Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Fisiología y Nutrición, Universidad de Navarra, Pamplona, España.

Título resumido: gene x nutriente, obesidade, diabetes melito.

Resumo

A genômica nutricional avalia o efeito da variação genética na interação entre dieta e doenças crônicas. O objetivo deste manuscrito foi revisar os principais polimorfismos associados com obesidade, diabetes melito e também com fatores da dieta. As principais interações entre polimorfismos genéticos e dieta foram: 1. Para obesidade = *IL-6* (interleucina-6) com consumo energético, *PPAR-gama2* (receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama 2) e *FTO* (*fat mass and obesity associated*) com consumo de gorduras, *ADRB2* (receptor β -adrenérgico 2) e *MCR4* (receptor da melanocortina 4) com consumo de carboidratos; 2. Para perda de peso = UCPs (proteínas desacopladoras) com restrição calórica; 3. Para leptinemia = *LEPR* (receptor da leptina) com restrição calórica; 4. Para DM = *PPAR-gama2* com consumo de gordura; 5. Para hipertrigliceridemia = *FABP2* (proteína transportadora de ácidos graxos 2) com consumo de gordura. Os dados apresentados sugerem que a genômica nutricional é importante no desenvolvimento da obesidade e DM.

Descritores: interação gene-nutriente, polimorfismos, obesidade, diabetes melito.

Abstract

Nutritional genomics evaluate the effects of genetic variation of the interaction between diet and chronic diseases. The aim of this manuscript was to review the most important genetic polymorphisms associated with obesity, diabetes mellitus (DM), and dietary factors. The main interactions among genetic polymorphisms and diet were: 1. For obesity = *IL-6* (interleukin-6) with daily intake, *PPAR-gama2* (peroxisome-proliferated activator receptor gama 2) and *FTO* (fat mass and obesity associated) with fat intake, *ADRB2* (β -adrenergic receptor 2) and *MCR4* (melanocortin receptor 4) with carbohydrate intake; 2. For reduction in body weight = UCPs (uncoupling proteins) with restriction of energy; 3. For leptinemia = *LEPR* (leptin receptor) with restriction of energy; 4. For DM = *PPAR-gama2* with fat intake; 5. For hypertriglyceridemia = *FABP2* (fatty acid binding protein 2) with fat intake. The data demonstrated suggest that nutritional genomics is important in the development of obesity and DM.

Keywords: gene-nutrient interactions, polymorphisms, obesity, diabetes mellitus.

Introdução

O conceito de interação gene - nutriente descreve a modulação dos efeitos dos componentes dietéticos em um fenótipo específico associado a um polimorfismo genético (1).

Atualmente, novos paradigmas de investigação na ciência de genética têm demonstrado a importância da genômica nutricional em pesquisas onde a finalidade é possibilitar uma melhor compreensão de como a nutrição pode influenciar nas vias da homeostase metabólica (2). O conceito global da genômica nutricional utiliza dois termos, a nutrigenética e a nutrigenômica. A nutrigenética estuda o efeito da variação genética na interação entre dieta e doença. O objetivo da nutrigenética é gerar recomendações dietéticas considerando os riscos e os benefícios de dietas específicas ou componentes dietéticos para o indivíduo de acordo com suas características genéticas. Já a nutrigenômica estuda a influência dos nutrientes sobre a expressão dos genes (3) (Figura 1). Ambas têm um potencial facilitador na prevenção de doenças crônicas: a nutrigenética via uma abordagem individualizada na conduta dietética e a nutrigenômica pela resposta da expressão dos genes em relação ao consumo de nutrientes (4).

Muitas doenças crônicas como obesidade, diabetes melito (DM) tipo 2, doenças cardiovasculares (DCV) e síndrome metabólica (SM) têm sua patogênese relacionada a fatores ambientais e genéticos (5). Dentre os fatores ambientais, inclui-se a dieta que pode contribuir na incidência e gravidade dessas doenças crônicas. Por outro lado, os componentes da dieta podem ter um efeito modulador nos fenótipos dependentes da variação genética, efeito este considerado como interação gene - nutriente (6).

Estudos de genômica nutricional vêm demonstrando importantes associações de polimorfismos com o consumo de nutrientes, em especial com a gordura. Na população

em geral foi demonstrado que a ingestão de gorduras é capaz de determinar o efeito de alguns polimorfismos (gene da lipase hepática e gene da apolipoproteína) no metabolismo de lipoproteínas (7, 8). A associação da ingestão de gordura com a presença dos componentes da SM é também modulada pela presença de polimorfismos específicos, como os do gene do *PPAR- gama* (9, 10).

Em pacientes com DM, em particular com DM tipo 2, e em indivíduos obesos, recentes evidências relacionadas à interação de gene - nutriente vêm também sendo descritas na literatura.

O presente manuscrito teve como objetivo revisar os principais polimorfismos genéticos relacionados com obesidade, DM tipo 2 e condições ou fatores relacionados a estas patologias que já tenham sido associados de forma consistente com a genômica nutricional, com particular ênfase em nutrigenética.

Interações gene - nutriente: associações com a genética da obesidade e/ou diabetes melito

O DM tipo 2 é considerado uma epidemia mundial e estima-se que a sua prevalência aumente de 2,8% para mais de 4,4% até 2030 (11). Paralelamente, mudanças no estilo de vida caracterizadas pelo consumo calórico excessivo e redução da atividade física, associadas a susceptibilidade ou predisposição genética para o excesso de peso (12), determinaram um aumento mundial da prevalência de obesidade (13). Estes mesmos fatores ambientais, também relacionados a um forte componente genético, participam de forma importante na patogênese do DM tipo 2 (14). Neste sentido, os aspectos da dieta relacionados à genômica nutricional possivelmente exercem um papel importante no desenvolvimento e prevenção dessas doenças crônicas.

Para revisar os estudos sobre interação gene - nutriente em obesidade e DM tipo 2 foram utilizados o *Medline* e *Lilacs* (língua portuguesa, inglesa e espanhola), além de

publicações específicas da área até novembro de 2008. Os descritores utilizados foram: *interaction gene and nutrient AND obesity OR type 2 DM*. Foram selecionados estudos sobre os polimorfismos dos seguintes genes: Interleucina-6 (*IL-6*) (18, 19); Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomas (*PPARs*) (23-27); Receptor β -Adrenérgico (*ADRB*) (29, 33); Proteínas Desacopladoras (UCPs) (33, 34); Receptor da Leptina (*LEPR*) (37, 38); Receptor da Melanocortina (*MCR*) (41, 43); *Fat Mass and Obesity Associated* (*FTO*) (48, 49); Lipase Hepática (*LIPC*) (7, 52-54); Adiponectina (*adipoQ*) (60, 61); Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*PGC-1-alfa*) (65); Proteína Transportadora de Ácidos Graxos 2 (*FABP2*) (66, 67, 69, 70) e Apolipoproteína (*Apo*) (8, 73).

Os principais estudos que avaliaram as interações gene-nutriente com obesidade e com DM tipo 2 estão resumidos no Quadros 1. O quadro 2 descreve as interações gene-nutriente com condições ou fatores associados à obesidade ou ao DM, tais como sobrepeso, SM, níveis plasmáticos de insulina e sensibilidade a sua ação, valores plasmáticos de leptina, lipoproteínas e ácidos graxos séricos.

Genes cuja interação gene - nutriente foi descrita para obesidade ou DM

Polimorfismo do gene da Interleucina-6 (*IL-6*):

A interleucina-6 (*IL-6*) é uma citocina com efeito pró-inflamatório que é secretada por vários tipos de células, incluindo leucócitos e células endoteliais, tecido muscular e adiposo. A presença de elevada concentração de *IL-6* se relaciona com a inflamação.

O polimorfismo mais comum do gene da *IL-6* é -174C/G, o qual tem sido associado com a obesidade e outras co-morbidades como a resistência à ação da insulina (RI), SM e DM tipo 2 (15-17).

Em homens japoneses portadores de outro polimorfismo do gene da *IL-6*, o Asp358Ala (T/G), foi observado uma associação positiva entre o maior consumo de energia e obesidade abdominal em indivíduos portadores do alelo T quando comparados aos outros genótipos deste polimorfismo (Quadro 1; 18).

Um interessante estudo avaliou o efeito de uma dieta hipocalórica em indivíduos obesos e portadores do polimorfismo -174C/G da *IL-6* e do polimorfismo Pro12Ala do *PPAR-gama2*. Neste estudo, a presença do alelo C do -174C/G juntamente com a presença do alelo A do *PPAR-gama2* pareceu reduzir a perda de peso nestes indivíduos. Estes resultados evidenciam o papel destes polimorfismos na regulação do peso e também sugerem um efeito sinérgico de ambos na perda de peso resultante de dieta hipocalórica (Quadro 1; 19).

O consumo energético parece ter um papel importante nos fenótipos da obesidade na presença de distintos polimorfismos da *IL-6*. Não existem dados sobre a possível interação gene-nutriente deste polimorfismo em pacientes com DM tipo 2.

Polimorfismo do gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma - gama (*PPAR-gama*):

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (*PPARs*) regulam a expressão de diversos genes relacionados ao metabolismo dos lipídeos e da glicose. O *PPAR-gama* se expressa predominantemente no tecido adiposo e exerce um papel importante na diferenciação dos adipócitos e na expressão de diversos genes. Existem duas isoformas de *PPAR-gama*: *PPAR-gama1* e *PPAR-gama2*. O *PPAR-gama1* se expressa em diversos tecidos incluindo tecido adiposo, músculo esquelético, coração e fígado. Já o *PPAR-gama2* é expresso quase que exclusivamente no tecido adiposo, mais especificamente nos adipócitos, e determina a expressão de genes específicos das

células adiposas, os quais codificam proteínas diretamente relacionadas com as vias lipogênicas (20).

O polimorfismo mais freqüente do *PPAR-gama2* é a substituição de uma alanina por prolina na posição 12 (Pro12Ala) no ponto de mutação no exon B da parte NH2 terminal do *PPAR-gama2*. Este polimorfismo foi associado com melhora da sensibilidade à ação da insulina (21) bem como à proteção para o desenvolvimento de DM tipo 2 (22).

Os estudos de interação gene-nutriente e DM tipo 2 demonstraram que pacientes portadores do genótipo Pro12Ala apresentaram maior incidência de DM quando expostos a um elevado consumo de gordura saturada e gordura *trans* (Quadro 1; 23). O *Finnish Diabetes Prevention Study Group*, avaliou modificações no estilo de vida em indivíduos com alto risco para DM tipo 2, incluindo redução no consumo de gordura total e gordura saturada além de um aumento no consumo de fibras totais. Nestas condições, portadores do alelo Ala desenvolveram menos freqüentemente DM comparados a portadores do alelo Pro (Quadro 1; 24). Recentemente, o *Botnia Dietary Study Group* demonstrou em mulheres não diabéticas portadoras do alelo Ala uma associação positiva entre o alto consumo de ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) proveniente da carne de peixe e o melhor controle de fenótipos associados com o metabolismo da glicose, como resistência à ação de insulina (RI) e insulina e glicose plasmáticas (Quadro 2; 25).

Em pacientes caucasianos com sobrepeso e homozigotos Pro, o polimorfismo Pro12Ala também foi associado com um maior consumo de gordura total (Quadro 1; 26). Já em indivíduos hispânicos, a associação do polimorfismo Pro12 Ala com o índice de massa corporal (IMC) somente foi observada em portadores de alelo A com alto

consumo de gordura poli-insaturada e maior razão de consumo de gordura poli-insaturada: saturada (Quadro 1; 27).

Polimorfismo do gene do Receptor β -Adrenérgico (*ADRB*):

Os receptores β -Adrenérgicos (*ADRBs*) são expressos no tecido adiposo branco e estão intimamente envolvidos na mobilização dos lipídeos. Existem três genes da família do *ADRBs*: *ADRB1*, *ADRB2* e *ADRB3* que são importantes genes candidatos para a obesidade devido a sua participação na regulação do gasto energético. Os genes do *ADRB2* afetam principalmente a lipólise e seus diferentes polimorfismos vem sendo associados com a obesidade.

Os dois polimorfismos mais comuns do *ADRB2* são caracterizados pela troca da arginina no códon 16 pela glicina, formando o polimorfismo Arg16Gly, e pela troca de glutamina no códon 27 pelo ácido glutâmico, formando o Gln27Glu. Ambos os polimorfismos têm sido explorados nas pesquisas genéticas por estarem fortemente associados com a obesidade (28).

Em um estudo de interação gene-nutriente foi demonstrado que o consumo de carboidrato (>49% da energia total) pode estar associado com um aumento de risco para obesidade (RR = 2,56), particularmente em mulheres portadora do alelo Glu do polimorfismo Gln27Glu do *ADRB2* (Quadro 1; 29).

Contudo, são necessárias maiores evidências que comprovem o efeito da dieta nos efeitos relacionados a presença dos polimorfismos do *ADRBs*, em particular no gene do *ADRB2*.

Polimorfismo do gene das Proteínas Desacopladoras (*UCPs*):

As proteínas desacopladoras (*UCPs*) representam um mecanismo de regulação pelo qual a energia é utilizada para gerar calor ou evitar a saturação da cadeia respiratória. Elas pertencem à família de proteínas carreadoras que estão localizadas no

interior das membranas das mitocôndrias. Existem pelo menos três isoformas comuns de UCPs: UCP1 é expressa no tecido marrom, UCP2 e UCP3 que são expressas predominantemente no tecido muscular e no músculo esquelético, todas influenciando a termogênese (30). O seu papel na termogênese em humanos, tem sido avaliado em estudos que indicam a relação positiva entre polimorfismos da UCP e atividade física, metabolismo e gasto energético, IMC, além de risco para obesidade e para o DM tipo 2 (31).

Um dos polimorfismos associado com a obesidade é o -866G/A do gene da UCP2. Indivíduos hispânicos portadores do alelo G apresentam risco aumentado para o desenvolvimento da obesidade (32).

Estudo realizado em 224 pacientes com sobrepeso e obesidade portadores de SM ou doenças cardiovasculares avaliou o efeito de uma dieta hipocalórica na presença de polimorfismos dos genes da UCP3 (-55C/T) e também do *ADRB3* (-64T/A). Foi demonstrado que somente os pacientes homocigotos para o alelo C e alelo T (grupo “*wild type*”) apresentaram redução da gordura corporal e nos valores da glicose e insulina plasmáticas. Nos demais genótipos, para ambos os polimorfismos, não foi observado nenhum efeito da dieta hipocalórica (Quadro 1; 33).

Seis diferentes polimorfismos do gene da UCP3 (-55C/T, Int2-143G/C, Tyr99Tyr, Int3-47G/A, Int4-498C/T e Tyr210Tyr) e sua possível associação com obesidade e com o consumo de uma dieta hipocalórica durante um mês foram avaliados em 214 mulheres coreanas com sobrepeso. Três haplótipos da UCP3 [CGTACC] foram associados com uma maior perda do peso após o seguimento de uma dieta hipocalórica (Quadro 1; 34).

Os dados existentes indicam que determinados genótipos dos polimorfismos do gene das UCPs favorecem a perda de peso após restrição calórica em indivíduos com sobrepeso e obesidade.

Polimorfismo do gene do Receptor da Leptina (*LEPR*):

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo e que atua fundamentalmente no hipotálamo. Em humanos, valores elevados de leptina plasmática podem caracterizar a obesidade, o que sugere que indivíduos obesos tenham resistência a leptina. Uma das explicações poderia ser uma redução na sinalização do receptor da leptina (35).

Pacientes severamente obesos homozigotos para mutação no *LEPR* apresentaram elevados valores de leptina plasmática (36). Entretanto, essas mutações são raras e podem não ser responsáveis pela obesidade na população geral.

Diferentes polimorfismos do *LEPR* têm sido estudados, porém o mais importante e que foi associado com a obesidade é o Lys656Asn (35). Um estudo realizado em 67 pacientes obesos (IMC >30 kg/m²) avaliou a influência desse polimorfismo em resposta a modificação do estilo de vida, o qual era caracterizado por uma dieta hipocalórica mediterrânea rica em cereais integrais, frutas, vegetais e azeite de oliva (52% de carboidratos, 25% de lipídeos e 23% de proteínas) associado à prática de atividade física estruturada (três vezes por semana) em um período de três meses. Os resultados demonstraram que pacientes homozigotos Lys quando submetidos a intervenção em teste apresentaram maior redução de peso, IMC, circunferência abdominal, pressão arterial e de valores de leptina plasmática quando comparados aos pacientes portadores do alelo de risco Asn (Quadro 1; 37).

Outro ensaio clínico randomizado com 78 pacientes obesos analisou o polimorfismo Lys656Asn do *LEPR* em resposta a dois tipos de dietas em um período de

dois meses: uma dieta pobre em gordura total e uma dieta pobre em carboidrato. A dieta pobre em gorduras e em carboidratos resultou em redução nas concentrações plasmáticas de leptina nos pacientes que não possuíam o alelo de risco. Já nos pacientes portadores do alelo de risco Lys, a redução dos valores de leptina ocorreu apenas com a dieta pobre em gordura total (Quadro 2; 38).

As evidências sugerem que pacientes obesos portadores do polimorfismo do gene do *LEPR*, em particular com o genótipo Lys656A, podem ser especialmente beneficiados pelo consumo de uma dieta com baixo conteúdo de gordura.

Polimorfismo do gene do receptor da Melanocortina (*MCR*):

O gene do receptor da melanocortina (*MCR*) tem pelo menos cinco isoformas, sendo que duas delas foram descritas como tendo envolvimento na regulação do peso: *MCR3* e *MCR4* (39). O gene do *MCR4* é altamente expresso no hipotálamo, local onde o controle do apetite está localizado.

Um polimorfismo comum do gene *MCR4* e associado com a obesidade é o V1031I. Em recente meta-análise foi demonstrado que esse polimorfismo influencia o IMC e que indivíduos portadores do alelo de risco do V1031I podem ter aumento do risco para obesidade de 18 a 30% (40).

Em um estudo de interação gene-nutriente, o alto consumo de carboidratos foi positivamente associado com a composição corporal de pacientes com obesidade grave (IMC >40 kg/m²) e portadores do alelo de risco do polimorfismo V1031I do gene *MCR4* (Quadro 1; 41).

Os polimorfismos do gene *MCR3* também estão fortemente associados com a obesidade, sendo que os polimorfismos mais frequentes encontrados em indivíduos obesos são o Thr6Lys e Val81Ile. Crianças com obesidade e homozigotas para o alelo de risco de ambos os polimorfismos (Lys e Ile, respectivamente) são mais propensas a

tornarem-se adultos obesos do que crianças heterozigotas (42). Interessantemente, outros autores demonstraram que a presença desses polimorfismos em crianças obesas pode dificultar a capacidade de oxidação de ácidos graxos, impedindo assim a redução de peso quando essas crianças estão seguindo uma dieta para perda de peso (Quadro 1; 43).

São necessários outros estudos de nutrigenética para melhor esclarecer como a dieta e seus componentes podem influenciar os efeitos dos polimorfismos do *MCR* em indivíduos obesos.

Polimorfismo do gene do *Fat Mass and Obesity Associated (FTO)*:

Recentemente foi descoberto um novo gene associado com a obesidade, o *Fat Mass and Obesity Associated (FTO)*. O gene do *FTO* está localizado no cromossomo 16q 12.2. Associações positivas de alguns polimorfismos do gene *FTO* com a obesidade foram observadas em diferentes grupos étnicos tais como caucasianos (44), japoneses (45), indianos (46) e chineses (47).

O SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) mais freqüente do *FTO* é o rs9939609 A/T, sendo a freqüência desse polimorfismo na população européia de 39% e de 42% em pacientes com DM tipo 2. Esses dados foram demonstrados em um estudo de coorte realizado em 38759 pacientes diabéticos e indivíduos controles, onde o gene do *FTO* foi fortemente associado com a obesidade. Neste estudo, 16% dos adultos que eram homozigotos para o alelo de risco A pesavam cerca de três quilogramas a mais e tiveram um maior risco para obesidade (RR = 1,67) quando comparados com aqueles que não tinham a presença do alelo de risco (48).

Em outro estudo de coorte com 5607 indivíduos foi comprovado que a presença do alelo A do polimorfismo rs9939609 A/T do *FTO* está positivamente associada com o IMC e que esta associação já é observada em jovens e se mantém até a fase adulta (44).

Em japoneses obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) a associação de 15 SNPs do *FTO* confirmou que o polimorfismo rs9939609 A/T está associado com a obesidade e com um maior risco ($\text{RR} = 1,38$) para seu desenvolvimento (45). Também o desenvolvimento da SM foi associado à presença do alelo A do rs9939609 A/T ($\text{RR} = 1,23$) em diferentes etnias (49).

Em crianças britânicas a presença do alelo de risco para a obesidade do polimorfismo rs9939609 A/T foi associada positivamente com a saciedade, sugerindo um papel do *FTO* na regulação do apetite (50). De fato, o possível papel deste polimorfismo sobre o apetite, em especial estimulando a ingestão energética total e consumo de gorduras, foi confirmado em crianças, independente do IMC (Quadro 1; 51).

A relação do polimorfismo do gene do *FTO* com o apetite e sua associação com a obesidade sugerem a presença de uma importante interação gene-nutriente. Não existem estudos sobre a interação gene - nutriente do *FTO* com DM.

Genes cuja interação gene-nutriente foi descrita para condições ou fatores associados à obesidade ou DM

Polimorfismo do gene da Lípase Hepática (*LIPC*):

A lípase hepática é uma enzima lipolítica que catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis e dos fosfolipídios na maioria das lipoproteínas plasmáticas e exerce um papel chave no metabolismo do HDL colesterol (52).

O polimorfismo mais comum do gene da lipase hepática (*LIPC*) é o -514C>T, onde a presença do alelo T está associada a uma diminuição da atividade da lipase hepática e um aumento das concentrações do HDL colesterol. Entretanto, esse efeito é variável entre as populações (53). Em população americana com elevado o consumo de gordura total (>30% do valor energético total) a presença do polimorfismo -514C>T

reduziu os valores de HDL colesterol (Quadro 2; 7). Similar interação desse polimorfismo com o consumo de gordura total e os triacilgliceróis séricos foi também demonstrada em população asiática (Quadro 1, 54).

Em pacientes masculinos com DM tipo 2 e IMC ≥ 25 kg/m² foi demonstrada uma associação positiva entre o maior consumo de gordura saturada e os valores de HDL colesterol em portadores do alelo T quando comparados com homozigotos do alelo C. Este estudo sugere que as concentrações de HDL colesterol podem ser moduladas pela obesidade e o consumo de gordura saturada na presença do polimorfismo -514C>T do *LIPC* (Quadro 2; 55).

É possível também que os efeitos decorrentes da presença do polimorfismo 514C>T do *LIPC* sejam modulados pela ingestão de fibras, além da ingestão de gorduras. Um estudo realizado em mulheres obesas europeias avaliou polimorfismos associados com a obesidade e sua interação com o consumo diário de fibras totais (g/dia). Foi demonstrado que um maior consumo de fibras foi protetor (RR= 0,50; IC: 0,3-0,8; P = 0,01) para o efeito do polimorfismo -514C>T do *LIPC* no metabolismo lipídico. Possivelmente as fibras alimentares exercem um efeito que impede a redução dos valores do HDL colesterol na presença do -514C>T do *LIPC* (Quadro 2; 56).

A interação da gordura e fibras dietéticas com o gene *LIPC* ainda não está totalmente esclarecida, em especial o papel relativo de cada um destes nutrientes. São necessários ainda estudos de intervenção que avaliem a contribuição destes nutrientes para o risco ou proteção na presença do polimorfismo do *LIPC*.

Polimorfismo do gene da Adiponectina (*AdipoQ*)

A adiponectina (*adipoQ*) é uma proteína de produção específica pelos adipócitos. Tem função anti-aterogênica e regula a homeostase dos lipídeos e da glicose. Potencializa a ação da insulina no fígado e reduz a produção de glicose hepática, além

de induzir a oxidação de gorduras diminuindo os triacilgliceróis em nível hepático e muscular (57). A hipoadiponectinemia é causada por interações de fatores genéticos e ambientais e seus valores encontram-se diminuídos na obesidade, no DM tipo 2 e na SM (58).

O gene da *adipoQ* está localizado no cromossomo 3q27 e seus polimorfismos mais comuns são: -11391G>A, -11377C>G, 45T>G e 276G>T (59). A associação desses polimorfismos com a obesidade e DM tipo 2 pode ser encontrada em diferentes etnias.

Em franceses caucasianos, os polimorfismos -11377C>G e -11391G>A foram associados com a hipoadiponectinemia e risco de DM tipo 2 (60). Já na população japonesa, o polimorfismo 276G>T foi associado a redução de adiponectina plasmática e o maior risco para o DM tipo 2 (61). Ainda, homens caucasianos homocigotos C para o polimorfismo -11377C>G da *adipoQ* tiveram uma redução da resistência à ação da insulina (RI) após o consumo de uma dieta rica em gordura monoinsaturada (22% do valor energético da gordura total) e rica em carboidratos (55% do valor energético total) quando comparado a dieta rica em gordura saturada (20% da gordura total) (Quadro 2; 62).

Estudo realizado em indivíduos obesos hispânicos ao avaliar o risco do desenvolvimento da SM e o efeito de uma dieta hipocalórica na presença do polimorfismo -11391G>A da *adipoQ* demonstrou que homocigotos G tem um risco aumentado para a SM. Entretanto, o risco para o desenvolvimento da SM foi reduzido significativamente quando os homocigotos G seguiram uma dieta hipocalórica em um período de oito semanas (Quadro 2; 63).

Polimorfismo do gene do co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*PGC-1alfa*):

O co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (*PGC-1alfa*) exerce uma importante função na produção e utilização de energia, como termogênese, gasto energético, adipogênese, gliconeogênese hepática e na absorção da glicose (64). O gene do *PGC-1alfa* está localizado na região cromossômica 4p15.1 e está associado positivamente com concentrações plasmáticas de insulina e aumento do IMC. Sendo assim, é um forte gene candidato para RI e DM tipo 2 (65). Tem sido demonstrada uma associação com resistência à ação da insulina (RI) e com obesidade, em especial, em mulheres para o polimorfismo Gly482Ser (66).

Um estudo recente demonstrou que pacientes obesos e homozigotos para o alelo Ser apresentam maiores concentrações plasmáticas de insulina e um risco aumentado de RI quando comparados aos outros genótipos do gene Gly482Ser. Entretanto, quando os pacientes homozigotos Ser seguiram uma dieta hipocalórica em um período de oito semanas o risco de RI diminuiu significativamente (Quadro 2; 67). É provável que o efeito deletério deste polimorfismo genético possa ser atenuado, pelo menos em curto prazo, por uma intervenção dietoterápica.

Polimorfismo do gene da Proteína Transportadora de Ácidos Graxos 2 (*FABP2*):

A absorção de ácidos graxos (AG) da dieta pela mucosa intestinal, em especial de AG de cadeia longa, é carreada pela proteína denominada “Proteína Transportadora de Ácidos Graxos 2” (*FABP2*).

A troca de uma alanina (A) por uma treonina (T) no códon 54 do gene de *FABP2* resulta em um dos polimorfismos mais comuns desse gene. Indivíduos normais portadores do genótipo Ala54/Thr54 apresentaram uma redução na sensibilidade periférica à ação da insulina e maiores valores de ácidos graxos livres séricos quando consumiram uma dieta rica em ácidos graxos saturados, comparado a uma dieta rica em monoinsaturados ou em carboidratos (68). Indivíduos não diabéticos e homozigotos

Thr54 tiveram um aumento na resposta pós-prandial dos ácidos graxos séricos no carbono 14-18, quilomicrons e VLDL quando comparados aos homozigotos Ala54 (69).

Em pacientes com DM tipo 2 a presença do polimorfismo Ala54Thr foi associada com valores elevados de triacilgliceróis (70). Além disto, após sobrecarga lipídica um aumento nos triacilgliceróis plasmáticos foi observado em pacientes homozigotos T quando comparado aos pacientes homozigotos A (Quadro 2; 71). Também a concentração de ácidos graxos séricos parece depender deste polimorfismo em pacientes com DM. Recentemente foi demonstrado que apenas em pacientes com DM tipo 2 homozigotos para o alelo T no polimorfismo Ala54Thr do gene *FABP2* ocorreu aumento de ácidos graxos séricos após uma refeição usual padronizada quando comparados a pacientes com genótipo AA (Quadro 2; 72). Como este polimorfismo já foi também associado à presença de nefropatia diabética (70) é sugerido que esta interação gene-nutriente favoreça esta complicação crônica em pacientes com DM tipo 2.

Em conclusão, os estudos de interação gene-nutriente para o polimorfismo do A54T do *FABP2* demonstram um possível efeito deletério do consumo de gordura saturada na presença desse polimorfismo, em especial, em pacientes com DM tipo 2.

Polimorfismo do gene da Apoproteína (*Apo*)

As apolipoproteínas são uma família complexa de polipeptídios que determinam o destino metabólico dos lipídeos no plasma e sua captação pelos tecidos, sendo sua principal função ativar e inibir as enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas. As apolipoproteínas são divididas em Apoproteína A (*ApoA*), Apoproteína B (*ApoB*), Apoproteína C (*ApoC*) e Apoproteína E (*ApoE*).

A *ApoA1* é uma apoproteína que é sintetizada no fígado e corresponde a 80% de toda a proteína de alta densidade (HDL), e é essencial para integridade dessas partículas. O polimorfismo mais comum da *ApoA1* é o G → A na posição 75.

O *Framingham Offspring Study* demonstrou uma significativa interação gene-nutriente com este polimorfismo. Mulheres portadoras do alelo A com maior consumo de gordura poli-insaturada (>8% da energia derivada da gordura total) apresentaram maiores valores de HDL colesterol. Esse estudo sugere o possível efeito modulador dos ácidos graxos poli-insaturados nos efeitos do polimorfismo da *ApoA1* (Quadro 2; 8)

A *ApoE* é uma proteína integrante do HDL colesterol, da proteína de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons, além dos produtos de degradação lipolítica, como remanescentes de quilomícrons e lipoproteína de densidade intermediária (IDL). A síntese da *ApoE* ocorre principalmente no fígado. Há evidências que a *ApoE* modifica o efeito da insulina, bem como alguns fatores de risco cardiovascular, incluindo IMC, níveis de triacilgliceróis e concentrações de plasmáticas de LDL colesterol (73). O polimorfismo do gene da *ApoE* modifica a proteína tanto na sua estrutura quanto na sua função. Um dos polimorfismos que tem sido descrito é o -219G→T, o qual parece também ter um relação com a resistência à ação da insulina (RI) (73). Um ensaio clínico randomizado do tipo cruzamento de interação gene-nutriente em indivíduos portadores do polimorfismo -219G→T do gene da *ApoE* avaliou três diferentes tipos de dieta por 4 semanas cada uma: dieta rica em gordura saturada (>20% da energia derivada da gordura total), dieta rica em gordura monoinsaturada (>22% da energia derivada da gordura total) e uma dieta rica em carboidratos (>55% da energia total diária). Neste estudo foi demonstrado que todos os portadores do polimorfismo apresentaram menor sensibilidade à insulina, independentemente da dieta consumida. Entretanto, somente os portadores do alelo G ao consumirem uma dieta rica em gordura monoinsaturada e uma

dieta rica em carboidratos obtiveram uma melhora na sensibilidade à ação da insulina (Quadro 2; 74)

Conclusões

A patogênese da obesidade e do DM tipo 2 resulta da combinação de fatores genéticos e ambientais, tendo a dieta um importante papel na prevenção e no controle dessas patologias (12, 14). Nesse sentido, um melhor entendimento da interação entre consumo dietético e os possíveis genes candidatos para estas patologias, ou para as condições ou fatores a elas associadas, poderá fornecer uma base para determinação do papel da dieta na prevalência destas doenças crônicas (5), além de fornecer subsídios para intervenções dietoterápicas específicas.

Estudos citados nesta revisão vêm demonstrando os efeitos de diferentes nutrientes sobre os polimorfismos genéticos relacionados à obesidade ao DM tipo 2 e condições associadas. Os efeitos da dieta sobre diferentes fenótipos podem ser exercidos em muitos estágios entre transcrição da seqüência genética e a produção de proteínas funcionais (4). As evidências dos estudos de interação gene - nutriente com as doenças crônicas são relevantes não somente por identificar a influência de um determinado gene sobre um fenótipo em uma população com diferentes hábitos alimentares que potencialmente pode afetar esse fenótipo, mas também por avaliar a resposta de uma intervenção dietética entre indivíduos com diferentes genótipos (5).

Os principais nutrientes ou intervenções dietoterápicas que possivelmente tem implicação sobre polimorfismos genéticos associados à obesidade e o DM e seus efeitos sobre fenótipos são as gorduras, carboidratos e fibras. A maioria destes estudos destaca o consumo de gordura total (7, 26, 51), gordura saturada e gordura *trans* (23, 24, 27) como sendo fatores de risco associado à presença desses polimorfismos. Por outro lado, o consumo de gordura poli-insaturada (8), gordura monoinsaturada (62) e do ácido

graxo eicosapentaenóico (25) apresentaram efeitos benéficos em variáveis associadas com o DM tipo 2. Em pacientes obesos, estudos de associação em distintos polimorfismos demonstraram que o consumo de carboidratos pode ser um fator de risco (29, 40) e o consumo de fibras totais um fator de proteção em fenótipos associados à obesidade (56). Da mesma forma, a dieta hipocalórica testada em pacientes portadores dos polimorfismos associados com a obesidade demonstrou exercer um efeito significativo em fatores associados a risco, tais como índice de massa corporal, circunferência abdominal e pressão arterial (18, 19, 37), valores plasmáticos de glicose (33), leptina (37) e insulina (67) plasmáticas e também na redução de peso (34).

O papel preponderante da genômica nutricional associada à obesidade e ao DM tipo 2 evidenciado nos estudos revisados neste manuscrito torna imperativo a confirmação dos aspectos da dieta relacionados à interação gene- nutriente, indicando a necessidade de novos estudos, particularmente ensaios clínicos randomizados que avaliem a influência de diferentes nutrientes nos efeitos relacionados à presença de polimorfismos genéticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela bolsa de estudos no exterior concedida a autora Thais Steemburgo e à Universidade de Navarra - Espanha, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Referências

1. Ordovas JM, Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 101-108.
2. Van Ommen B. Nutrigenomics: exploiting systems biology in the nutrition and health arenas. *Nutrition* 2004; 20:4-8.
3. Müller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet* 2003; 34: 347-350.
4. Corthesy-Theulaz I, Den Dunnen JT, Ferre P, Geurts JMW, Muller M, Van Belzen N, et al. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Ann Nutr Metab* 2005; 49: 355-365.
5. Afman L, Muller M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc* 2006; 106: 569-576.
6. Gillies PJ. Nutrigenomics: The rubicon of molecular nutrition. *J Am Diet Assoc* 2003; 103: S50-S55.
7. Ordovas JM, Corella D, Demissie S, Cupples A, Couture P, Coltell O, et al. Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high-density lipoprotein metabolism. Evidence of a strong dose effect in this gene-nutrient interaction in the Framingham Study. *Circulation* 2002; 106: 2315-2321.
8. Ordovas JM, Corella D, Cupples LA, Demissie LA, Kelleher A, Coltell O, et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the *APOA1* G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 38-46.

9. Robitaille J, Pérusse L, Vohl MC. The *PPAR-gama* P12A polymorphism modulate the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Québec Family Study. *Clin Genet* 2003; 63: 109-116.
10. Robitaille J, Gaudet D, Pérusse L, Vohl MC. Features of the metabolic syndrome are modulated by an interaction between the peroxisome proliferator-activated receptor-delta -87T>C polymorphism and dietary fat in French-Canadians. *Int J Obes* 2007; 31: 411-417.
11. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053.
12. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and enviromental factors in relative body weight and human obesity. *Behav Genet* 1997; 27: 325-351.
13. Abelson P, Kennedy D. The obesity epidemic. *Science* 2004; 304: 1413.
14. Wareham NJ, Franks PW, Harding AH. Establishing the role of gene-enviroment interactions in the etiology of type 2 diabetes. *Endocrinol Metab Clin* 2002; 31: 553-566.
15. Goyenechea E, Parra D, Martinez JA. Impacto f interleukin-6 -174G>C polymorphism on obesity- related metabolic disorders in people with excess in body weigth. *Metab Clin Experim* 2007; 56: 1643-1648.
16. Möhlig M, Boeing H, Spranger J, Osterhoff M, Kroke A, Fisher E, et al. Body Mass Index and C-174G Interleukin-6 promoter polymorphism interact in predicting type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1885-1890.
17. Stephens JW, Hurel SJ, Lowe GDO, Rumbley A, Humphries SE. Association between plasma *IL-6*, the *IL-6* -174G>C gene variant and metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. *Mol Gene Metabol* 2007; 90: 422-428.

18. Song Y, Miyaki K, Araki J, Zhang L, Omae K, Muramatsu. The interaction between the interleukin 6 receptor gene genotype and dietary energy intake on abdominal obesity in Japanese men. *Metabolism Clin Exp* 2007; 56: 925-930.
19. Goyenechea E, Parra DM, Martínez JA. Weight regain after slimming induced by an energy-restricted diet depends on interleukin-6 and peroxisome-proliferator-activated-receptor- γ 2 gene polymorphism. *Br J Nutr* 2006; 96: 965-972.
20. Stumvoll M, Häring H. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 Pro12 Ala Polymorphism. *Diabetes* 2002; 51: 2341-2347.
21. Frederiksen L, Brodback K, Fenger M, Torben Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, et al. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the *PPAR-gama* in the Danish MONICA Cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3989-3992.
22. Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, et al. The Pro¹²→Ala substitution in *PPAR- γ* is associated with resistance to development of diabetes in the general population. Possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 891-894.
23. Pisabarro RE, Sanguinetti C, Stoll M, Prendez D. High incidence of type 2 diabetes in peroxisome proliferators-activated receptor γ 2 Pro12Ala carriers exposed to a high chronic intake of trans fatty acids and saturated fatty acids. *Diabetes Care* 2004; 27: 2251-2252.
24. Lindi VI, Uusitupa MIJ, Lindström J, Louheranta A, Eriksson JG, Valle TT, et al. Association of the Pro12Ala polymorphism in the *PPAR- γ 2* with 3-year incidence of type 2 diabetes and body weight change in the Finnish Diabetes Prevention Study Group. *Diabetes* 2002; 51: 2581-2586.

25. Ylönen SK, Salminen I, Lyssenko V, Virtanen S, Groop L, et al. The Pro12Ala polymorphism of the *PPAR- γ 2* gene affects associations of fish intake and marine n-3 fatty acids with glucose metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 1432-1439.
26. Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De Vivo I, Willett WC, et al. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor γ gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2923-2929.
27. Nelson TL, Fingerlin TE, Moss L, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. The *PPAR- γ* Pro12Ala polymorphism is not associated with body mass index or waist circumference among hispanics from Colorado. *Ann Nutr Metab* 2007; 51: 252-257.
28. Large V, Hellstrom L, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Eriksson P, Lannfelt L, et al. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. *Clin Invest* 1997; 100: 3005-3013.
29. Martinez JA, Corbalán MS, Sanches-Villegas A, Forga L, Marti A, Martinez-González MA, et al. Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu β 2-Adrenoceptor polymorphism. *J Nutr* 2003; 133: 2549-2554.
30. Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 1-9.
31. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and type II diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 946-965.
32. Marti A, Corbalán MS, Forga L, Martinez-Gonzales MA, Martinez JA. Higher obesity risk associated with the exon 8 insertion allele of the *UCP2* gene in a Spanish case-control study. *Nutrition* 2004; 20: 498-501.

33. Kim OY, Cho EY, Park HY, Jang T, Lee JH. Additive effect of the mutations in the β 3-adrenoreceptor gene and *UCP3* gene promoter on body fat distribution and glycemic control after weight reduction in overweight subjects with CAD or metabolic syndrome. In *J Obes* 2004; 28: 434-441.
34. Cha MH, Shin HD, Kim KS, Lee BH, Yoon Y. The effects of uncoupling protein 3 haplotypes on obesity phenotypes and very low-energy diet-induced changes among overweight Korean female subjects. *Metab Clin Exp* 2006; 55: 578-586.
35. Heo M, Leible RL, Boyer BB, Chung WK, Koulu M, Karvonen MMK, et al. Pooling analysis of genetic data: the association of leptin receptor (*LEPR*) polymorphisms with variables related to human adiposity. *Genetics* 2001; 159: 1163-1178.
36. Clement K, Vaisse C, Lahlou N. Mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 329: 398-401.
37. Roman DL, Aller DE, La Fuente R, Sagrado MG Izaola O, Vicente O. Leptin receptor Lys656Asn polymorphism is associated with decreased leptin response and weight loss secondary to a lifestyle modification in obese patients. *Arch Med Res* 2006; 37: 854-859.
38. De Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R. Influence of Lys656Asn polymorphism of leptin receptor gene on leptin response secondary to two hypocaloric diets: a randomized clinical trial. *Ann Nutr Metab* 2008; 52: 209-214.
39. Schwartz MW, Woods SC, Porte D. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-671.
40. Young EH, Wareham NJ, Farooqi S. The V1031I polymorphism of the *MC4R* gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29563 individuals. In *J Obes* 2007; 31: 1437-1441.

41. Pichler M, Kollerits B, Heid IM, Heid IM, Hunt SC, Adams TD, et al. Association of the melanocortin-4 receptor V103I polymorphism with dietary intake in several obese persons. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 797- 800.
42. Feng N, Young SF, Aguilera G, Elena Puricelli, Adler-Wailes DC, Sebring NG, et al. Co-occurrence of two partially inactivating polymorphism of *MC3R* is associated with pediatric-onset obesity. *Diabetes* 2005; 54: 2663-2667.
43. Santoro N, Perrone L, Cirillo G, Raimondo P, Amato A, Brienza C, et al. Effect of the melanocortin-3 receptor C17A and G241A variants on weight loss in childhood obesity. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 950- 953.
44. Hunt SC, Stone S, Xin Y, Scherer CA, Magness CL, Iadonato SP, et al. Association of the *FTO* gene with BMI. *Obesity* 2008, 16: 902-904.
45. Hota K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, Komatsu R, et al. Variations in the *FTO* gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet* 2008; 53: 546-553.
46. Yajnik CS, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Freathy RM, Prakash S, et al. *FTO* gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in South Asian Indians. *Diabetologia* 2009; 52: 247-252.
47. Chang YC, Liu PH, Lee WJ, Chang TJ, Jiang YD, Li HU, et al. Common variations in the *FTO* gene confers risk of obesity and modulates body mass index in the Chinese population. *Diabetes* 2008; 57: 2245-2252.
48. Frayling TM, Tipmson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM. A common variant in the *FTO* gene is associated with Body Mass Index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316: 889-893.

49. Al-Attar S, Pollex RL, Ban MR, Young TK, Bjerregard P, Anand SS, et al. Association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-caucasian multi-ethnic sample. *Cardiovasc Diabetol* 2008, 7:1-6.
50. Wardle J, Carnell S, Haworth CMA, Farooqi SI, O'Rahilly S, Plomin R, et al. Obesity-associated genetic variation in *FTO* associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3640-3643.
51. Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, Rogers I, Hattersley AT, McCarthy MI, et al. The fat mass- and obesity associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 971- 978.
52. Thuren T. Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 277-283.
53. Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetics and metabolics studies. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 259-267.
54. Tai ES, Corella D, Deurenberg -Yap M, Cutter J, Chew SK, Ordovas J. Dietary fat interacts with the -514C>T polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on plasma lipid profiles in a multiethnic Asian population: The 1998 Singapore National Health Survey. *J Nutr* 2003; 133: 3399-3408.
55. Zhang C, Lopez-Ridadura RI, Rimm EB, Rifai N, Hunter DJ, Hu FB. Interactions between the -514C→T polymorphism of the hepatic lipase gene and lifestyle factors in relation to HDL concentrations among US diabetic men. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1429-1435.
56. Santos JL, Boutin P, Verdich C, Holst C, Larsen LH, Toubro S, et al. Genotype-by-nutrient interactions assessed in European obese women. *Eur J Nutr* 2006; 45: 454-462.
57. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004; 53:S143-S151.

58. Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, et al. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1195-1200.
59. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetics influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 2007; 56: 1198-1209.
60. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaguet S, et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the *APM1* gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for the type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2607-2614.
61. Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002; 51: 536-540.
62. Pérez-Martínez P, López-Miranda J, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, Jimenez-Gómez Y, Fernandez JM, et al. Adiponectin gene variants are associated with insulin sensitivity in response to dietary fat consumption in Caucasian men. *J Nutr* 2008; 138: 1609-1614.
63. Goyenechea E, Collins LJ, Parra D, Abete I, Crujeiras AB, Martinez JA, et al. The -11391 G/A polymorphism of the adiponectin gene promoter is associated with metabolic syndrome traits and the outcome of an energy-restricted diet in obese subjects. *Horm Metab Res* 2009; 41: 55-61.
64. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (*PGC-1 alpha*): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrinol Rev* 2003; 24: 78-90.

65. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, et al. A genetic variation in the *PGC-1* gene could confer insulin resistance and susceptibility to type II diabetes. *Diabetologia*, 2002; 45: 740-743.
66. Esterbauer H, Oberkofler H, Linnemayr V, Iglseder B, Hedegger M, Wolfsgruber P, et al. Peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: association with obesity indices in middle-age women. *Diabetes* 2002; 51: 1281-1286.
67. Goyenechea E, Crujeiras AB, Abete I, Parra D, Martinez JA. Enhanced short-term improvement of insulin response to a low-calorie diets in obese carries the Gly482Ser variant of the *PGC-1 α* gene. *Diab Res Clin Pract* 2008; 82: 190-196.
68. Marin C, Perez-Jimenez F, Gomes P, Gómez P, Delgado J, Paniagua JA, et al. The Ala54Thr polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with a change in insulin sensitivity after a change in the type of dietary fat. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 196-200.
69. Agren JJ, Vidgren HM, Valve RS, Laakso M, Uusitupa MI. Postprandial responses of individual fatty acids in subjects homozygous for the threonine- or alanine-encoding allele in codon 54 of the intestinal fatty acid binding protein 2 gene. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:31-35.
70. Canani LH, Capp C, Ng DP, Choo SG, Maia AL, Nabinger GB, et al. The fatty acid-binding protein-2 A54T polymorphism is associated with renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54:3326-3330.
71. Georgopoulos A, Aras O, Tsai MY. Codon-54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with elevation of fasting and postprandial triglyceride in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3155-3160.
72. Almeida JC, Franzosi O, Moraes FS, Morelato A, Perassolo MS, Canani LH, Gross JL, Azevedo MJ. A polymorphism at codon 54 (Ala54Thr) in the *FABP2* gene

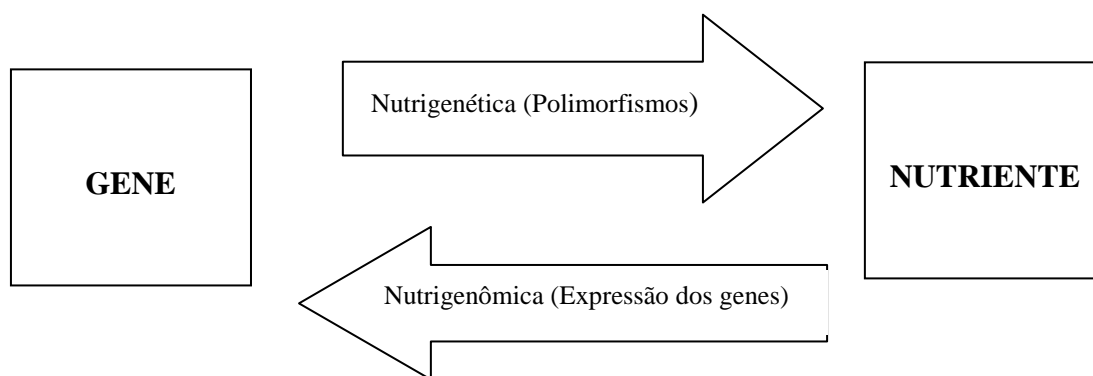
influences the postprandial serum fatty acids after standard meal in type 2 diabetic patients. American Diabetes Association's 68th Annual Meeting, June 6 June - 10, 2008, San Francisco, USA.

73. Laakso M, Kesaniemi A, Kervinen K, Jauhiainen K, Jauhiainen M, Pyorala L. Relation of coronary heart disease and apolipoprotein E phenotype in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *BMJ* 1991; 303:1159-1162.

74. Moreno JA, Pérez-Jimenez, Marín C, Pérez-Martínez P, Moreno R, Gómez P, et al. The apolipoprotein E gene promoter (-129G/T) polymorphism determines insulin sensitivity in response to dietary fat in healthy young adults. *J Nutr* 2005; 135: 2535-2540.

GENÔMICA NUTRICIONAL

Interação gene - nutriente



Adaptado de Gillies (6)

Figura 1. Esquema representativo das interações gene - nutriente na genômica nutricional

Tabela 1. Estudos de interação gene - nutriente com obesidade e diabetes melito.

GENE (Polimorfismo)	POPULAÇÃO (Delineamento)	FENÓTIPO AVALIADO	COMPONENTE DIETÉTICO ESTUDADO	RESULTADOS
<i>IL-6</i> Asp358Ala (T/G) ¹⁸	285 indivíduos japoneses (transversal)	IMC e circunferência abdominal	Consumo energético total	Associação de um maior consumo energético total e obesidade abdominal em portadores do alelo T.
<i>IL-6</i> (-174G→C) ¹⁹ e <i>PPAR-gama2</i> (Pro12Ala) ¹⁹	67 pacientes obesos caucasianos (ensaio clínico randomizado)	Perda de peso	Dieta hipocalórica (10 semanas)	Efeito sinérgico de ambos os polimorfismos na perda de peso depois do seguimento de dieta hipocalórica
<i>PPAR-gama2</i> (Pro12Ala) ²³	56 indivíduos caucasianos (transversal)	DM tipo 2	Gordura saturada Gordura <i>trans</i>	Portadores do alelo A com maior consumo de gordura saturada e <i>trans</i> foram mais susceptíveis ao desenvolvimento de DM tipo 2.
<i>PPAR-gama2</i> (Pro12Ala) ²⁴	522 pacientes obesos com tolerância à glicose diminuída (ensaio clínico randomizado)	DM tipo 2	Redução de gordura saturada Aumento de fibras totais Aumento da atividade física	Portadores do alelo A desenvolveram menos DM e melhora a sensibilidade à ação da insulina após a modificação de dieta e aumento da atividade física.
<i>PPAR-gama2</i> (Pro12Ala) ²⁶	2141 indivíduos caucasianos (caso-controle)	IMC	Gordura total	Maior risco para obesidade (RR = 3,40) em homozigotos do alelo Pro com maior consumo de gordura (>41,4% do VET).
<i>PPAR-gama2</i> (Pro12Ala) ²⁷	216 indivíduos hispânicos (transversal)	IMC	Gordura Saturada Gordura Monoinsaturada Gordura Poli-insaturada Razão P: S	Portadores de alelo A com alto consumo de gordura poli-insaturada e maior razão P: S foram associados com o IMC.
<i>ADRB2</i> (Gln27Glu) ²⁹	159 indivíduos caucasianos (transversal)	Obesidade	Carboidrato	Maior risco para obesidade (RR = 2,56) em mulheres portadoras do alelo Glu e com maior consumo de carboidrato (>49% do VET)

UCP3 (-55C/T) ³³ e ADRB3 (64T/A) ³³	224 pacientes com sobrepeso e obesidade portadores de SM e doença cardiovascular (ensaio clínico randomizado)	IMC, distribuição de gordura corporal, glicose plasmática, insulina, ácidos graxos livres, peptídeo C.	Dieta hipocalórica (12 semanas)	A dieta hipocalórica demonstrou efeito no controle glicêmico e na distribuição de gordura corporal somente em pacientes homocigotos dos alelos C e T.
UCP3 (-55C/T) ³⁴ (Int2-143G/C) ³⁴ (Tyr99Tyr) ³⁴ (Int3-47G/A) ³⁴ (Int4-498C/T) ³⁴ (Tyr210Tyr) ³⁴	214 mulheres coreanas com sobrepeso (ensaio clínico randomizado)	Redução de peso	Dieta hipocalórica (1 mês)	Portadores de haplótipos da UCP3 [CGTACC] tiveram maior redução de peso após o consumo da dieta hipocalórica.
LEPR (Lys656Asn) ³⁷	67 pacientes obesos (ensaio clínico randomizado)	IMC, peso, circunferência abdominal, pressão arterial e níveis de leptina plasmática	Modificação no estilo de vida: Dieta hipocalórica associado à atividade física (3 meses)	Homocigotos do alelo Lys apresentaram redução do IMC, peso, circunferência abdominal, pressão arterial sistólica e níveis de leptina após modificação no estilo de vida
MCR4 (V1031I) ⁴⁰	1029 pacientes com obesidade severa (transversal)	IMC	Consumo de macronutrientes	Alto consumo de carboidrato associado com o IMC em portadores do alelo de risco (V1031).
MCR3 (C17A) ⁴³ e (G241A) ⁴³	184 crianças obesas (transversal)	IMC	Dieta para redução de peso	Crianças portadoras de ambos os polimorfismos apresentaram uma maior dificuldade na perda de peso.
FTO (rs9939609 A/T) ⁵¹	8480 crianças (transversal)	Saciedade	Consumo de macronutrientes e de gorduras	Crianças portadoras do alelo A apresentaram um maior consumo de gordura total e VET.

DM = Diabetes Melito; IMC = Índice de Massa Corporal; VET = Valor Energético Total; RR = Risco Relativo. P: S = razão de consumo de gordura poli-insaturada: saturada

Tabela 2. Estudos de interação gene - nutriente com condições ou fatores associados ao DM e obesidade.

GENE (Polimorfismo)	POPULAÇÃO (Delineamento)	FENÓTIPO AVALIADO	COMPONENTE DIETÉTICO ESTUDADO	RESULTADOS
<i>PPAR-gama2</i> (Pro12Ala) ²⁵	571 indivíduos não diabéticos (transversal)	RI, insulina e glicose plasmática	Ácidos graxos dietéticos provenientes da carne de peixe	Mulheres portadoras do alelo A com alto consumo de EPA (carne de peixe) apresentaram menor RI e menores concentrações de insulina e glicose plasmática.
<i>LEPR</i> (Lys656Asn) ³⁸	78 pacientes obesos (ensaio clínico randomizado)	Níveis de leptina plasmática	Dieta pobre em gordura total vs. Dieta pobre em carboidrato (2 meses)	Homozigotos Lys que seguiram a dieta pobre em gordura apresentaram menores concentrações de leptina plasmática.
<i>LIPC</i> (-514C→T) ⁷	2130 indivíduos caucasianos (coorte)	HDL- colesterol	Gordura total	Portadores do alelo T com consumo de gordura >30% apresentaram menores valores de HDL colesterol.
<i>LIPC</i> (-514C→T) ⁵⁴	2170 indivíduos asiáticos (coorte)	Triacilgliceróis plasmáticos	Gordura total	Homozigotos do alelo T com consumo de gordura total >30% apresentaram maiores valores de triacilgliceróis plasmáticos.
<i>LIPC</i> (-514C→T) ⁵⁵	780 homens com DM tipo 2 (coorte)	HDL- colesterol	Gordura saturada	Concentrações de HDL colesterol em portadores do alelo T com IMC ≥ 25 Kg/m ² foram associadas positivamente com o consumo de gordura saturada e obesidade.
<i>LIPC</i> (-514C→T) ⁵⁶	549 mulheres européias obesas (coorte)	HDL- colesterol	Fibras totais	Consumo de fibras teve efeito protetor (RR = 0,50) na redução de HDL colesterol associada ao polimorfismo -514C→T
<i>AdipoQ</i> (-11377C/G) ⁶²	59 indivíduos caucasianos (ensaio clínico randomizado cruzado)	RI	Dieta rica em gordura saturada vs. Dieta rica em gordura monoinsaturada vs. Dieta rica em carboidrato (4 semanas)	Homens homozigotos C após o consumo da dieta rica em gordura monoinsaturada e da dieta rica em carboidrato apresentaram redução à ação da RI quando comparado ao consumo da dieta rica em gordura saturada.

<i>AdipoQ</i> (-11391G/A) ⁶³	180 indivíduos obesos hispânicos (ensaio clínico randomizado)	SM	Dieta hipocalórica (8 semanas)	Homozigotos do alelo G apresentaram redução do risco de desenvolvimento de SM, após o seguimento de uma dieta hipocalórica.
<i>PGC-1alfa</i> (Gly482Ser) ⁶⁷	180 indivíduos obesos hispânicos (ensaio clínico randomizado)	Insulina plasmática	Dieta hipocalórica (8 semanas)	Homozigotos do alelo Ser apresentaram menor risco de RI após o consumo da dieta hipocalórica.
<i>FABP2</i> (A54T) ⁷¹	15 pacientes com DM tipo 2 (experimento randomizado controlado)	Triacilgliceróis plasmáticos	Dieta teste rica em gordura saturada	Homozigotos do alelo T apresentaram um aumento nos triacilgliceróis plasmáticos após a dieta teste quando comparados aos homozigotos A.
<i>FABP2</i> (A54T) ⁷²	26 pacientes com DM tipo 2 (experimento randomizado controlado)	Ácidos graxos séricos	Ácidos graxos dietéticos provenientes de uma refeição teste rica em gordura saturada	Homozigotos do alelo T apresentaram um aumento da absorção de ácidos graxos saturados após o consumo da refeição teste quando comparados aos outros genótipos do A54T.
<i>ApoA1</i> (G-A) ⁸	755 homens caucasianos 822 mulheres caucasianas (coorte)	HDL-colesterol	Gordura poli-insaturada	Mulheres portadoras do alelo A com maior consumo de gordura do tipo poli-insaturada (>8% VET) apresentaram maiores valores de HDL colesterol
<i>ApoE</i> (-219 G → T) ⁷⁴	43 indivíduos caucasianos (ensaio clínico randomizado cruzado)	Sensibilidade à insulina	Dieta com 20% gordura saturada vs. Dieta com 22% gordura monoinsaturada vs. Dieta rica com 55% carboidrato	Portadores do alelo G quando consumiram dieta rica em gordura monoinsaturada e dieta rica em carboidratos tiveram melhora significativa na sensibilidade à insulina.

RI = Resistência à ação da insulina; EPA = ácido graxo eicosapentaenóico; SM = Síndrome Metabólica; VET = Valor energético total.

Capítulo II

THE *FTO* GENE AND FAT INTAKE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES

The *FTO* gene and fat intake in patients with type 2 diabetes mellitus

Thais Steemburgo^{a,b}

Fermin I. Milagro^b

Mirela J. Azevedo^a

Javier Campión^b

Jorge L. Gross^a

J. Alfredo Martínez^{b,*}

^a Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^b Department of Physiology and Nutrition, University of Navarra, Pamplona, Spain.

Abstract

The *FTO* rs9939609 (A/T) single- nucleotide polymorphism (SNP) have been associated with satiety and food intake in children and adolescents. We aimed to evaluate possible associations between rs9939609 (A/T) polymorphism and dietary intake in 236 adult patients with type 2 diabetes mellitus (DM) (126 women/ 110 men), receiving no previous dietary counseling. After clinical and laboratory examinations, dietary intake was evaluated by 3-day weighed-diet records, whose reliability was confirmed by 24-h urinary nitrogen output. The occurrence of the A allele of the *FTO* gene was associated with higher total fat [% of total energy (E); OR = 1.10] and saturated fatty acid [SFA (% of total E) intakes (OR = 1.15)]. This association was especially strong in women carrying the A allele (AA or AT genotypes), both for total fat (OR = 1.16) and SFA intakes (OR = 1.25). Also, a fat intake >34% median of total E was more frequent on A allele carriers (OR = 2.63), but this association was only evidenced in women (OR = 5.24). In conclusion, in patients with type 2 DM and particularly in women carrying the A allele of the *FTO* rs9939609 polymorphism was positively associated with a high fat intake.

Keywords: Diet; *FTO* gene; type 2 DM; fat intake.

Introduction

The discovery that common variants in the *FTO* (fat mass and obesity associated) gene are consistently associated with higher body weight (Frayling et al., 2007; Dina et al., 2007; Hunt et al., 2008), has turned the attention to the gene's functional effects. One common single nucleotide polymorphism (SNP) of the *FTO* gene is the rs9939609 (A/T), which is associated with an increased risk for obesity and type 2 diabetes mellitus (DM) (Frayling et al., 2007).

The *FTO* rs9939609 SNP has been linked with obesity through independent studies in different ethnic groups, such as Caucasian (Scuteri et al., 2007), Chinese (Chang et al., 2008) and Japanese populations (Hota et al., 2008). Furthermore, this SNP was associated with an increased risk for metabolic syndrome (MetS) in a multi-ethnic sample, confirming that the interaction could be extended to other populations (Al-Attar et al., 2008). This observation is particularly important in type 2 DM patients, because obesity and MetS are frequently presents. Moreover, a higher number of MetS components in these patients is associated with a higher frequency of coronary artery disease and microvascular chronic diabetic complications (Costa et al., 2003). The frequency of the rs9939609 polymorphism in the *FTO* gene in type 2 DM patients is approximately 42% (Frayling et al., 2007; Hertel et al., 2008).

The role of *FTO* is largely unknown, but this gene is expressed in skeletal muscle, adipose tissue, and in brain areas of the hypothalamus associated with feeding, suggesting it may act through effects on appetite or satiety (Stratigopoulos et al., 2008). In fact, a recent report from a sample of adults found differences in energy intake, but no differences in energy expenditure, suggesting that the *FTO* genotypes affects body weight via effects on food intake rather than energy expenditure (Speakmann et al., 2008). Moreover, studies in children demonstrated an association between genotypes at

rs9939609 (A/T) and appetite (evaluated by a standardized questionnaire). Children with two higher risk *FTO* alleles (AA) scored significantly lower on the satiety responsiveness scale, and the association was independent of body mass index (BMI) in such subjects (Wardle et al., 2008). On the other hand, children carrying the T allele have shown a protection against overeating by promoting responsiveness to internal signals of satiety (Wardle et al., 2008). Interestingly, children carriers of the A allele of the *FTO* gene appeared to consume more fat and total energy than those not carrying such variants (Timpson et al., 2008).

Considering that the *FTO* may exert an effect on obesity through an alteration of appetite and possibly on dietary choice, and that there are no studies that assessed the macronutrients consumption depending on genotypes of the *FTO* gene in adults subjects with type 2 DM, we evaluated possible associations between the SNP rs9939609 (A/T) polymorphism of the *FTO* gene and dietary intake in patients with type 2 DM.

Materials and methods

Patients

This cross-sectional study was conducted in patients with type 2 DM defined as subjects over 30 years of age at onset of DM, no previous episode of ketoacidosis or documented ketonuria, and treatment with insulin only after 5 years of diagnosis. Patients consecutively attending the outpatient clinic of the Endocrine Division at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) were selected based on the following criteria: no dietary counseling by a registered dietitian during the previous 6 months, creatinine ≤ 1.5 mg/dL and/or urinary albumin excretion (UAE) < 200 μ g/min, normal liver and thyroid function tests, and absence of urinary tract infection or other renal disease and cardiac failure.

Medications in use were maintained during the study. Blood pressure was measured twice to the nearest 2 mmHg, after a 10-minute rest, using a standard mercury sphygmomanometer (phases I / V Korotkoff). Hypertension was defined as blood pressure \geq 140/90 mmHg or the use of antihypertensive drugs. The presence of MetS was established according to the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) criteria (Grundy et al., 2004). The frequency of exercise, according to activities during a typical day, was classified into four levels: 1- none, 2-low, 3-moderate and 4-high, based on a questionnaire (Tuomilehto et al., 2001) adapted to local habits. Current alcohol intake was categorized as present or absent. Patients were classified as whites or non-whites (black or mixed) according to their own self-report. Smoking habit was considered in the presence of current smokers. Level of education was evaluated by years of formal study. The Ethics Committee approved the protocol and patients gave their written informed consent to participate.

Dietary Assessment

The patient's usual diet was assessed by means of a 3-day weighed-diet record technique (two non-consecutive weekdays and one-weekend day). Patients were issued commercial scales (1–125 g; H.R. Deutschendorf & Cia. Ltda, Brazil) and measuring cups (25–250 mL; Marinex, Brazil) and a detailed explanation and demonstration was given to each subject by the dietitian. Patients carried out a one-day training period on the weighed-diet record technique before starting the protocol. Compliance with the weight-record technique, besides an interview with the dietitian was assessed by comparison of protein intake estimated from the mean value of the 3-day weighed-diet records and from the 24-h urinary nitrogen output, performed on the third day of the weighed-diet record period (Moulin et al., 1998).

Dietary records were analyzed using the Nutribase 2007 Clinical Nutritional Manager software v.7.14 (Cybersoft Phoenix, AZ). Data intakes from nutrients were expressed in percent of total energy (% of total E), g/day and, mg/day. Nutrient data on frequently consumed foods were updated if necessary and /or complemented with data obtained from local manufacturers of specific industrialized foods (USDA, 1998).

Anthropometric Measurements

The body weight and height of patients (without shoes and coats) were obtained using a calibrated anthropometric scale, with measurements recorded to the nearest 100 g for weight and to the nearest 0.1 cm for height. Body mass index (BMI; kg/m²) was calculated as weight (kilograms) divided by square height (meters). Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest, near the umbilicus. Flexible, non-stretch fiberglass tape was used for measurements.

Laboratory Measurements

Blood samples were obtained after a 12-h fast. Plasma glucose level was determined by a glucose oxidase method and the A_{1C} test by an ion-exchange high-performance liquid chromatography procedure (Merck-Hitachi L-9100 glycated hemoglobin analyzer, reference range 4.7 - 6.0%; Merck, Darmstadt, Germany). Serum total cholesterol and triglycerides were measured by enzymatic-colorimetric methods, respectively (Merck Diagnostica, Darmstadt, Germany; Boeringher Mannheim, Buenos Aires, Argentina). HDL cholesterol was assessed by homogeneous direct method (autoanalyzer, ADVIA 1650), and LDL cholesterol was calculated using the Friedewald formula.

Genotyping of the FTO polymorphism

Detection of the *FTO* SNP rs9939609 was carried out using a validated genotyping assay (Assay ID C_30090620_10; Applied Biosystems, Foster City, CA). SNP genotyping was performed using an allelic discrimination assay (TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, CA, USA) using the ABI PRISM 7000 Real-Time PCR System and genotypes were read using automated software (SDS 1.1, Applied Biosystems, CA, USA). Reactions were run in 10 μ L volumes using an amplification protocol of 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, then 60°C for 1.5 minutes.

Statistical Analysis

Variables were analyzed by ANOVA, Student's *t* test, and χ^2 tests. The Kruskal-Wallis and the Mann-Whitney *U*- tests were applied to compare non-parametrics data between groups. A χ^2 test was also used to evaluate the Hardy-Weinberg equilibrium to analyze the frequency distribution of the genotypes. The mean daily intake of nutrients obtained from 3-day weighed records was used in all statistical analyses. Multiple logistic regression analysis was used to calculate the odds ratio (OR) and their respective 95% CIs for the presence of the two higher risk *FTO* alleles (AA). For analysis in the whole-group, the models were adjusted for gender, total energy intake, BMI, and LDL cholesterol. When women and men were separately analyzed, the models were adjusted for total energy intake, BMI, and LDL-cholesterol. Results were expressed as means (SD) or median (P25-P75). P values <0.05 were considered as statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 software (SPSS, Chicago, IL).

Results

The sample was categorized by gender (126 women/110 men). The clinical characteristics according to the rs9939609 (A/T) polymorphism in the *FTO* gene are

described in Table 1. No deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was observed ($\chi^2 = 1.12$; $P = 0.642$) concerning for genotype distribution. The allele frequencies in women were (AA = 13.5%, AT = 42.1%, TT = 44%), and in men (AA = 15.5%, AT = 43.6%, TT = 40.9%). In homozygotes A men, the prevalence of hypertension was 100% and was statistically significant as compared to the other genotypes ($P = 0.050$). In both genders, no significant differences in age, duration of DM, anthropometric measurements (BMI, weight, and waist circumference), presence MetS, and coronary artery disease were observed among the three genotypes. Furthermore, the proportion of white ethnicity, current smoking, alcohol intake, level of physical activity and education, also did not differ among genotypes.

The biochemical characteristics according with the allelic distribution are reported in the Table 2. Women and men carrying the A allele had higher concentrations of fasting plasma glucose and, A_{1C} test but these differences were not statistically different between the genotypes. Regarding, serum total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides, no differences were observed among patients with different genotypes. However, in the recessive model [patients with the homozygous genotype of risk (AA) vs. patients with other genotypes (TT + AT)], higher LDL cholesterol levels were evidenced, both in women [140.4 (35.5) vs. 122.1 (34.2) and 125.7 (37.9); $P = 0.081$] and men [127.9 (34.3) vs. 109.3 (39.6) and 126.2 (35.4); $P = 0.074$] than in the codominant model (AA vs. TT vs. AT).

Nutrient intakes according to the *FTO* genotypes are described in Table 3. The codominant model (AA vs. AT vs. TT), demonstrated differences in the total daily energy intake [1952.1 (452.2) vs. 2118.7 (451.9) vs. 2257.1 (496.7) Kcal/d; $P = 0.047$] only for men. No differences were observed in the intake of the carbohydrates and proteins in women and men. Interestingly, in the recessive model (AA vs. TT + AT)

women with the AA genotype presented a higher intake of total fat [34.4 (5.3) vs. 32.2 (7.5) and 32.6 (6.2) % of total energy; $P = 0.005$) and saturated fatty acids (SFA) [11.0 (3.1) vs. 9.3 (2.9) and 9.3 (2.3) % of total energy; $P = 0.022$] respectively, and a lower total fiber intake [12.4 (4.4) vs. 15.1 (6.3) and 16.7 (5.6) g/day; $P = 0.024$] as compared to other genotypes. Total fat, SFA, and total fiber intakes did not differ in men with different genotypes. In addition, when the food sources of fat and SFA were analyzed no differences were observed between genotypes in both men and women (data not shown).

The validity of the weight-record technique was confirmed by comparing daily protein intake estimated from the mean value of the 3-day weighed-diet records with the 24-h urinary nitrogen output [1.17 (0.30) vs. 1.17 (0.35) g/kg weight; $P = 0.873$].

The associations of carriers of the A allele (AA and AT genotypes) with total fat and SFA intakes were analyzed (Table 4). In the whole-group, it was observed an association of polymorphism of the *FTO* gene and fat intake (OR = 1.10; 95%CI 1.05-1.15; $P = 0.031$) and SFA intake (OR = 1.15; 95%CI 1.02-1.32; $P = 0.050$). When women and men were separately analyzed, only for women carriers of the A allele the association with fat intake (OR = 1.16; 95%CI 1.05-1.28; $P = 0.002$) and SFA intake (OR = 1.25; 95%CI 1.02-1.48; $P = 0.027$) remained significant.

In the total group of studied patients, the median value of daily intakes of fat was 34% of total energy (E). Figure 1 shows the association between carriers of the A allele at SNP rs9939609 in the *FTO* gene with fat consumption >34% of total E. In the whole-group, it was observed a positive association of the A allele with a higher fat consumption (OR = 2.63; 95%CI 1.18-5.85; $P = 0.018$), adjusted for gender, total energy intake, BMI, and LDL-cholesterol, and this association is even stronger in women (OR = 5.24; 95%CI 1.12-11.90; $P = 0.030$), adjusted for total energy intake,

BMI, and LDL-cholesterol. In men carriers of A allele no significant association with fat intake was observed.

Discussion

In the present study, we observed associations between the *FTO* rs9939609 (A/T) polymorphism and high fat intake, especially in women carrying the of A allele. Indeed, it was demonstrated a positive association between the presence of risk allele of the *FTO* gene with total fat (OR = 1.10) and SFA intakes (OR = 1.15), but this relationship was significant only for women. Accordingly, a higher fat intake (> 34% of total E) was positively associated with carrying of the A allele in whole-group (OR = 2.64) and, as expected this association was stronger in women (OR = 5.24). A consideration concerning this finding is that the gender can be an important factor in the *FTO* variants in patients with type 2 DM, as previously observed in children (Jacobsson et al., 2008).

The observed frequency of the minor allele (A) was similar to other studies in Caucasian population (Frayling et al., 2007; Hertel et al., 2008). Surprisingly, in patients with type 2 DM, we did not find an association of rs9939609 with obesity phenotypes. This lack of association probably occurred because MetS was present in most studied patients. In the other hand, no associations between metabolic traits such glucose, triglycerides and HDL-cholesterol and *FTO* variants, as demonstrated in non diabetics adults (Freathy et al., 2008), children, and adolescents were found (Jacobsson et al., 2008).

The impact of dietary factors on the phenotype can be exerted at many stages such as transcription of the genetic sequence and production of a functional protein (Hesketh et al., 1998). The mechanism (or mechanisms) of *FTO* gene effects remains still uncertain, but some studies have suggested a central role for *FTO* through food

intake regulation (Stratigopoulos et al., 2008) and a peripheral role through an effect on lipolytic activity in adipose tissue (Wahlen et al., 2007). The influence of *FTO* on body composition and on the risk of obesity and overweight has been reported in childhood and persist into adolescence (Frayling et al., 2007; Scuteri et al., 2007). Additionally, the few studies that examined the relationship between appetite (Wardle et al., 2008; Wardle et al., 2008) and dietary intakes (Timpson et al., 2008), with the *FTO* gene were performed in children or adolescents. In this context, an understanding of the interactions between macronutrient intake or dietary components in adulthood and the genotype is important to provide a basis for determining the role of dietary intake and habits in the prevalence and pathogenesis of important conditions such as type 2 DM and obesity (Afman et al., 2006; Marti et al., 2006; Marti et al., 2008).

A possible flaw of this study could be related to dietary data records, since most observational studies are limited due to the lack of accuracy for quantitative data. However, in the present study the accuracy of the recorded dietary data was confirmed by a significant correlation between protein intake as evaluated by weighed-diet record and 24-h urinary nitrogen output as previously demonstrated in patients with type 2 DM (Moulin et al., 1998).

In conclusion, for the first time, the association of dietary intake in genotypes of *FTO* in adult patients with type 2 DM was evaluated. We found in type 2 diabetic subjects, particularly in women, a relationship of carrying of the rs9939609 (A/T) polymorphism in the *FTO* gene and a highest fat consumption that suggests a possible interaction between of the *FTO* gene and fat intake. However, further trials are needed to confirm these results, which are in agreement with data from children and adolescents and suggest a long-term impact of this polymorphism on food intake.

Acknowledgements

We thank the special line research “*Obesidad, Nutrición y Salud*” (LE/97) of University of Navarra (Spain) and, the “*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*” (CNPq) of Brasil for financial support. TS is a recipient of scholarships from CNPq. Also, “*Parques y Pascual Catedra*” at the University of Navarra (Spain) are gratefully acknowledged.

References

- Afman, L., Muller, M. (2006). Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *Journal American Dietetic Association*, 106, 569-576.
- Al-Attar, S., Pollex, R. L., Ban, M.R., Young, T. K, Bjerregard, P., et al. (2008) Association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-caucasian multi-ethnic sample. *Cardiovascular Diabetology*, 7, 1-6.
- Chang, Y. C., Liu, P. H., Lee, W. J., Chang, T. J., Jiang, Y. D., et al. (2008) Common variations in the *FTO* gene confers risk of obesity and modulates body mass index in the Chinese population. *Diabetes*, 57, 2245-2252.
- Costa, L. A., Canani, L. H., Lisbo, H. R. K., Tres, G., & Gross, J. L. (2003). Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 21, 252–255.
- Dina, C., Mey, D., Gallin, S., Durant, E., Korner, A., et al. (2007) Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genetics*, 39, 724-726.
- Frayling, T. M., Timpso, N.J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., et al. (2007) A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316, 889-894.
- Freathy, R. M., Timpson, N. J., Lawlor, D. A., Pouta, A., Ben-Shlomo, Y., et al. (2008) Common Variation in the *FTO* gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes*, 57, 1419-1426.

- Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004) Definition of metabolic syndrome - report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/ American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*, *109*, 433-438.
- Hesketh, J. E., Vasconcelo, M. H., & Bergamo, G. (1998) Regulatory signals in messenger RNA: determinants of nutrient gene interactions and metabolic compartmentation. *British Journal Nutrition*, *80*, 307-321.
- Hertel, J. K., Johanson, S., Raeder, H., Midthjell, K., Lyssenko, V., et al. (2008) Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1638 unselected patients with type 2 diabetes and 1858 control participants from a Norwegian population-based cohort (the Hunt study). *Diabetologia*, *51*, 971-977.
- Hota, K., Nakata, Y., Matsuo, T., Kamohara, S., Kotani, K., et al. (2008) Variations in the *FTO* gene are associated with severe obesity in the Japanese. *Journal of Human Genetics*, *53*, 546-553.
- Hunt, S. C., Stone, S., Xin, Y., Scherer, C. A., Magness, C. L., et al. (2008) Association of the *FTO* gene with BMI. *Obesity*, *16*, 902-904.
- Jacobsson, J. A., Klovins, J., Kapa, I., Danielsson, P., Svensson, V., et al. (2008) Novel genetic in *FTO* influences insulin levels and insulin resistance in severely obese children and adolescents. *International Journal of Obesity*, *32*, 1730-1735.
- Jacobsson, J. A., Danielsson, P., Svensson, V., Klovins, J., Gyllensten, U., et al. (2008) Major gender difference in association of *FTO* gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *368*, 476-482.

- Marti, A., & Martinez, J. A. (2006) Genetics of obesity: gene x nutrient interactions. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 76, 184-193.
- Marti, A., Martinez-González, M. A., & Martinez, J. A. (2008) Interaction between genes and lifestyle factor on obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67, 1-8.
- Moulin, C. C., Tiskievicz, F., Zelmanovitz, T., Oliveira, J., Azevedo, M. J., & Gross, J. L. (1998) Use of weighed diet records in the evaluation of diets with different protein contents in patients with type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 853-857.
- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., et al. (2007) Genome-wide association scan shows genetics variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genetics*, 3, 115-115.
- Speakman, J. R., Rance, K. A., & Johnstone, A. M. (2008) Polymorphism of the *FTO* gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity*, 16, 1691-1695.
- Stratigopoulos, G., Padilha, S. L., LeDuc, C. A., Watson, E., Prokopenko, I., et al. (2008) Regulation of *Fto/Fm* gene expression in mice and humans. *American Journal Physiology-Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*, 294, R1185-R1196.
- Timpson, N. J., Emmett, P. M., Frayling, T. M., Rogers, I., Hattersley, A. T., et al. (2008) The fat mass-and-obesity- associated and dietary intake in children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 971-978.
- Tuomilehto, L., Lindstron, J., Eriksson, J. G., Vale, T. T., Hämäläinen, H., Ilanne-Parikka, P., et al. (2001) For the Finnish Diabetes Prevention Study Group.

Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *New England Journal of Medicine*, 334, 1343-1350.

USDA SR 13 Research Quality Nutrient Data. (1998) The Agricultural Research Service: Composition of Foods, Agricultural Handbook n° 8 Washington, DC, US Department of Agriculture.

Wahlen, K., Sjolín, E., Hoffsted L. (2007). The common rs9939609 gene variant of the mass and obesity associated gene (*FTO*) is related to fat cell lipolysis. *The Journal of Lipid Research*, 49, 607-611.

Wardle, J., Carnell, S., Haworth, C. M. A., Farooqi, O'Rahilly, S., et al. (2008) Obesity-associated genetic variation in *FTO* associated with diminished satiety. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93, 3640-3643.

Wardle, J., Llewellyn, C., Sanderson, S., & Plomin, R. (2008) The *FTO* gene and measured food intake in children. *International Journal of Obesity*, 33, 42-45.

Table 1

Clinical characteristics in 236 patients with type 2 DM according to the *FTO* genotypes

	<i>FTO</i> gene rs9939609 (A/T) genotypes			Codominant model* P	Recessive model** P
	TT	AT	AA		
Genotypes <i>FTO</i> (%)					
Women (n = 126)	56 (44%)	53 (42.1%)	17 (13.5%)	-	-
Men (n = 110)	45 (40.9%)	48 (43.6%)	17 (15.5%)	-	-
Age (years)					
Women	57.8 (10.3)	60.7 (12.3)	58.3 (13.8)	0.449	0.752
Men	59.0 (8.9)	63.1 (7.6)	59.9 (8.7)	0.250	0.601
Ethnicity (white)					
Women	50 (89.3%)	44 (83%)	14 (82.4%)	0.590	0.670
Men	42 (93.3%)	41 (85.4%)	13 (76.5%)	0.181	0.146
Duration of DM (years)					
Women	14.5 (9.1)	12.8 (8.8)	12.6 (7.0)	0.534	0.631
Men	10.6 (6.7)	12.6 (8.1)	12.4 (7.3)	0.428	0.706
Metabolic Syndrome NCEP ATP III (%)					
Women	43 (76.8%)	45 (84.9%)	14 (82.4%)	0.552	0.874

Men	32 (71.1%)	29 (69.4%)	10 (58.8%)	0.485	0.592
Coronary artery disease (%)					
Women	5 (8.9%)	6 (11.3%)	1 (5.9%)	0.785	0.582
Men	8 (17.8%)	9 (19.1%)	3 (17.6%)	0.982	0.935
Hypertension (%)					
Women	50 (89.3%)	43 (81.1%)	13 (76.5%)	0.330	0.353
Men	38 (84.4%)	38 (79.2%)	17 (100%)	0.124	0.050
BMI (kg/m ²)					
Women	28.7 (3.8)	28.8 (4.6)	29.5 (4.9)	0.704	0.533
Men	28.3 (4.1)	28.1 (3.9)	28.8 (4.7)	0.827	0.566
BMI \geq 30kg/m ² (%)					
Women	21 (37.5%)	23 (43.4%)	8 (47.1%)	0.718	0.602
Men	15 (33.3%)	12 (25%)	6 (35.3%)	0.637	0.624
Weight (kg)					
Women	70.8 (11.0)	70.1 (11.4)	73.2 (13.7)	0.628	0.360
Men	81.2 (14.1)	79.9 (12.8)	85.9 (15.8)	0.310	0.142
Waist circumference (cm)					
Women	98.4 (9.8)	98.8 (10.5)	98.9 (14.0)	0.978	0.900
Men	101.9 (10.6)	100.1 (9.6)	102.0 (10.8)	0.633	0.709

Diabetes treatment (D/OA/I or I+ OA %)					
Women	3.6/55.1/41.1	3.8/60.4/40.9	5.9/52.9/41.1	0.847	0.608
Men	4.4/62.2/33.4	8.3/58.3/33.4	5.9/70.6/23.5	0.638	0.303
Current smoking (%)					
Women	4 (7.1%)	9 (17%)	2 (11.8%)	0.625	0.962
Men	5 (11.1%)	5 (10.8%)	2 (11.8%)	0.931	0.673
Current alcohol intake (%)					
Women	12 (21.4%)	17 (32.1%)	2 (11.8%)	0.430	0.402
Men	19 (42.2%)	23 (47.9%)	10 (58.8%)	0.575	0.352
Education ≤ 8 years (%)					
Women	7 (12.7%)	15 (28.3%)	1 (5.9%)	0.225	0.692
Men	11 (38.6%)	5 (10.4%)	4 (25%)	0.430	0.505
Frequency of exercise: level 1 (%)					
Women	40 (71.4%)	31 (58.5%)	10 (58.8%)	0.540	0.876
Men	22 (48.9%)	20 (41.7%)	10 (58.8%)	0.430	0.520

DM, Diabetes Mellitus; NCEP ATP III, National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III; BMI, Body mass index.

D, diet only; OA, oral antidiabetic agents; I, insulin. Data are mean (SD) or number of patients with analyzed characteristics (%).

*Codominant model (TT vs. AT vs. AA) P-Values using ANOVA; **Recessive model (AA vs. TT + AT) P-Values using the Student's t test.

Table 2

Biochemical characteristics in 236 patients with type 2 DM according to the *FTO* genotypes

	<i>FTO</i> gene rs9939609 (A/T) genotypes			Codominant model* P	Recessive model** P
	TT	AT	AA		
Fasting plasma glucose (mg/dL)					
Women	135.4 (32.9)	138.7 (35.7)	155.9 (57.8)	0.103	0.329
Men	128.3 (52.1)	142.3 (51.9)	154.5 (62.1)	0.242	0.183
A _{1C} test (%)					
Women	6.9 (5.2-13.0)	7.4 (5.6-12.8)	8.1 (5.5-11.8)	0.719	0.874
Men	6.4 (4.1-11.9)	6.7 (5.4-10.2)	6.9 (5.5-12.1)	0.549	0.492
Total cholesterol (mg/dL)					
Women	206.6 (38.8)	209.2 (46.3)	216.2 (35.6)	0.714	0.449
Men	201.3 (39.3)	206.6 (35.5)	189.9 (43.7)	0.324	0.176
HDL cholesterol (mg/dL)					
Women	53.7 (10.6)	53.9 (14.2)	50.0 (9.6)	0.486	0.230
Men	46.2 (9.1)	48.2 (10.8)	49.6 (17.0)	0.546	0.447
LDL cholesterol (mg/dL)					

Women	122.1 (34.2)	125.7 (37.9)	140.4 (35.5)	0.192	0.081
Men	109.3 (39.6)	126.2 (35.4)	127.9 (34.3)	0.200	0.074
Triglycerides (mg/dL)					
Women	121 (49-386)	146 (40-455)	129 (80-293)	0.978	0.846
Men	134 (57-359)	127 (40-398)	139 (40-421)	0.639	0.885

HDL, high- density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Data are mean (SD) or median (P25-P75).

*Codominant model (TT vs. AT vs. AA) P-Values using ANOVA;**Recessive model (AA vs. TT + AT) P- Values using the Student's t test. Non- parametric variables: the P-Values is obtained using the Kruskal-Wallis or the Mann-Whitney U test.

Table 3

Daily intake of nutrients in 236 patients with type 2 DM according to the *FTO* genotypes

	<i>FTO</i> gene rs9939609 (A/T) genotypes			Codominant	Recessive
	TT	AT	AA	model* P	model** P
Total energy intake (kcal)					
Women	1670.2 (441.3)	1561.3 (439.1)	1672.8 (433.1)	0.629	0.335
Men	1952.1 (452.2)	2118.7 (451.9)	2257.1 (496.7)	0.047	0.075
Carbohydrate (% of total E)					
Women	49.0 (9.2)	48.7 (6.2)	47.3 (8.1)	0.388	0.263
Men	46.3 (9.1)	48.0 (9.7)	48.1 (5.5)	0.172	0.688
Protein (% of total E)					
Women	18.1 (3.8)	19.1 (3.4)	18.2 (2.5)	0.327	0.850
Men	20.3 (4.7)	19.3 (3.6)	19.1 (4.0)	0.425	0.538
Fat (% of total E)					
Women	32.6 (7.5)	32.2 (6.2)	34.4 (5.3)	0.018	0.005
Men	33.4 (6.5)	32.6 (5.7)	32.6 (11.8)	0.823	0.739
Saturated fatty acid (% of total E)					

Women	9.3 (2.9)	9.3 (2.3)	11.0 (3.1)	0.073	0.022
Men	9.7 (2.1)	9.7 (2.0)	9.8 (3.6)	0.980	0.853
Monounsaturated fatty acid (% of total E)					
Women	11.4 (2.8)	11.3 (2.5)	12.6 (2.1)	0.233	0.089
Men	11.3 (2.3)	11.2 (2.6)	12.6 (4.2)	0.220	0.084
Polyunsaturated fatty acid (% of total E)					
Women	9.8 (2.7)	9.1 (3.2)	10.5 (3.8)	0.186	0.130
Men	9.7 (3.4)	8.6 (2.9)	9.7 (3.2)	0.373	0.578
Trans fatty acid (% of total E)					
Women	1.1 (0.7)	1.3 (0.7)	1.2 (0.5)	0.664	0.867
Men	1.6 (0.6)	1.3 (0.6)	1.2 (0.6)	0.485	0.815
P/S fatty acid ratio					
Women	1.3 (0.4)	1.0 (0.4)	1.1 (0.6)	0.705	0.808
Men	0.9 (0.3)	0.9 (0.4)	1.1 (0.6)	0.405	0.245
Cholesterol (mg)					
Women	174.6 (74.8)	200.3 (100.1)	201.7 (107.4)	0.319	0.560
Men	234.6 (105.5)	258.4 (129.1)	235.6 (111.4)	0.582	0.716
Total fiber (g)					
Women	15.1 (6.3)	16.7 (5.6)	12.4 (4.4)	0.024	0.023

Men	17.8 (7.8)	20.4 (7.0)	19.7 (8.2)	0.266	0.785
-----	------------	------------	------------	-------	-------

Data are expressed as mean (SD); E: energy; P/S: Polyunsaturated/Saturated. *Codominant model (TT vs. AT vs. AA) P- values using ANOVA; **Recessive model (AA vs. TT + AT) P-values using the Student's t test.

Table 4

Association (OR)* between carriers of A allele in the *FTO* gene and fat and, saturated fatty acid intakes

	Odds Ratio	95% CI	P
Whole-group[†]			
Fat (% of total E)	1.10	1.05-1.15	0.031
Saturated fatty acid (% of total E)	1.15	1.02-1.32	0.050
Women[‡]			
Fat (% of total E)	1.16	1.05-1.28	0.002
Saturated fatty acid (% of total E)	1.25	1.02-1.48	0.027
Men[‡]			
Fat (% of total E)	1.03	0.96-1.11	0.391
Saturated fatty acid (% of total E)	0.98	0.77-1.24	0.893

OR, Odds Ratio; E, energy.

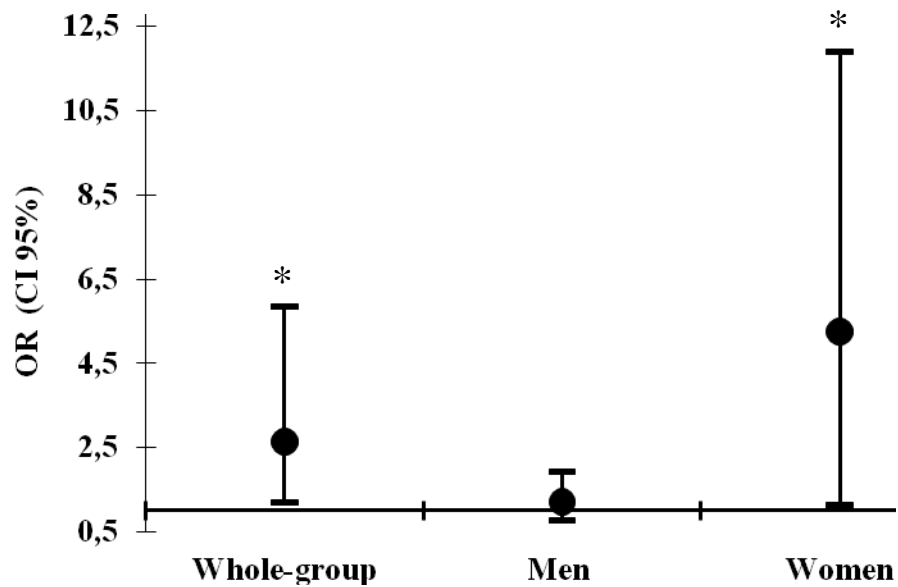
*Multiple logistic regression analysis was used to examine independent variables associated with carriers of the A allele.

[†]Regression models were adjusted for gender, total energy intake, BMI, and LDL-cholesterol.

[‡]Regression models were adjusted for total energy intake, BMI, and LDL-cholesterol.

Figure 1

Association of the presence of the A allele in the *FTO* gene with total fat consumption >34% of total energy



In whole-group, the regression models were adjusted for gender, total energy intake, BMI, and LDL-cholesterol.

For men and women separately analyzed, the models were adjusted for total energy intake, BMI, and LDL-cholesterol.

* $P < 0.05$

Capítulo III

**ASSOCIATION OF *FTO* rs7204609 POLYMORPHISM WITH METABOLIC
SYNDROME AND MICROALBUMINURIA IN BRAZILIAN PATIENTS WITH
TYPE 2 DIABETES**

Association of *FTO* rs7204609 polymorphism with metabolic syndrome and microalbuminuria in Brazilian patients with type 2 diabetes

Running title: MetS, microalbuminuria and *FTO* polymorphism

Thais Steemburgo, RD^{1,2}

Mirela J. Azevedo, MD, PhD¹

Fermín I. Milagro, PhD²

Javier Campión, PhD²

Jorge L. Gross, MD, PhD¹

J. Alfredo Martínez, PhD²

¹ Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Institute of Nutrition and Food Sciences, University of Navarra, Spain.

Abstract

Objective- Variations in the fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene has been related with obesity and diabetes phenotypes. The purpose of this study was to investigate the possible association of rs7204609 (C/T) single-nucleotide polymorphism (SNP) of the *FTO* gene with adiposity markers, metabolic syndrome (MetS), and chronic diabetic complications in patients with type 2 diabetes.

Research design and methods- This cross-sectional study genotyped the *FTO* rs7204609 SNP in 236 Brazilian outpatients with type 2 diabetes (46.6% males, aged 60.0 ± 10.3 years, diabetes duration 12.7 ± 8.2 years). Patients underwent 3-day weighed-diet records and clinical and laboratory evaluation.

Results- Patients with allele C (CT and CC genotypes) had more frequently MetS (International Diabetes Federation criteria; 94.3% vs. 76.6%, $P = 0.017$) than patients with TT genotype. Total daily energy and nutrient intake were not different between patients with and without the C allele. In multiple logistic regression models C carriers had an increased risk for the presence of MetS (OR = 5.46; 95%CI 1.25-23.9; $P = 0.024$) and for BMI ≥ 30 kg/m² (OR = 3.74; 95%CI 1.73-8.08; $P = 0.001$). Also, the presence of allele C conferred an increased risk for microalbuminuria (OR = 2.28; 95%CI 1.08-4.85; $P = 0.031$). All regression models were adjusted for gender, duration of diabetes, and systolic blood pressure.

Conclusions - In Brazilian patients with type 2 diabetes the presence of C allele of the *FTO* rs7204609 SNP increases the risk for MetS and for the presence of microalbuminuria.

The “Fat Mass and Obesity Associated” (*FTO*) gene appears as an important contributor to human adiposity due probably to an effect in the central control of energy homeostasis (1). Several common single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *FTO* gene have been found to be strongly and positively associated with body mass index (BMI) such as rs9939609, rs1421085, rs17817449, rs11075986, rs1121980, rs8050136, rs3751812, rs7199182, rs7204609 (2-5) and other adiposity markers including variants rs9939609, rs1421085, rs1121980, rs8050136 (2, 5, 6). Actually, the association of *FTO* gene variants with obesity can be different according ethnics and/or adiposity features. Thus, SNPs *FTO* positive associations were observed in Korean (3), Caucasian (5), Japanese (6), Norwegian (7), and Indians populations (8). On the other hand, no association was identified of 16 common SNPs of the *FTO* gene with BMI in predominantly lean African subjects (9).

Body weight homeostasis features and adiposity related conditions were also associated with SNPs of *FTO* gene. The SNP rs17817449 was linked to with insulin resistance and plasma leptin values in French-Canadian families (4) and Hispanic Americans (5). Some SNPs of *FTO* gene (rs9939609, rs7191344, rs8050136) were also associated with type 2 diabetes (2, 7, 8, 10, 11). In addition, a common variant of the *FTO* gene (rs9939609) has been associated with metabolic syndrome (MetS) or its components (12, 13) in Caucasian (12) and non-Caucasian multi-ethnic samples (13). This observation is particularly important in type 2 diabetes patients because MetS frequently occurs in these patients and a higher number of MetS components were associated with a higher prevalence of coronary artery disease and microvascular chronic diabetic complications (14). Variants of the *FTO* gene (rs9939609, rs7191344, rs8050136) have been studied in patients with established diabetes especially regarding

obesity (7, 11). However, as far as we know, there is no information about possible association of diabetic complications with *FTO* SNPs.

The rs7204609 (C/T) SNP of the *FTO* gene was scarcely investigated and the mechanisms by which this SNP as others *FTO* variants could influence obesity is still unknown (1). The aim of this paper was to examine possible associations between the SNP rs7204609 (C/T) polymorphism of the *FTO* gene with obesity-related markers, MetS, and chronic diabetic complications in patients with type 2 diabetes.

Research design and methods

Patients

This cross-sectional study was conducted in patients with type 2 diabetes defined as subjects over 30 years of age at onset of DM, no previous episode of ketoacidosis or documented ketonuria, and treatment with insulin only after 5 years of diagnosis. Patients consecutively attending the outpatient clinic of the Endocrine Division at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) were selected based on the following criteria: no dietary counseling by a registered dietitian during the previous 6 months, serum creatinine ≤ 1.5 mg/dL and/or urinary albumin excretion rate (AER) < 200 $\mu\text{g}/\text{min}$, normal liver and thyroid function tests, and absence of urinary tract infection or other renal disease and cardiac failure.

Medications in use were maintained during the study. The frequency of exercise, according to activities during a typical day, was classified into four levels: 1-none, 2-low, 3-moderate and 4-high, based on a questionnaire adapted to local habits (15). Current alcohol intake was categorized as present or absent. Patients were classified as whites or non-whites (black or mixed) according to their own self-report. Smoking habit was considered in the presence of current smoking. Level of education was evaluated by years of formal study. Blood pressure was measured twice to the nearest 2 mmHg, after

a 10-minute rest, using a standard mercury sphygmomanometer (phases I / V Korotkoff). Hypertension was defined as blood pressure $\geq 140/90$ mmHg measured on two occasions or the use of antihypertensive drugs. Fundus examination was performed through dilated pupils, and diabetic retinopathy was graded as present or absent. According to 24-h AER patients were classified as normoalbuminuric (AER < 20 $\mu\text{g}/\text{min}$) or microalbuminuric (20-199 $\mu\text{g}/\text{min}$). Microalbuminuria was always confirmed in a second urine sample (16). Diagnosis of MetS was based on the International Diabetes Federation (IDF) criteria: central obesity (waist circumference ≥ 94 cm for men, ≥ 80 cm for women) plus any two of the following: triglycerides ≥ 150 mg/dl and/or HDL < 40 mg/dl for men and < 50 mg/dl for women, blood pressure $\geq 130/85$ mmHg (or use of antihypertensive drugs) and raised blood glucose or DM (17).

The Ethics Committee approved the protocol and patients gave their written informed consent to participate in the study.

Dietary Assessment

The patient's usual diet was assessed by 3-day weighed-diet record technique (two non-consecutive week days and one-weekend days). Patients were issued commercial scales and measuring cups and a detailed explanation and demonstration was given to each subject. Compliance with the weight-record technique, besides an interview with the nutritionist, was confirmed by comparison of daily protein intake estimated from the 3-day weighed-diet records and from 24-h urinary nitrogen output, performed on the third day of the weighed-diet record period (18).

Dietary records were analyzed using the Nutribase 2007 Clinical Nutritional Manager software v.7.14 (Cybersoft Phoenix, AZ). Data intakes from nutrients were expressed in percent of total energy (% of total E), g/day and mg/day. Nutrient data on

frequently consumed foods were updated if necessary and /or complemented with data obtained from local manufacturers of specific industrialized foods (19).

Anthropometric Measurements

The body weight and height of patients (without shoes or coats) were obtained using an anthropometric scale, with measurements recorded to the nearest 100 g for weight and to the nearest 0.1 cm for height. Body mass index (BMI; kg/m²) was calculated as weight (kilograms) divided by squared height (meters). Waist circumference was measured midway between the lowest rib margin and the iliac crest, near the umbilicus. Flexible, non-stretch fiberglass tape was used for measurements.

Laboratory Measurements

Blood samples were obtained after a 12-h fast period. Plasma glucose level was determined by glucose oxidase method and the HbA_{1C} by an ion-exchange high-performance liquid chromatography procedure (Merck-Hitachi L-9100 glycated hemoglobin analyzer, reference range 4.7 - 6.0%; Merck, Darmstadt, Germany). Urinary albumin was measured by an immunoturbidimetric method (Microalb; Ames-Bayer, Tarrytown NY. In our laboratory using urine samples with albumin concentration of 30 and 100 mg/l the intra- and inter-assay CVs were both <6% (20). Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the Modification of Diet in Renal Disease formula (21): $186 \times [\text{plasma creatinine (mg/dl)}]^{-1.154} \times \text{age (years)}^{-0.203} \times (1.212 \text{ if black}) \times (0.742 \text{ if female})$. Plasma insulin levels were measured by electrochemiluminescence (Elecsys R System/2010, Modular E-170 ROCHE, sensitivity 0.2 mUI/ml, mean intra- and interassay CV: 2.0 and 5.96%, reference range 2.6 - 24.9 mUI/ml). Insulin resistance was estimated by homeostasis model assessment resistance index (HOMA-IR = fasting serum insulin [in microunits per milliliter] \times fasting plasma glucose [in millimoles per liter]/22.5) (22). Serum total cholesterol and

triglycerides were measured by enzymatic-colorimetric methods (Merck Diagnostica, Darmstadt, Germany; Boeringher Mannheim, Buenos Aires, Argentina). HDL cholesterol was assessed by homogeneous direct method (autoanalyzer, ADVIA 1650), and LDL cholesterol was calculated using the Friedewald formula.

Genotyping of the *FTO* polymorphism

Detection of the *FTO* SNP 7204609 was carried out using a validated assay (Assay ID C_29711844_10; Applied Biosystems, Foster City, CA). SNP genotyping was performed using an allelic discrimination assay (TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems CA, USA) using the ABI PRISM 7000 Real-Time PCR System and genotypes were read using automated software (SDS 1.1, Applied Biosystems, CA, USA). Reactions were run in 10 μ L volumes using an amplification protocol of 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, then 60°C for 1.5 minutes.

Statistical Analysis

Unpaired Student's *t*- test, Mann-Whitney *U*- test, and χ^2 test were used as appropriate. Because of the low numbers of CC homozygotes, the genotype was analyzed with the use dominant-allele model, with the C allele being dominant. A χ^2 test was also used to evaluate the Hardy-Weinberg equilibrium to assess the frequency distribution of the genotypes. Multiple logistic regression analysis was used to calculate the odds ratio (OR) and their respective 95% CIs for the presence of obesity related outcomes in the presence of the C allele of rs7204609 (C/T) of the *FTO* gene, adjusted for gender, duration of diabetes and, systolic blood pressure. A multiple linear regression model was used to analyze factors independently associated with waist circumference and AER_{log}. Results were expressed as means (SD), median (P25-P75), or number of patients with the characteristic (%). P values <0.05 were considered as

statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 software (SPSS, Chicago, IL).

Results

A total of 236 Brazilian patients with type 2 diabetes, 46.6% males, 60.0 ± 10.3 years old, and with 12.7 ± 8.2 years of diabetes duration was studied. Phenotypical characteristics of patients according to the rs7204609 (C/T) polymorphism of the *FTO* gene are shown in Table 1. No deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was observed ($\chi^2 = 4.208$; $P = 0.917$) concerning genotype distribution. The allele frequencies were 85.2% for the T allele and 14.8% for the C allele. Patients with C/T and CC genotypes were combined and compared with the TT homozygotes.

No significant differences in age, gender and duration of diabetes were observed between groups. The proportion of white ethnicity, ischemic heart disease, current smoking, alcohol intake, physical activity, and level of education also did not differ between the two groups. Regarding metabolic indices, fasting plasma glucose, HbA_{1C}, insulin, HOMA-IR, and total and LDL cholesterol were also no in both genotypes groups. Carriers of the C allele (CC and CT genotypes) had higher AER [18.4 (2.8-180.4) vs. 5.3 (0.0-180.5) $\mu\text{g}/\text{min}$; $P = 0.046$] than in non-carriers. Moreover, this genetic group also present a high proportion of patients with microalbuminuria (48.6 vs. 29.6%; $P = 0.027$).

Important differences in patients who had the C allele concerning indicators of adiposity were found. Thus, carriers of the C allele showed higher weight (83.8 ± 14.5 vs. 74.3 ± 13.0 kg; $P < 0.0001$), BMI (31.1 ± 3.6 vs. 28.2 ± 4.1 kg/m²; $P < 0.0001$), and waist circumference (105.0 ± 9.8 vs. 98.3 ± 10.4 cm; $P = 0.002$) when compared with non-carriers. Furthermore, patients carrying the C allele evidenced a lower HDL cholesterol (47.0 ± 8.9 vs. 51.4 ± 12.5 mg/dl; $P = 0.048$) and higher serum triglycerides

concentrations [165.0 (67-421) vs. 131.0 (40-455) mg/dl; $P = 0.047$]. A higher frequency of MetS was observed in carriers of the C allele (94.3% vs. 76.6%, $P = 0.017$) as compared to TT homozygotes.

When males and females were separately analyzed, there were differences in some components of the MetS according to genotypes of the *FTO* gene (Figure 1). Male carriers of the C allele had a higher waist circumference (109.4 ± 8.4 vs. 99.4 ± 9.8 cm; $P < 0.0001$) and triglycerides serum values [192 (67-421) vs. 130 (40-398); $P = 0.042$] than non-carriers males. Females with the C-allele presented lower HDL concentrations (47.3 ± 9.6 vs. 54.2 ± 12.3 mg/dl; $P = 0.034$) and a tendency for a higher systolic blood pressure (145.3 ± 28.7 vs. 136.3 ± 18.1 mmHg; $P = 0.061$) as compared to non-carriers.

Multiple logistic regression models were constructed to evaluate the association of CC and CT genotypes with different obesity related outcomes in patients with type 2 diabetes (Figure 2). All models were adjusted for gender, duration of diabetes and systolic blood pressure. In the first model, it was demonstrated that carriers of C allele had an increase chance for the presence of MetS (OR = 5.46; 95%CI 1.25-23.9; $P = 0.024$). When each individual component of MetS was analyzed, as expected due to adoption of the IDF criteria for MetS, the presence of C allele was associated with central obesity (waist circumference ≥ 94 cm for men, ≥ 80 cm for women) (OR = 8.04; 1.08-66.4; $P = 0.041$). However, no association was demonstrated with blood pressure levels $\geq 130/85$ mmHg (OR = 2.12; 95% CI 0.61-7.36; $P = 0.233$), triglycerides ≥ 150 mg/dl (OR = 1.57; 95%CI 0.75-3.32; $P = 0.229$), or decreased HDL values (OR = 1.61; 95%CI 0.74-3.48; $P = 0.248$). As expected, the presence of C allele was associated with BMI ≥ 30 kg/m² (OR = 3.74; 95%CI 1.73-8.08; $P = 0.001$). A multiple linear regression analyses confirmed the association of C allele with waist circumference (adjusted $R^2 =$

0.103; beta coefficient = 0.178; $p = 0.005$), adjusted for gender, duration of diabetes and systolic blood pressure.

Interestingly, in a multiple logistic regression analysis (adjusted for gender, duration of diabetes and systolic blood pressure) it was observed an association of CC and CT genotypes of the rs7204609 polymorphism of the *FTO* gene with the presence of microalbuminuria (OR = 2.28; 95%CI 1.07-4.85; $P = 0.031$). This association was confirmed taking into account AER values (log transformed) in a multiple linear regression model: adjusted $R^2 = 0.044$; beta coefficient = 0.134; $P = 0.045$, adjusted for gender, duration of diabetes and systolic blood pressure.

Total daily energy and nutrient intakes in Brazilian patients with type 2 diabetes according to the *FTO* genotypes were not different in patients with different genotypes (Table 2). The validity of the weight-record technique was confirmed by comparing daily protein intake estimated from the mean value of the 3-day weighed-diet records with the protein intake estimated from 24-h urinary nitrogen output (1.17 ± 0.30 vs. 1.17 ± 0.35 g/kg weight; $P = 0.873$).

Conclusions

In the present study, a positive association of a new variant of the *FTO* gene (rs7204609) with MetS, BMI, and microalbuminuria was observed in patients with type 2 diabetes.

The results of the present study expand previous observations of the concept that variability of the *FTO* gene influences the development of obesity and MetS. We found that the only component of MetS that remained significantly associated with the rs7204609 polymorphism was central obesity, suggesting that the underlying mechanism is due to increased body fat. The susceptibility for obesity phenotype (central and general) may be attributed to an increase of energy intake, since *FTO* gene

is expressed in the hypothalamus and is regulated by fasting stated and plasma leptin values (2, 23). However, in the present study this possibility seems to be unlikely because energy and nutrient intake did not differ between genotypes. Another potential mechanism underlying the observed associations might be related to a direct function of *FTO* (23) or even to linkage disequilibrium of the tested variant with another causative change in a gene near the *FTO* locus.

An interesting observation of the current study was the increased AER values and chance for the presence of microalbuminuria in patients with the C-allele of the rs7204609 *FTO* variant. As far as we know this was not described before. This observation might be due to the higher frequency of MetS in patients with CC and CT genotypes. We have previously reported that microalbuminuria was more frequent in patients with type 2 diabetes and MetS than those without MetS (14). The positive association of microalbuminuria with C-allele reinforces the relevance of the rs7204609 polymorphism of the *FTO* gene because it is well known that in patients with type 2 diabetes the microalbuminuria is a risk factor for clinical nephropathy and cardiovascular disease (24).

When gender was considered in the analysis of possible associations, there were differences among genotypes regarding some components of the MetS. Male carriers of the C-allele (CC and CT genotypes) had a high waist circumference and serum triglycerides, and C-allele carriers females had a lower serum HDL cholesterol and a tendency to an increase systolic blood pressure. Although the present study might be underpowered for gender analyses, an important consideration concerning these results is that the gender can be an important determinant for the expression of rs7204609 *FTO* polymorphism in patients with type 2 diabetes. In fact, differences in gender association were also described in a recent report in obese children and *FTO* variant rs9939609. The

association this SNP with obesity and BMI levels was observed only in girls (25). Thus, it is probable that *FTO* gene may have an important role for gender specific development of obesity as well as for the associated phenotypes.

The SNP rs7204609 (C/T) in the *FTO* gene was only described in a recent study in Japanese population. Interestingly this polymorphism in non-diabetic Japanese subjects was negatively linked with obesity (OR = 0.77) (6). These results reinforce the importance of the ethnic origin in genetic studies.

In summary, this current research support the hypothesis that the *FTO* rs7204609 variant might contribute to the genetic susceptibility for the presence of MetS, probably due to central obesity and microalbuminuria in Brazilian patients with type 2 diabetes. However, these associations need to be confirmed by further replication studies, particularly in other ethnic populations. In addition, it appears that gender specific analysis could be required to adequately interpret data.

Acknowledgements

We thank the special line of research “*Obesidad, Nutrición y Salud*” (LE/97) of University of Navarra (Spain) and, the “*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*” (CNPq) of Brasil for financial support. TS is a recipient of scholarships from CNPq. Also, “*Parques y Pascual Catedra*” at the University of Navarra (Spain) are gratefully acknowledged.

References

- 1 Stratigopoulos G, Padilha SL, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, Zeltser LM, Chung WK, Leibel RL: Regulation of *Fto/Fm* gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1185-R1196, 2008
- 2 Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JRB, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Patch AN, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo YB, Jarvelin MR, Sovio U, Bennet AJ: A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316: 889-894, 2007
- 3 Cha SW, Choi SM, Kim KS, Park BL, Kim JR, Kim JY, Shin HD. Replication of genetic effects of *FTO* polymorphisms on BMI in a Korean population. *Obesity* 16: 2187-2189, 2008
- 4 Do R, Bailey SD, Desbiens K, Belisle A, Montpetit A, Bouchard C, Pérusse L, Vohl MC, Engert JC: Genetic variations of *FTO* influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes* 57: 1147-1150, 2008
- 5 Wing MR, Ziegler J, Langefeld CD, Ng MCY, Haffner SM, Norris JM, Goodarzi MO, Bowden DW: Analysis of *FTO* gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. *Hum Genet* 125: 615-626, 2009.
- 6 Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Masuzaki H, Yoneda M, Nakajima A, Miyazaki S, Tokunaga K, Kawamoto M: Variations in the *FTO* gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet* 53: 546-553, 2008

- 7 Hertel JK, Johansson S, Raeder H, Midthjell K, Lyssenko V, Groop L, Molven A, Njolstad PR: Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1638 unselected patients with type 2 diabetes and 1858 control participants from a Norwegian population-based cohort (the HUNT study). *Diabetologia* 51: 971-977, 2008
- 8 Yajnik CS, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Freathy RM, Prakash S, Mani KR, Weedon MN, Kale SD, Deshpande J, Krishnaven GV, Veena SR, Fall CHD, McCarthy MI, Frayling TM, Hattersley AT, Chandak GR: *FTO* gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in South Asian Indians. *Diabetologia* 52: 247-252, 2009
- 9 Hennig BJ, Fulford AJ, Sirugo J, Rayco-Solon P, Hattersley AT, Frayling TM, Prentice AM: *FTO* gene variation and measure of body mass in an African population. *BMC* 10: 21, 2009
- 10 Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, Nilsson P, Groop L: Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 359: 2220-2232, 2008
- 11 Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JRB, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ: Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316: 1336-1341, 2007
- 12 Sjögren M, Lyssenko V, Jonsson A, Berglund G, Nilsson P, Groop L, Orho-Melander M: The search for putative unifying genetic factors for components of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 51: 2242-2251, 2008
- 13 Al-Attar S, Pollex RL, Ban MR, Kue-Young T, Bjerregaard P, Anand SS, Yusuf S, Zinman B, Harris SB, Hanley AJG, Connelly PW, Huff MW, Hegele RA: Association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-caucasian multi-ethnic sample. *Cardiovasc Diabetol* 7: 1-6, 2008

- 14 Costa LA, Canani LH, Lisboa HRK, Tres GS, Gross JL: Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in type 2 diabetes. *Diab Med* 21: 252–255, 2004
- 15 Tuomilehto L, Lindstron J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Sirkka Aunola S, Cepaitis Z, Moltchanov V, Hakumaki M, Mannelin M, Martikkala V, Sundval J, Uusitupa M: For the Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344: 1343-1350, 2001
- 16 Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T : Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 28:164-176, 2005
- 17 Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J: Metabolic Syndrome- A new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23: 469-480, 2006
- 18 Moulin CC, Tiskievicz F, Zelmanovitz T, de Oliveira J, Azevedo MJ, Gross JL: Use of weighed diet records in the evaluation of diets with different protein contents in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 67: 853-857, 1998
- 19 USDA SR 13 Research Quality Nutrient Data: The Agricultural Research Service: Composition of Foods, Agricultural Handbook n° 8 Washington DC, US Department of Agriculture, 1998.
- 20 Camargo JL, Lara GM, Wendland AE, Gross JL, Azevedo MJ: Agreement of different immunoassays for urinary albumin measurement. *Clin Chem* 54: 925-927, 2008

- 21 Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new predictor equation Modification of Diet in Renal Disease Group. *Ann Intern Med* 130: 461-470, 1999
- 22 Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M: Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23: 57-63, 2000
- 23 Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GSH, McDonough, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Ma M, Jovanovic P, Farooqi IS: The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318: 1469-1472, 2007
- 24 Mongensen CE: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 310: 356-360, 1984
- 25 Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V, Klovins J, Gyllensten U, Marcus C, Schiöth HB, Fredriksson R: Major gender difference in association of FTO gene among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Commun* 368: 476-482, 2008

Table 1- Clinical and laboratory characteristics of Brazilian patients with type 2 diabetes according to FTO rs7204609 (C/T) genotypes

	TT	CT/CC	P
n	201	35	-
Age (years)	60.3 ± 9.8	58.4 ± 13.0	0.324
Gender (male)	91 (45.3%)	19 (54.3%)	0.324
Ethnicity (white)	173 (86.1%)	31 (88.6%)	0.572
Duration of diabetes (years)	12.8 ± 8.1	12.1 ± 8.6	0.629
Metabolic Syndrome – IDF* (yes)	154 (76.6%)	33 (94.3%)	0.017
Ischemic heart disease (yes)	26 (13.0%)	6 (17.1%)	0.510
Microalbuminuria (yes)	58 (29.6%)	17 (48.6%)	0.027
Diabetic retinopathy (yes)	59 (29.3%)	10 (28.6%)	0.744
Blood pressure level ≥130/85 (mmHg)	167 (83.1%)	32 (91.4%)	0.210
Systolic blood pressure (mmHg)	137.7 ± 19.8	143.8 ± 23.8	0.108
Diastolic blood pressure (mmHg)	80.9 ± 10.7	83.2 ± 14.5	0.238
Hypertension treatment (yes)	142 (70.6%)	28 (80.0%)	0.255
Diabetes treatment (D/OA/I or I + OA) †	5.5/57.7/36.8	2.9/68.6/28.6	0.433
Current smoking (yes)	25 (12.4%)	2 (5.7%)	0.163
Current alcohol intake (yes)	68 (33.8%)	15 (42.9%)	0.086
Frequency of exercise (level 1)	110 (54.7%)	23 (65.7%)	0.591
Education ≤8 years (%)	36 (18.1%)	7 (20.6%)	0.078
Weight (kg)	74.3 ± 13.0	83.8 ± 14.5	<0.0001
Height (cm)	160.8 ± 18.4	159.8 ± 16.9	0.516
BMI (kg/m ²) ‡	28.2 ± 4.1	31.1 ± 3.6	<0.0001
BMI ≥30 kg/m ² (%) ‡	64 (31.8%)	21 (60.0%)	0.001
Waist circumference (cm)	98.3 ± 10.4	105.0 ± 9.8	0.002
Fasting plasma glucose (mg/dl)	144.8 ± 51.4	151.8 ± 54.8	0.548
HbA _{1C} (%)	7.0 (4.1-13.0)	7.1 (5.2-10.2)	0.990

AER ($\mu\text{g}/\text{min}$) §	5.3 (0.0-180.5)	18.4 (2.8-180.4)	0.046
Serum creatinine (mg/dl)	0.8 (0.3-1.30)	0.9 (0.5-1.30)	0.073
eGFR (ml/min per 1.73 m ²)	87.0 (47.0-150.0)	82.0 (42.0-147.0)	0.392
Insulin ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	12.1 (0.5-32.9)	12.5 (4.9-31.4)	0.793
HOMA-IR ¶	3.7 (0.17-8.2)	3.5 (1.1-12.4)	0.818
Total cholesterol (mg/dl)	206.6 \pm 39.8	200.7 \pm 42.7	0.425
HDL cholesterol (mg/dl)	51.4 \pm 12.5	47.0 \pm 8.9	0.048
LDL cholesterol (mg/dl)	125.9 \pm 35.6	122.5 \pm 37.9	0.614
Triglycerides (mg/dl)	131 (40-455)	165 (67-421)	0.047

*IDF: International Diabetes Federation; †D: diet only; ‡OA: oral antidiabetic agents; †

I: insulin; ‡BMI: body mass index; §AER: albumin excretion rate; ||eGFR: estimated glomerular filtration rate; ¶HOMA-IR: homeostasis model of assessment of insulin resistance. Data are expressed as mean \pm SD, median (P25-P75), or number of patients with the characteristic (%).

Table 2 - Daily intake of nutrients of Brazilian patients with type 2 DM according to *FTO* rs7204609 (C/T) genotypes

	TT	CT/CC	P
n	201	35	-
Total energy intake (Kcal/day)	1849.2 ± 482.1	1853.9 ± 577.0	0.958
Total energy intake (Kcal/kg weight)	22.4 ± 6.4	23.2 ± 6.4	0.190
Carbohydrate intake (% total E) *	46.3 ± 7.8	45.8 ± 9.9	0.795
Protein intake (% total E) *	19.2 ± 3.5	18.8 ± 5.7	0.582
Fat intake (% total E)*	32.4 ± 7.0	33.8 ± 7.3	0.537
Saturated fatty acid (% total E) *	9.7 ± 2.6	9.2 ± 2.3	0.250
Monounsaturated fatty acid (% total E) *	11.4 ± 2.7	12.2 ± 2.9	0.167
Polyunsaturated fatty acid (% total E) *	9.3 ± 3.2	10.3 ± 4.1	0.152
Trans fatty acid (% total E) *	1.2 ± 0.7	1.1 ± 0.5	0.449
P/S fatty acid ratio †	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.5	0.200
Cholesterol (mg/day)	217.7 ± 108.7	200.9 ± 113.8	0.403
Total fiber (g/ day)	17.5 ± 6.9	15.3 ± 7.4	0.091

*E: energy; †P/S: Polyunsaturated/Saturated. Data are expressed as mean ± SD

TT CT/CC

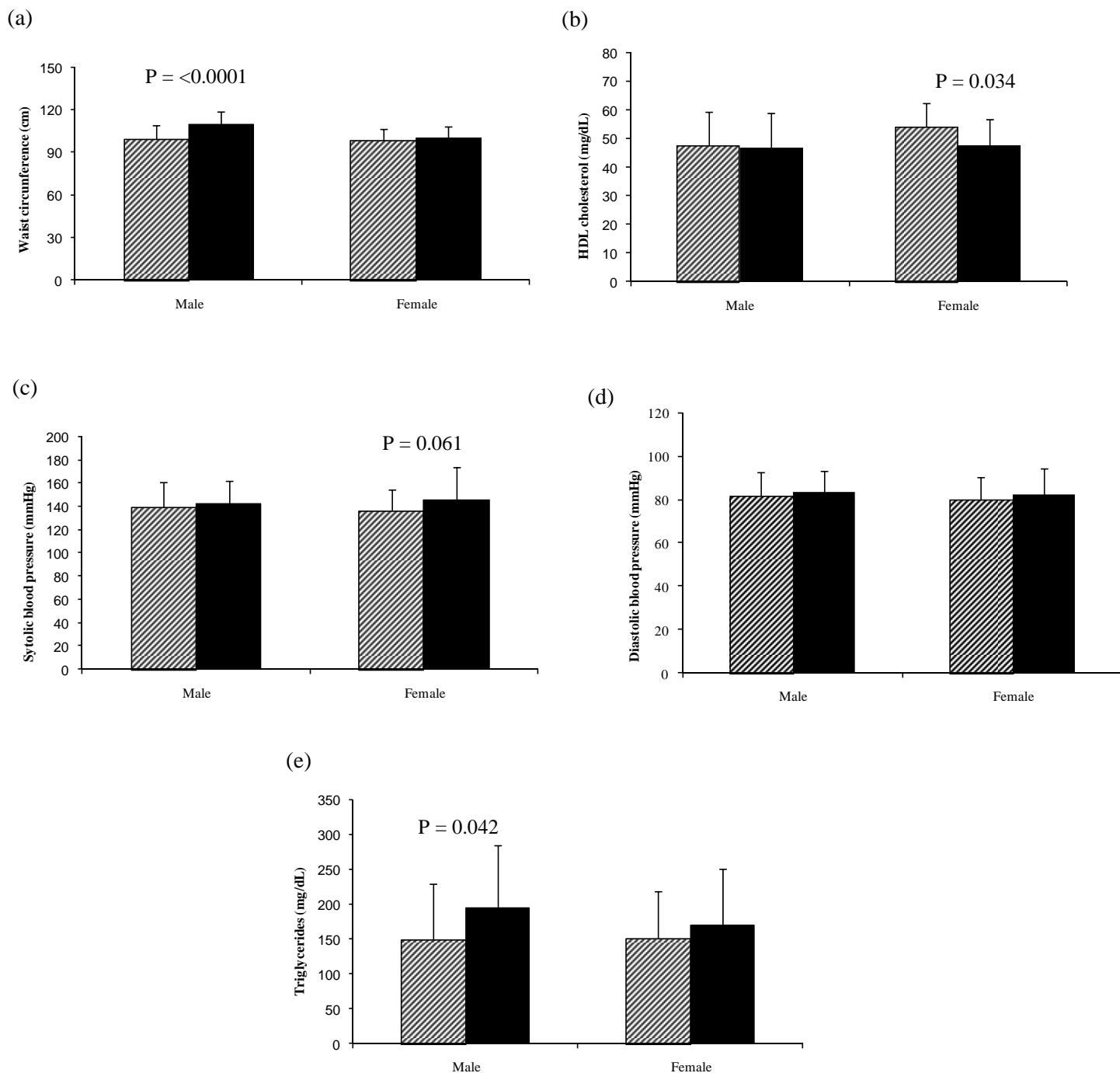


Figure 1 -Components of the Metabolic Syndrome in Brazilian patients with type 2 diabetes carriers and non-carriers of the C allele of rs7204609 (C/T) in the FTO gene according to gender.

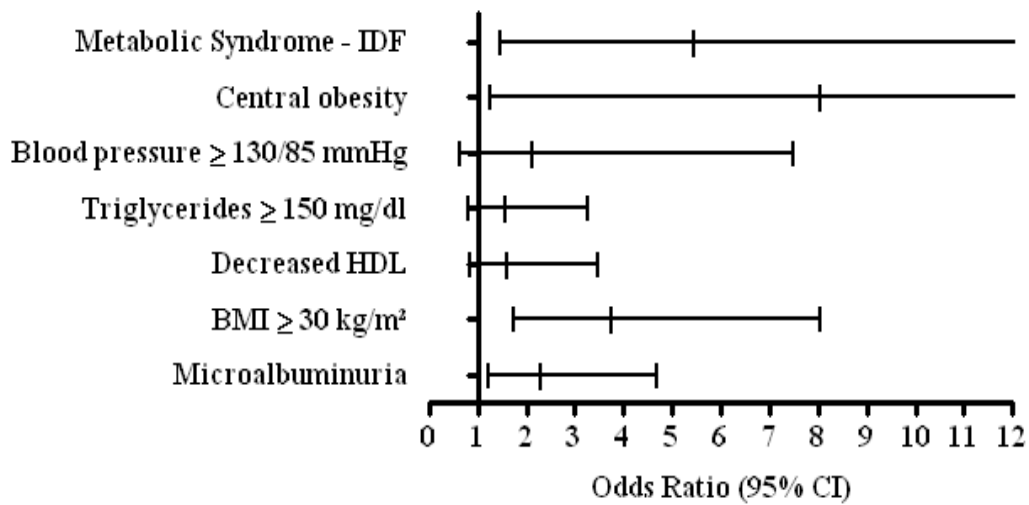


Figure 2 - Odds ratios for the presence of Metabolic Syndrome, its components, obesity ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) and, microalbuminuria in patients with type 2 diabetes carriers of C allele (CC and CT genotypes) of the rs7204609 (C/T) polymorphism of the FTO gene. All models were adjusted for gender, duration of diabetes, and systolic blood pressure. Central obesity: waist circumference $\geq 94 \text{ cm}$ for men and $\geq 80 \text{ cm}$ for women. Decreased HDL: $< 40 \text{ mg/dl}$ for men and $< 50 \text{ mg/dl}$ for women.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conceito de interação gene-nutriente descreve a modulação dos efeitos dos componentes dietéticos em um determinado fenótipo associado a um polimorfismo genético. A nutrigenética estuda o efeito da variação genética na interação entre dieta e doença, sendo uma de suas principais contribuições gerar recomendações de dieta ou de componentes dietéticos de acordo com as características genéticas do indivíduo. De uma maneira geral, estas características genéticas são representadas por polimorfismos. Evidências atuais sugerem a interação de nutrientes com polimorfismos genéticos relacionados à obesidade, ao DM tipo 2 e/ou condições associadas. O consumo de diferentes tipos de gordura, de carboidratos e de fibras identificam os principais nutrientes implicados nesta interação. Também intervenções dietoterápicas específicas como dietas as hipocalóricas têm diferentes resultados dependendo do *background* genético do indivíduo.

Nesta tese foi demonstrada uma associação positiva entre a presença do alelo A do polimorfismo rs9939609 (A/T) do gene do *FTO* e o consumo de gordura total e saturada em pacientes com DM tipo 2. O mecanismo relacionado a esta associação não foi objeto do presente estudo, embora uma alteração da saciedade possa ter um importante papel na presença deste polimorfismo e deva ser avaliada no futuro. Neste mesmo grupo de pacientes com DM tipo 2 observou-se uma associação positiva de outro polimorfismo do gene do *FTO* [rs7204609 (C/T)] com a microalbuminúria e com a SM. Estes achados são particularmente importantes neste grupo de pacientes, uma vez que a microalbuminúria é mais freqüente em pacientes com DM tipo 2 portadores de

SM, além de ser um fator de risco para a nefropatia diabética e doenças cardiovasculares.

Os dados apresentados sugerem um importante papel do gene do *FTO* em pacientes com DM tipo 2 tanto no que diz respeito a possibilidade de avaliação de intervenções dietoterápicas específicas quanto a identificação de pacientes em risco para complicações crônicas. Estes achados deverão ser confirmados em outras populações e o acompanhamento em longo prazo destes e de outros pacientes, além da realização de ensaios clínicos randomizados com intervenção de dieta, poderá tornar estas informações úteis para a prática clínica, bem como levar a novas hipóteses relacionadas à patogênese das complicações do DM.

S814i Steemburgo, Thais

Interação gene e nutriente em pacientes com diabetes melito tipo 2 : aspectos relacionados às complicações crônicas do diabetes, síndrome metabólica e efeitos dos polimorfismos rs9939609 (A/T) e rs7204609 (C/T) do gene do *FTO* / Thais Steemburgo ; orient. Mirela Jobim de Azevedo ; co-orient. J. Alfredo Martínez. – 2009.

103 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabolismo e Nutrição. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Diabetes mellitus tipo 2 2. Polimorfismo genético 3. Nutrigenômica 4. Dieta 5. Dietoterapia 6. Predisposição genética para doença I. Azevedo, Mirela Jobim de II. Martinez, J. Alfredo III. Título.

NLM: WK 810