

CLÁUDIA CRUZ LUNARDI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES
CANDIDATOS *FTO*, *TRHR* E *ACVR1b* COM A COMPOSIÇÃO
CORPORAL E FORÇA MUSCULAR EM IDOSAS
BRASILEIRAS**

BRASÍLIA, 2013

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIENCIAS DA SAUDE
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS DA SAUDE**

CLÁUDIA CRUZ LUNARDI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES
CANDIDATOS *FTO*, *TRHR* E *ACVR1b* COM A COMPOSIÇÃO
CORPORAL E FORÇA MUSCULAR EM IDOSAS
BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Jacó de Oliveira

**BRASÍLIA
2013**

CLÁUDIA CRUZ LUNARDI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES
CANDIDATOS *FTO*, *TRHR* E *ACVR1b* COM A COMPOSIÇÃO
CORPORAL E FORÇA MUSCULAR EM IDOSAS
BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 12 de abril de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ricardo Jacó de Oliveira (presidente)

Universidade de Brasília

Dr. Ricardo Moreno Lima (examinador interno)

Universidade de Brasília

Dr. Otávio de Toledo Nóbrega (examinador interno)

Universidade de Brasília

Dr. Martim Francisco Bottaro Marques (examinador interno)

Universidade de Brasília

Dr. Rinaldo Wellerson Pereira (examinador interno)

Universidade Católica de Brasília

Dr. Rômulo Maia Carlos Fonseca (suplente)

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho e meus planos atuais aos meus filhos (a,as,o).
Hoje, eles existem apenas em sonhos e pensamentos, mas já são essenciais em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa se encerra!!!

Se tive coragem e interesse em iniciar essa fase e me manter focada e entusiasmada ao longos destes anos (colégio, universidade, especialização, mestrado e doutorado) devo agradecer ao incentivo e exemplo de pessoas incríveis que conheci, convivi e admirei, em minha vida. Agradeço a Martha Wypczynski Martins, Jean-Pierre Chagas Ávila, Ítalo Minello, João Augusto Reis de Moura, Daniela Lopes dos Santos e Ivana Miotti. Hoje amigos... meus grandes professores (quase pais e mães), que influenciaram meu caráter e meus sonhos. Estou onde estou, pois vocês sempre acreditaram em mim. Simplesmente, muitíssimo obrigada!

A concretização do sonho de cursar o doutorado só foi possível uma vez que o Prof. Ricardo Jacó me possibilitou encarar essa etapa simultaneamente a meu trabalho. Confiou em mim, mesmo sem me conhecer. Espero ter correspondido a suas expectativas. Muito obrigada pela oportunidade e pelas orientações.

Prof. Ricardo Moreno, que abdicou de momentos de lazer para me orientar após meu horário de trabalho. Um grande professor e amigo. Obrigada pela paciência em me orientar e auxiliar durante essa fase.

Ana Bárbara Moura Siqueira: se consegui concluir o doutorado, agradeço imensamente a você. Aluna e pesquisadora dedicada, que me ensinou muito. Foi fundamental e incrível nas análises laboratoriais no início do doutorado. Um "muitíssimo obrigada" é pouco em vista da sua atenção e dedicação comigo!

Gostaria de agradecer aos "pequenos grandes" seres que me mantiveram empenhada em continuar meus desafios diariamente e que me impulsionaram a sair da cama e enfrentar mais um dia de trabalho (cansaço...): meus maravilhosos pacientes. Minhas crianças e adolescentes que sempre me mostram um lado mágico da vida, até então desconhecido; que me proporcionam rompantes de alegrias nos dias mais nebulosos. Enfim, que sempre me motivaram a ser a pessoa extrovertida que sou. Meus queridos, não pensem que eu ensino vocês, saibam que vocês tem me proporcionado diariamente as maiores e mais valiosas lições de vida. Após conhecer vocês, mudei completamente minha forma de ser, ver, sentir... viver. Sinto que tenho um novo caráter, uma nova proposta de vida, que é baseada na alegria diária e no poder de proporcionar um sorriso a quem quer que seja. Vocês são os maiores exemplos deste mundo. Obrigada por me permitirem estar entre vocês.

Ao lembrar dos meus pacientes, tenho de fazer um “link” com meus colegas de trabalho. Citar nomes seria complicado, pois poderia acabar me esquecendo de alguém e parecendo injusta. Tentarei citar pelo menos os amigos que trabalham mais perto de mim, como Bruno Brenha, Guilherme Henrique, Elisa Dornelas, Patricia Guanais, Adriana Diniz, Geraldo Gurgel, Juliane Machado, Rafaela Neves, Flavia Cristina, Aline Areias e Alessandra Coutinho. Sem vocês eu nunca teria terminado o doutorado, primeiramente pela capacidade de organização do setor para me auxiliar nos momentos em que tive de me ausentar, e também por cederem seus ouvidos para minhas várias lamúrias. E a Kellen Carvalho? E a Quezia Cardoso? E a Ana Claudia Raposo? E a Vicenildes Cardozo? Janaina Siqueira? Bem, essas são as minhas amigas que sempre me incentivaram e torceram muito por mim. Sei que sempre estarão comigo! Adoro vocês demais!

Ainda faltou um. Um grande colega e principalmente, um super amigo: Rodrigo Rodrigues. Acho que foi uma das últimas amizades que fiz no hospital. Tornou-se uma amizade tão incrível, tão afinada que me proporcionou vários ensinamentos. Sem dúvida alguma o ser humano de maior desenvolvimento e grandeza espiritual que já conheci. Aprendi tanto a cada conversa no caminho para a academia, nas corridas, e até mesmo nadando no lago Paranoá. A paciência do Rodrigo para comigo é incrível. Acho que você Rodrigo, não é um ser deste mundo, é alguém que veio para abrir minha mente de uma forma anteriormente inconcebível por mim. Se sou um ser um pouquinho melhor, devo isso a você. Conte eternamente comigo!

E a família? Para estar onde estou, para chegar onde cheguei, meus pais e irmãos muitas vezes renunciaram a confortos e prazeres de nossa família, por mim. Embora não estejam presentes diariamente em minha rotina, devo meus eternos agradecimentos a Matias, Mateus e Francisco Lunardi. Como representante da família toda, agradeço a Maria de Lourdes Cruz Lunardi. Você não é apenas mãe, é uma grande amiga, companheira e super avó (do Joaquim e demais netos caninos e felinos...). Por nós (família) ela fará o possível e o impossível. Mãe que abdica da sua vida para acompanhar a filha em um momento difícil, conturbado. Uma mãe que faz tudo, mas simplesmente tudo por um(a) filha(o)? Essa mãe eu tenho! Juro que tento não abusar, mas às vezes é difícil. Um dia, espero ser a metade do que minha mãe é. E eu hei de conseguir! Obrigada mãe, por estar sempre conosco independente da situação.

Não é necessário estar presente para ser família, nem mesmo carregar o mesmo sobrenome. Família é amar incondicionalmente, torcer, incentivar, confiar....e sempre encontrei isso na minha segunda família: Figueiredo Camargo. Quando fiquei sozinha, tive sogros que telefonaram aos finais de semana para saber como eu estava e me acalmar nos dias de tristeza e desespero. Sinto-me imensamente querida pelos Figueiredo Camargo. Sei o quanto torcem por mim. Vocês são mais que especiais!

Tenho ainda uma terceira família! Alcides Gonçalves, Yuri Gonçalves e Luciana Scheid. São mais que amigos. São entes familiares que amo demais! Sempre pude contar com o apoio, carinho e atenção de vocês. Sempre estiveram e sei que sempre estarão comigo, independente da localização geográfica. Obrigada por serem meus familiares Brasileiros!

Iniciarei agora uma sessão de agradecimentos um tanto diferentes, talvez bizarros para alguns, mas para mim fundamental. Gostaria de agradecer imensamente ao Playstation 3, que proporcionou momentos de entretenimento para meu marido, enquanto eu realizava as análises laboratoriais das amostras, em horários anteriormente dedicados a ele. Tenho plena convicção que este equipamento eletrônico foi o melhor investimento que meu marido fez nos últimos anos.

Outro agradecimento diferente refere-se aos meus animais de estimação: Peca, Madona, Bigu e Bina. Foram meus companheiros inseparáveis nos momentos de desespero e desamparo enquanto estava sozinha em Brasília. Até a chegada de minha mãe, era deles que eu recebia carinho e atenção. Era para eles que eu pedia consolo e recebia o amor, fosse por meio de pulos, de arranhões ou de mordidas. Saber que eles estavam em casa, a me esperar, me tranquilizava e alegrava imensamente.

Saindo agora dos agradecimentos “estranhos” prosseguirei com os agradecimentos conjugais. Pensar em nós dois (Cláudia+Hamilton) é pensar em obstáculos e mais obstáculos. Felizmente estes obstáculos foram superados, um a um, por dois sentimentos incríveis, fortes e verdadeiros: amor e respeito. Estarmos juntos é uma vitória. Meu Kbc, para os outros Hamilton Figueiredo Camargo, você é um exemplo de paciência e dedicação familiar. Aprendi a abdicar do “eu” pelo “nós” e felizmente, não consigo mais viver sem você. Você foi quem mais me motivou a encarar o doutorado, mesmo sabendo que seria uma loucura, trabalhando 40 horas semanais, treinando para uma meia maratona, mantendo uma casa e cursando um

doutorado em uma área 100% desconhecida. Sem você eu não conseguiria nunca. Mesmo distante (no Haiti), você me ajudou e incentivou. Teve paciência para me respeitar nos momentos em que eu não pude conversar, via Skype ou telefone, porque estava estudando; por não poder ver você com maior frequência durante este período tão atípico e complicado, por estar estudando e, pela demanda de carga horária (sempre trabalhando). Você foi e é um grande homem, um grande ser humano e grande militar. Conseguiu se manter tão distante das pessoas que mais ama e mesmo assim conseguir amparar a sua esposa. Só posso dizer que você é sem duvida alguma o meu "KBC"!

Enfim, gostaria de dizer a todos que espero um dia poder ser capaz de retribuir todo o apoio que vocês sempre me oferecerem!

"Muitas vezes, priorizamos os títulos acadêmicos e nos esquecemos de que nada valem se não educarmos os nossos sentimentos"
(Autor desconhecido)

RESUMO

Introdução: Estudos de associação genética (GWAS) sugerem uma importante contribuição dos genes candidatos *FTO*, *TRHR* e *ACVR1b* na composição corporal e na força muscular, em diferentes populações e em variadas faixas etárias.

Objetivos: Replicar os GWAS, visando examinar a associação entre os polimorfismos dos genes candidatos *FTO*, *TRHR* e *ACVR1b* com a composição corporal e a força muscular, em mulheres idosas.

Métodos: Após a aplicação dos critérios de exclusão, 241 voluntárias (idade $66,7 \pm 5,5$ anos) foram submetidas à avaliação da composição corporal, por meio da Absortometria por Raios-X de Dupla Energia e pico de torque (PT) dos extensores do joelho, utilizando o dinamômetro isocinético (Biodex System 3). A genotipagem foi conduzida em toda a amostra, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese. Os marcadores de ancestralidade foram genotipados seguindo procedimentos padronizados.

Resultados: A distribuição dos genótipos se apresentou de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, para todos os polimorfismos. Os polimorfismos (rs9939609 e rs1861868) do *FTO* não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os grupos no fenótipo relacionado (composição corporal). Em relação aos polimorfismos do gene *TRHR*, não foram observadas diferenças significativas para rs7832552. Verificou-se diferença significativa entre os genótipos para rs16892496, nas variáveis Massa Livre de Gordura (MLGA) e a MLGA relativa ($p=0,04$ e $p=0,05$, respectivamente). Indivíduos carreadores dos genótipos A/A e A/C, respectivamente, apresentaram, em média, 1kg e 900g de MLGA extra, quando comparado aos carreadores do genótipo C/C. O genótipo C/C apresentou maior chance de apresentar valores inferiores para força muscular. Os polimorfismos do gene *ACVR1b* (rs2854644, rs10783485 e rs10783485) não diferiram estatisticamente entre os genótipos, nos fenótipos musculares. No entanto, o rs2854644 e rs10783485 apresentaram diferença significativa entre os genótipos, na variável “prevalência de excesso de peso” ($p=0,03$ e $p=0,04$, respectivamente). Os genótipos do rs10783485 também diferiram estatisticamente no percentual de gordura ($p=0,04$).

Conclusões: O gene *FTO* não apresentou associação ao fenótipo de obesidade nesta amostra de idosas, no entanto, o gene *ACVR1b* apresentou tendência de associação a esse fenótipo. As observações do presente estudo

fornecem mais evidências de que o polimorfismo rs16892496 do gene TRHR apresenta um papel importante na variação da massa livre de gordura.

Palavras-Chave: *FTO*; *TRHR*; *ACVR1b*; composição corporal; obesidade; sarcopenia; gene; associação genética; pico de torque; força muscular.

ABSTRACT

Introduction: Genome-Wide Association Studies (GWAS) suggest an important contribution of *FTO*, *TRHR* and *ACVR1b* candidate genes in body composition and muscle strength in different populations and wide age groups. **Objectives:** To replicate the GWAS aiming to examine the association between polymorphisms in *FTO*, *TRHR* and *ACVR1b* candidate genes with body composition and muscle strength in older women. **Methods:** After exclusion criteria was applied, 241 volunteers (age 66.7 ± 5.5 years) were underwent body composition assessment by dual energy X-ray absorptiometry and torque peak (PT) of the knee extensors using the isokinetic dynamometer (Biodex System 3). Genotypes were conducted, throughout the whole sample, by polymerase chain reaction and electrophoresis. The ancestry informative markers were genotyped following standard procedures. **Results:** The genotypes distribution worked as expected in Hardy-Weinberg equilibrium for all polymorphisms. No significant statistical differences were observed for *FTO* polymorphisms (rs9939609 and rs1861868) in the related phenotype (body composition). Regarding *TRHR* gene polymorphisms, no significant differences were observed for rs7832552. Significant difference was found between genotypes for rs16892496 in variables Fat Free Mass (FFM) and FFM relative ($p=0,04$ and $p=0,05$, respectively). Carrying individuals of A/A and A/C genotypes, respectively, presented on average 1kg and 900g extra FFM, in comparison to carriers of C/C genotype. The C/C genotype group showed significantly higher chance to present lower values for muscle strength. No significant difference was observed for *ACVR1b* gene polymorphisms (rs2854644, rs10783485 and rs10783485) for muscle phenotypes. However, rs2854644 and rs10783485 showed significant differences between genotypes in the “overweight prevalence” variable ($p=0,03$ and $p=0,04$, respectively). The rs10783485 genotypes also differed significantly in body fat percentage ($p=0,04$). **Conclusions:** The *FTO* gene was not associated to the obesity phenotype in this older women sample, however, the *ACVR1b* gene tended to associate with this phenotype. The observations in the present study provide further evidences that the rs16892496 polymorphism in the *TRHR* gene play major role in FFM variation

Key Words: *FTO*; *TRHR*; *ACVR1b*; body composition; obesity; sarcopenia; gene; genetic association; torque peak; strength.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pag.

Figura 01 - Prevalência estimada de excesso de peso (IMC \geq 25km/m ²) na população mundial (masculina, idade superior a 15 anos) no ano de 2002.....	23
Figura 02 - Prevalência estimada de excesso de peso (IMC \geq 25km/m ²) na população mundial (masculina, idade superior a 15 anos) no ano de 2005.....	23
Figura 03 - Prevalência estimada de excesso de peso (IMC \geq 25km/m ²) na população mundial (masculina, idade superior a 15 anos) no ano de 2010.....	24
Figura 04 - Localização do gene <i>FTO</i> : braço longo do cromossomo 16, posição 12.2.....	25
Figura 05 - Sarcopenia. Corte de ressonância magnética da coxa de um adulto de 21 anos, fisicamente ativo (acima) e idoso de 63 anos, sedentário (abaixo). A massa muscular (cinza) está diminuída no idoso; a gordura (branco) subcutânea e intramuscular está aumentada.	31
Figura 06 - Localização do gene <i>TRHR</i> . Braço longo de cromossomo 8, posição 23.....	34
Figura 07 - Localização do gene <i>ACVR1b</i> . Braço longo de cromossomo 12, posição 13.....	35
Figura 08 - Gel decorrente de teste dos Primers utilizados na pesquisa.....	42
Figura 09 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. (A) Modelo de gel resultante de uma PCR e (B) de um teste de otimização dos primers.	44

LISTA DE TABELAS

Pag.

Tabela 01 - Estudos de GWAS com gene candidato <i>FTO</i> e polimorfismos.....	28
Tabela 02 - Características das participantes. Os valores são expressos como média \pm Desvio Padrão.	46
Tabela 03 - Composição corporal e fenótipos musculares de acordo com o SNP rs9939609 do gene <i>FTO</i> . Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual.....	48
Tabela 04 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs1861868 do gene <i>FTO</i> . Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual.....	49
Tabela 05 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs16892496 do gene <i>TRHR</i> . Dados são apresentados em média \pm erro padrão (ajustados também para idade).....	51
Tabela 06 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs7832552 do gene <i>TRHR</i> . Dados são apresentados em média \pm erro padrão.....	52
Tabela 07 - Razão de chance entre fenótipo e genótipo (ajustada para idade e ancestralidade Africana).....	53
Tabela 08 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs2854464 do gene <i>ACVR1b</i> . Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual.....	55
Tabela 09 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs10783485 do gene <i>ACVR1b</i> . Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual.	56
Tabela 10 - Composição corporal e fenótipos musculares de acordo com o SNP rs10783486 do gene <i>ACVR1b</i> . Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACVR1b = Activin receptor type-1B

ANCOVA = Análise de Covariância

ANOVA = Análise de Variância

DXA = Absortometria por Raios-X de Dupla Energia (do inglês, *Dual-energy X-ray*

absorptiometry)

FTO = Fat mass and obesity associated gene

GWAS = Genome-Wide Association Study

IMC = Índice de Massa Corporal

IPAQ = Questionário Internacional de Atividade Física (do inglês, *International Physical Activity Questionnaire*)

MLG = Massa Livre de Gordura

MLGA = Massa Livre de Gordura Apendicular

MLGT = Massa Livre de Gordura Total

OR = Odds Ration

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PT = Pico de Torque

SNP = Single Nucleotid Polymorphism

TRHR = Thyrotropin-releasing hormone receptor

SUMARIO

	Pag.
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Estudos de associação genética (GWAS).....	21
3.2 Obesidade.....	22
3.3 <i>FTO</i> e a obesidade.....	25
3.4 Massa livre de gordura e força muscular	31
3.5 <i>TRHR</i> , <i>ACVR1b</i> , sarcopenia e força muscular	33
4 MÉTODOS.....	36
4.1 Sujeitos	36
4.2 Caracterização dos níveis de atividade física das participantes	36
4.3 Avaliação da Composição Corporal	37
4.4 Pico de torque isocinético muscular	39
4.5 Análise do DNA.....	40
4.6 Estatística.....	45
5 RESULTADOS	46
5.1 <i>FTO</i>	47
5.2 <i>TRHR</i>	50
5.3 <i>ACVR1b</i>	53
6 DISCUSSÃO.....	58
6.1 Prevalência de sarcopenia e excesso de peso	58
6.2 <i>FTO</i>	58
6.3 <i>TRHR</i>	61
6.4 <i>ACVR1b</i>	63

6.5	Considerações finais	64
7	CONCLUSÃO	65
8	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO A - Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa	80
	ANEXO B - Carta de aceite do artigo	81
	ANEXO C - Artigo aceito para publicação na revista Journal of the American Aging Association.....	82
	ANEXO D - Artigo submetido à revista Arquivos Brasileiro de Metabologia e Endocrinologia	89

1 INTRODUÇÃO

Os estudos de associação genética (GWAS – Genome-Wide Association Study) demonstram a influencia dos fatores genéticos na determinação de quais indivíduos na população são mais propensos a desenvolver obesidade (1, 2), osteoporose (3, 4) e a sofrer redução da massa e da força muscular (5-8). Os GWAS são utilizados com o objetivo de identificar loci gênicos que contenham alelos de susceptibilidade a doenças ou que estejam envolvidos com outras características fenotípicas de interesse (9).

Nos últimos anos, os estudos de associação genética testaram milhares de single-nucleotid polymorphism (SNPs) em centenas de indivíduos e identificaram diversas associações de variações genéticas comuns, reproduzíveis em mais de 80 doenças e traços (<http://www.genome.gov/26525384>). Esses estudos têm progredido de ensaios com menos de 100.000 SNPs para mais de 1.000.000 e os tamanhos das amostras aumentaram dramaticamente assim como a intensificação pela busca por variantes que explicam mais a hereditariedade da doença/característica (10). Atualmente, há necessidade de a) realização de estudos experimentais de maior confiabilidade, b) urgência de identificação de preditores genéticos para o exercício físico e c) aproveitamento de oportunidades oferecidas pelos recentes avanços na área do entendimento da arquitetura global do genoma humano (11).

O gene *Fat mass and obesity associated gene (FTO)* está fortemente associado a traços de obesidade em populações de diferentes etnias e idades (12-20). Dentre os polimorfismos do gene *FTO*, o rs9939609 é estudado com maior frequência, pois apresenta maior sucesso na taxa de genotipagem (100%) e possibilita associações com menores chances de erro (12). Este SNP apresenta associação ao Índice de Massa Corporal (IMC) e à circunferência da cintura (21) e é constituído por dois alelos, A e T. Segundo Frayling et al. (12) o alelo A está diretamente relacionado a um maior acúmulo de gordura corporal, principalmente, quando se apresenta na forma homozigota (A/A). Os indivíduos homozigotos A/A apresentam uma probabilidade aproximadamente 1,2 vezes maior de apresentar sobrepeso (IMC $\geq 25\text{kg/m}^2$) ou 1,3 vezes maior de apresentar obesidade (IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$).

m²) quando comparados a indivíduos homocigotos T/T (12). As pesquisas mais recentes continuam apontando a associação do sobrepeso/obesidade com adiposidade corporal, em indivíduos portadores dos alelos de risco para esse fenótipo (11).

Em relação à sarcopenia, atualmente é relatado na literatura que o componente genético contribui de maneira significativa para a variabilidade de massa e força muscular (5), e para o decréscimo de força decorrente do envelhecimento (22). A massa livre de gordura é determinada geneticamente e pode representar de 52% a 84% da massa corporal de um indivíduo (6, 7). Liu et al. (23) estudou a associação do gene Thyrotropin-releasing hormone receptor (*TRHR*) com a massa livre de gordura (MLG) em 1.000 indivíduos. Os autores relataram que os polimorfismos rs16892496 (G/G) e rs7832552 (T/T) no gene *TRHR* estão associados à MLG e replicaram esses achados em três amostras independentes. Segundo os autores, os sujeitos que apresentaram esses genótipos apresentam em média, 2,70kg e 2,55 kg menos de MLG, respectivamente, quando comparados com aqueles com os demais genótipos. Atualmente, apenas Windelinckx et al. (24) relataram resultados relacionando o gene *ACVR1b* (Activin receptor type-1B) com a força muscular. Os autores verificaram que indivíduos homocigotos (A/A) para o SNP rs2854644 apresentaram valores de força muscular cerca de 2% superior aos portadores do alelo G.

Os conhecimentos sobre Genética e Biologia (molecular e evolutiva) do envelhecimento, aliados aos fatores ambientais, tais como nutrição, estilo de vida e características biopsicossociais, são o caminho para se começar a desvendar a rede de complexidade biológica que envolve os processo de saúde, doença, envelhecimento e longevidade humana (25). A associação genética e os desfechos que acompanham o envelhecimento (sarcopenia e obesidade) devem ser mais explorados na literatura nacional e internacional (11). Dessa forma, a realização deste trabalho é importante e embasa-se na necessidade de replicar estudos de associação com polimorfismos de massa gorda, magra e força muscular de idosos, uma vez que os resultados de estudos em outras etnias (13, 26-28) divergem dos GWAS. A realização do trabalho justifica-se também pela lacuna na literatura, referente a estudos semelhantes, em uma amostra brasileira, em especial, de idosos.

Nesse sentido, essa pesquisa replicou estudos de associação dos polimorfismos dos genes *FTO*, *TRHR* e *ACVR1b* com relação aos fenótipos massa gorda, massa livre de gordura e força muscular no envelhecimento. Pretende-se assim auxiliar num melhor entendimento dos fenótipos, possibilitando o direcionamento das práticas preventivas mais adequadas para cada indivíduo, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças e distúrbios, como a obesidade e a sarcopenia, associados à morbidade e a mortalidade. Possibilitar-se-á, assim, a realização de intervenções antecipadas, de forma mais precisa e adequada, com o intuito de minimizar ou até mesmo retardar os efeitos deletérios do envelhecimento, bem como melhorar a qualidade de vida de idosos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Replicar os estudos de GWAS dos polimorfismos dos genes candidatos *FTO*, *TRHR* e *ACVR1b* com os fenótipos massa gorda, massa livre de gordura e força muscular em idosas brasileiras.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a associação entre os polimorfismos do gene *FTO* (rs1861868 e rs9939609) com sobrepeso, obesidade e MLG.
- Verificar a associação entre os polimorfismos do gene *TRHR* (rs16892496 e rs7832552) com sobrepeso, obesidade, MLG e força muscular.
- Verificar a associação entre os polimorfismos do gene *ACVR1b* (rs2854464, rs10783485 e rs10783486) com sobrepeso, obesidade, MLG e força muscular.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estudos de associação genética (GWAS)

As diferenças de susceptibilidade a doenças, nos seres vivos, são influenciadas por fatores genéticos, e a compreensão dessas variações genéticas permitirá uma melhor prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças (19, 29). Estudos de associação genética são utilizados com o objetivo de identificar loci gênicos que contenham alelos de susceptibilidade a doenças ou que estejam envolvidos com outras características fenotípicas de interesse. Tais estudos baseiam-se na identificação de alelos ou genótipos num determinado locus candidato, cujas frequências difiram significativamente entre indivíduos afetados por um desfecho de interesse (casos) e indivíduos não afetados (controles). Uma premissa básica desse tipo de desenho de estudo é que as diferenças de frequências alélicas ou genotípicas observadas entre casos e controles sejam devidas exclusivamente ao status de doença dos mesmos, e não à influência de outras variáveis de confundimento, a exemplo da estrutura genética populacional (9).

Com a conclusão do Projeto Genoma Humano, em 2003 (30) e do International HapMap, em 2007 (31), os pesquisadores puderam, de forma rápida e precisa, mapear as variações genéticas e determinar como essas variações podem contribuir para doenças comuns como asma, doença cardíaca, doenças psiquiátricas, diabetes e obesidade. Ao se comparar os genomas de dois grandes grupos de pessoas (> 1000) a SNPs específicos para um estado de doença, pode ser feita uma estimativa estatística em relação ao risco de se desenvolver a doença e o polimorfismo associado. A localização desses SNPs serve então como um ponteiro para a região do genoma humano, onde residem os genes que provocam tal doença. Até a presente data, 1536 GWAS e 8761 SNPs mostraram associação com algum fenótipo (www.genome.gov). Informações valiosas sobre a genética da doença têm sido realizadas, mantendo-se o desafio de fazer uma associação biológica clara desses genes candidatos com a doença em questão (32).

Muitos genes contêm variações nas sequências, no genoma humano. Em geral, a forma mais comum da sequência é chamada de “alelo tipo selvagem” e a

sequência menos comum é chamada de “alelo raro”. A variação genômica das sequências pode ter duas formas: mutação e polimorfismo, quando a frequência de ocorrência é inferior ou superior a 1%, respectivamente (33). Uma vez que os genes candidatos foram validados, os dados resultantes desses estudos podem fornecer novas oportunidades para avanços clínicos que irão beneficiar as pessoas com condições de doença, tais como a identificação de novos alvos terapêuticos ou biomarcadores de prognóstico da doença e sua progressão. Contudo, o advento dos estudos de associação genética tornou possível os avanços no conhecimento sobre genoma humano e, junto com a sofisticação tecnológica e computacional, tem facilitado a identificação de novas potenciais genéticas no mundo da homeostase energética (32).

3.2 Obesidade

O sobrepeso e a obesidade (excesso de peso) são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode ser prejudicial à saúde (34) e ocorre quando, a longo prazo, o consumo de energia excede o dispêndio de energia (35). O excesso de peso associa-se, com frequência, a condições tais como dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos, distúrbios do aparelho locomotor, alguns tipos de câncer (36), doenças cardiovasculares, dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e diabetes (37-39). Os sujeitos com IMC superior a 25 e 30 kg/m² são classificados como sobrepeso e obeso, respectivamente (37).

A Organização Mundial da Saúde (40) projetou que, em 2005, o mundo teria 1,6 bilhões de pessoas, acima de 15 anos de idade, com excesso de peso (IMC \geq 25 kg/m²) e 400 milhões de obesos (IMC \geq 30 kg/m²). A mais recente publicação da Organização Mundial da Saúde (41) verificou que, no ano de 2008, a prevalência de obesidade na população mundial acima de 20 anos era de, aproximadamente, 502 milhões de indivíduos. A projeção para 2015 é ainda mais pessimista: 2,3 bilhões de pessoas com excesso de peso e 700 milhões de obesos, indicando um aumento de 75% nos casos de obesidade em 10 anos (42). Países desenvolvidos como EUA (43, 44), Grã-Bretanha (45), China (46) e Austrália (47, 48) têm apresentado aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade no decorrer das décadas. Estudos com a população brasileira apontam achados similares (49-51) nessa

tendência mundial de aumento do excesso de peso na população. Nas figuras 01, 02 e 03 é possível observar a distribuição mundial da prevalência do excesso de peso, nos anos de 2002, 2005 e 2010, respectivamente (42).

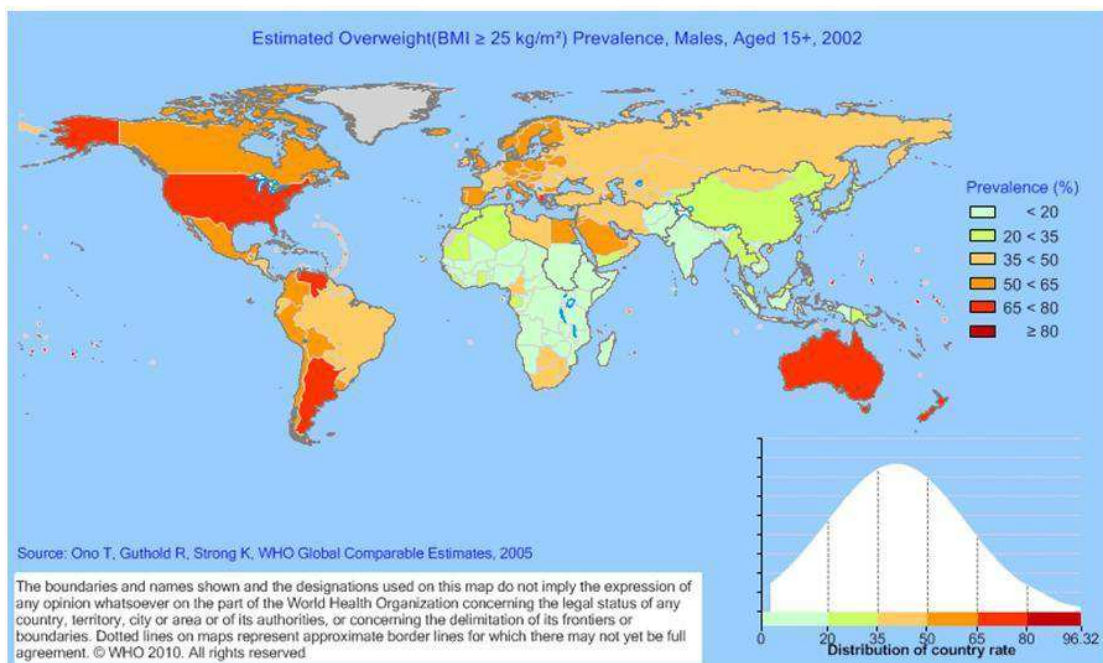


Figura 01 - Prevalência estimada de excesso de peso (IMC \geq 25km/m²) na população mundial (masculina, idade superior a 15 anos) no ano de 2002. Fonte: <https://apps.who.int/infobase/>

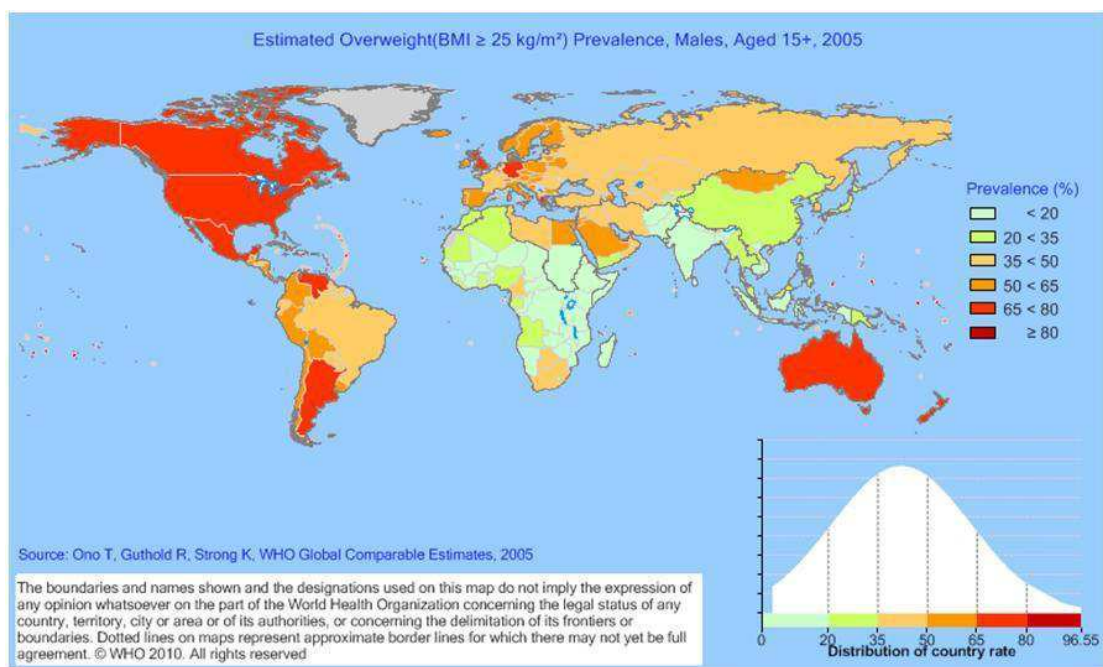


Figura 02 - Prevalência estimada de excesso de peso (IMC \geq 25km/m²) na população mundial (masculina, idade superior a 15 anos) no ano de 2005. Fonte: <https://apps.who.int/infobase/>

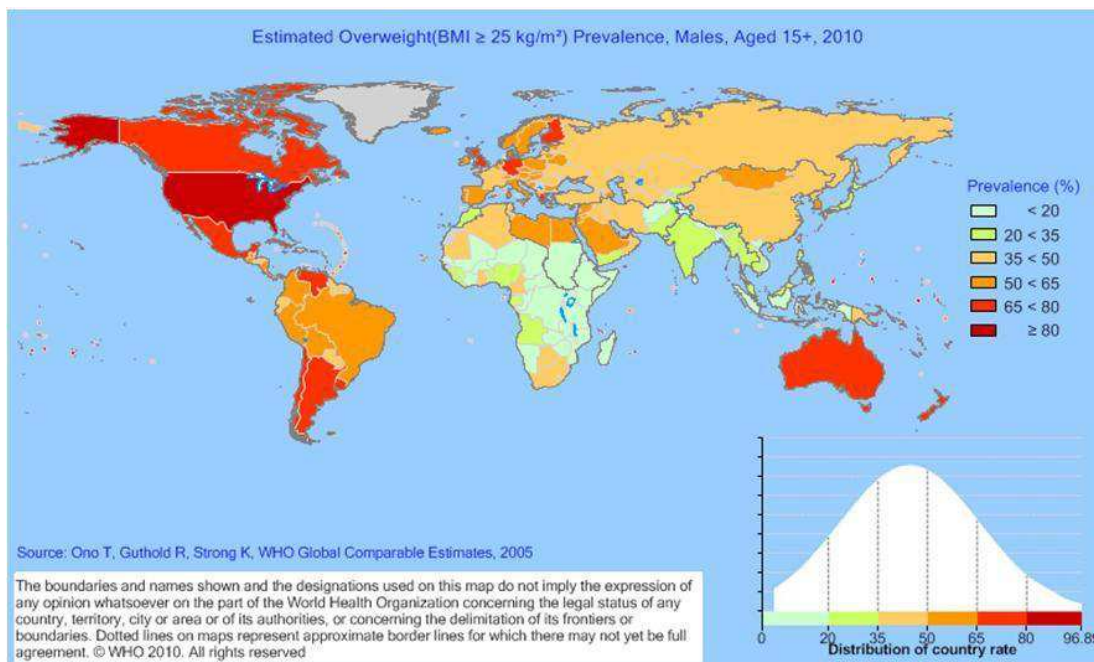


Figura 03 - Prevalência estimada de excesso de peso (IMC ≥ 25 kg/m²) na população mundial (masculina, idade superior a 15 anos) no ano de 2010. Fonte: <https://apps.who.int/infobase/>

Os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada em 2008-2009 no Brasil, apontaram para uma prevalência do excesso de peso (IMC ≥ 25 kg/m²) de 50,1% e 48% para homens e mulheres, respectivamente. As prevalências de excesso de peso e de obesidade aumentaram continuamente ao longo dos anos, nos dois sexos. Ao se comparar os dados de 1974-1975 e 2008-2009, a prevalência do excesso de peso em adultos aumentou em quase três vezes no sexo masculino (de 18,5% para 50,1%), e em quase duas vezes no sexo feminino (de 28,7% para 48,0%). No mesmo período, a prevalência de obesidade aumentou em mais de quatro vezes para homens (de 2,8% para 12,4%), e em mais de duas vezes para mulheres (de 8,0% para 16,9%) (52). Em ambos os sexos, a frequência dessa condição tende a aumentar com a idade. O aumento é maior entre as faixas etárias 18-24 e 35-44 anos, para os homens, e entre as faixas etárias 18-24 e 45-54 anos, para as mulheres, quando a frequência do excesso de peso é quase duplicada (53).

3.3 *FTO* e a obesidade

A obesidade é causada por uma complexa interação entre genes e ambiente (54), e o estudo dessa interação é importante para determinar quais indivíduos são mais propensos a desenvolver obesidade em resposta a um determinado meio/ambiente (1, 2, 12). O conhecimento sobre os processos biológicos que sustentam os fatores herdados se expandiu rapidamente, impulsionado por uma poderosa sinergia entre estudos genéticos com murinos e com humanos. Em particular, a análise de genes candidatos, em cortes de seres humanos com obesidade severa, rendeu conhecimentos fundamentais para determinantes moleculares da obesidade humana (55).

O gene *FTO* (localizado na região 16q12.2) foi descoberto em camundongos e recebeu o nome de FT (do inglês: *fused toes*), devido a terem os dedos unidos. Essa mutação ocorre por uma série de deleções nos nucleotídeos do gene FT, que está no cromossomo 8 dos camundongos, o qual é sintonico ao cromossomo 16 dos seres humanos (56). Posteriormente, este gene (Figura 04) foi clonado e descobriu-se o seu grande tamanho, por isso, foi apelidado de Fatso (gordinho) e abreviado para Fto (57). Somente com a descoberta da relação desse gene com o acúmulo excessivo de gordura corporal é que a Human Genome Organization (Gene Nomenclature Committee) mudou o nome do gene de Fto para Fat Mass and Obesity associated (*FTO*), porém mantendo a sigla *FTO* (58).

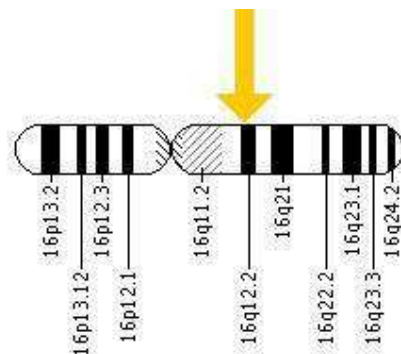


Figura 04 - Localização do gene *FTO*: braço longo do cromossomo 16, posição 12.2. Disponível em <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicimages/chromomap/ACVR1B.jpeg>. Acesso em 14jul2012.

A partir de então, o gene *FTO* foi identificado como um gene que contribui para a obesidade em populações de diferentes etnias e idades (12-18). Os mecanismos de ação do *FTO* na massa corporal ainda não são claros. Há estudos que mostram que o gene age no controle da homeostase energética, atuando como regulador primário do acúmulo de gordura corporal e na regulação do jejum e leptina (12, 14, 58, 59). O gene foi encontrado no tecido adiposo, pâncreas, fígado (60), musculatura esquelética estriada e cardíaca, rins e gônadas (59, 60). Outros estudos indicam que o *FTO* tem efeito especialmente na adiposidade geral corporal (61) e, em particular, na massa gorda subcutânea (62).

Constam no Catálogo de Publicações de Estudos de Associação Genética (<http://www.genome.gov/26525384>) 31 estudos de GWAS (e replicação) relacionados ao *FTO*, sendo 17 relacionados ao fenótipo da obesidade, adiposidade e IMC. Esses estudos estão apresentados na Tabela 01.

O SNP rs9939609 do gene *FTO* é estudado com maior frequência, pois apresenta maior sucesso na taxa de genotipagem (100%) e possibilita associações com menores chances de erro (12). Este SNP é constituído por dois alelos (A e T) e possui uma associação significativa ao IMC ($p=0,01$), massa corporal ($p=0,03$) e circunferência da cintura ($p=0,04$) (21). Segundo Frayling et al. (12) e Gerken et al. (59) o alelo A está diretamente relacionado a um maior acúmulo de gordura corporal, principalmente quando se apresenta na forma homozigota (A/A). Indivíduos homozigotos A/A apresentam uma probabilidade cerca de 1,2 vezes maior de apresentar sobrepeso ($IMC \geq 25\text{kg/m}^2$) ou 1,3 vezes maior de apresentar obesidade ($IMC \geq 30\text{kg/m}^2$), quando comparados a indivíduos homozigotos T/T(12).

Lappalainen et al. (63) examinaram a associação do SNP rs9939609 com a massa corporal, IMC e a mudanças, a longo prazo, na massa corporal após intervenção (atividade física). O estudo foi realizado com 522 sujeitos que apresentavam intolerância a glicose (idade 40-65 anos, $IMC \geq 25\text{kg/m}^2$). Os autores verificaram que os sujeitos homozigotos (A/A) apresentaram valores de IMC mais elevados e uma maior circunferência da cintura que os indivíduos que continham o alelo T. Verificaram que durante os quatro anos de intervenção com atividades físicas (os autores não especificaram o tipo de atividade física), os indivíduos A/A mantiveram sempre valores de IMC superiores aos demais. Dessa forma, os autores concluíram que: a) o SNP rs9939609 associa-se ao IMC, tanto em análise transversal quanto após um programa de intervenção no estilo de vida; b) a

magnitude da redução do peso foi maior no grupo que realizou atividade física, mas o alelo de risco (A) não influenciou nas mudanças de peso corporal em nenhum dos grupos, ou seja, não foi observada associação entre o SNP e a magnitude da variação do peso corporal alcançada pela intervenção e c) é improvável que o SNP rs9939609 interfira na redução do peso corporal por meio de uma mudança no estilo de vida.

Tabela 01 - Estudos de GWAS com gene candidato *FTO* e polimorfismos

Autor	Fenótipo	Amostra inicial do estudo	Amostra de replicação	SNP e alelo de risco
Yang et al. (64)	Índice de massa corporal	133.154 europeus	59.325 europeus	rs7202116 - G
Fox et al. (65)	Tecido adiposo subcutâneo	5.560 mulheres europeias e 4.997 homens europeus	Não reportado	rs9922619 – T rs1421084 - A
Kristiansson et al. (66)	Síndrome metabólica	2.637 europeus com síndrome metabólica, 7.927 europeus no grupo controle	Não reportado	rs9940128-A
Okada et al. (67)	Índice de massa corporal	26.620 japoneses	7.910 japoneses 27.715 asiáticos	rs12149832-A
Kilpelainen et al. (68)	Adiposidade	29.069 europeus, 7.557 indianos	39.576 europeus	rs8050136-C
Wang et al. (69)	Obesidade	520 caucasianos não-hispânicos obesos, 540 casos-controle	1.196 caucasianos não-hispânicos	rs17817449-?
Dorajoo et al. (70)	Obesidade	5.429 chineses, 2.431 malaianos, 2.531 indianos	Não reportado	rs1558902-T
Speliotes et al. (71)	Índice de massa corporal	123.865 europeus	125.931 europeus	rs1558902-A
Scherag et al. (72)	Obesidade (extrema)	1.138 crianças francesas e alemãs, com obesidade extrema 1.120 crianças francesas e alemãs, com estado nutricional ideal ou abaixo do peso	1.892 crianças e adolescentes europeus, com obesidade ou sobrepeso 3.763 europeus com estado nutricional normal ou abaixo do peso no grupo controle 715 famílias com obesidade	rs1558902-A
Cotsapas et al. (73)	Obesidade (extrema)	775 caucasianos com obesidade extrema , 3,197 caucasianos controle	Não reportado	rs9941340-T
Meyre et al. (74)	Obesidade	695 adultos obesos, 685 crianças obesas, 731 adultos magros, 685 crianças magras	1.171 adultos obesos, 896 crianças obesas, 1.114 adultos magros, 1.297 crianças magras, 4.417 adultos, 5.291 crianças	rs1421085-C

Continua**Tabela01** - Estudos de GWAS com gene candidato *FTO* e polimorfismos

Autor	Fenótipo	Amostra inicial do estudo	Amostra de replicação	SNP e alelo de risco
Thorleifsson et al. (28)	Índice de massa corporal	80.969 indivíduos	11.036 indivíduos	rs8050136-A rs6499640-A
Willer et al. (75)	Índice de massa corporal	32.387 indivíduos	59.092 indivíduos	rs9939609-A
Loos et al. (16)	Índice de massa corporal	16.876 indivíduos	60.352 indivíduos	rs1121980-?
Hinney et al. (15)	Obesidade (extrema)	487 casos jovens 442 controles	2.269 indivíduos em 644 famílias	rs1121980-T
Scuteri et al. (13)	Traços relacionados a obesidade	4.471 indivíduos	3.025 indivíduos	rs9930506-A
Frayling et al. (12)	Índice de massa corporal	10.657 adultos	19.424 adultos 10.172 crianças	rs9939609-A

Adaptado de <http://www.genome.gov/26525384> (acesso em 13 de março de 2013)

Hotta et al. (76) investigaram a relação entre o *FTO* e obesidade em Japoneses (idade média 48,7 anos). Para tal, os autores compararam sujeitos obesos (IMC > 25kg/m²) e indivíduos com massa corporal normal (IMC < 25kg/m²). O estudo revelou que 15 SNPs, incluindo rs9939609 e rs1121980, demonstraram associação com obesidade. Estes achados corroboram um estudo realizado com caucasianos (13). Dentre os SNPs, o rs1558902 foi o que apresentou associação mais significativa com a obesidade. No entanto, este SNP não apresentou associação a outros fenótipos associados à obesidade, tais como níveis de glicose plasmática, hemoglobina A1c, colesterol total, colesterol de baixa densidade (HDL-c), triglicerídeos e pressão arterial.

Ho et al. (77) investigaram os efeitos do alelo de risco, associado à obesidade, na estrutura cerebral de idosos (idade média 76,1 anos). Os autores identificaram dois SNP associados à obesidade: rs1421085 (alelo de risco C) e rs17817449 (alelo de risco G), e encontraram diferenças na massa branca e cinzenta (déficit ou excesso) relacionadas ao carregamento de, pelo menos, um alelo de risco. Os autores concluíram que a obesidade está associada a atrofia de estruturas cerebrais com implicações para saúde de idosos.

Em relação às diferenças na variação do IMC entre os sexos, os estudos apontam que mulheres homozigotas A/A (rs9939609) apresentaram maior propensão a sobrepeso do que homens homozigotos. Esses achados realçam a possibilidade do sexo influenciar nos efeitos do *FTO* sobre a massa corporal (63, 78).

O polimorfismo rs1861868 tem sido estudado em pesquisas atuais, apontando associações similares ao rs9939609. Ao realizar busca pelo polimorfismo na base de dados da Livraria Nacional de Medicina e Instituto Nacional de Saúde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), há citação de apenas 3 artigos: Rampersaud et al. (79) estudaram uma amostra com idade adulta e apontaram o alelo A do SNP rs1861868 como um fator de risco para índice de massa corporal (IMC) elevado. No entanto, Rodriguez-López et al. (80) verificaram que o alelo G é um fator de risco para obesidade mórbida. Albuquerque et al. (81) avaliaram a associação de polimorfismos do *FTO*, entre eles o rs1861868 com fenótipo de obesidade em crianças portuguesas. Na amostra em questão, não houve associação significativa (p=0,08) entre polimorfismo e fenótipo. Verifica-se assim, uma lacuna na literatura

referente à relação do polimorfismo rs1861868 e alelo de risco para fenótipos de adiposidade corporal.

Embora os estudos nessa área apontem que indivíduos carreadores de polimorfismos do gene *FTO* apresentem maior probabilidade de desenvolver sobrepeso e obesidade (12, 13, 63, 76), é de grande valia para os profissionais da área da saúde compreender que o *FTO* não se associa ao nível de atividade física (63, 82) e que o aumento do risco de desenvolvimento da obesidade, devido a suscetibilidade genética do *FTO*, pode ser evitado por meio da atividade física e mudanças no estilo de vida (11, 63, 79).

3.4 Massa livre de gordura e força muscular

A perda substancial de massa muscular esquelética (Figura 05) é descrita como sarcopenia e relaciona-se a importantes mudanças na composição corporal e funções relacionadas (83-85).

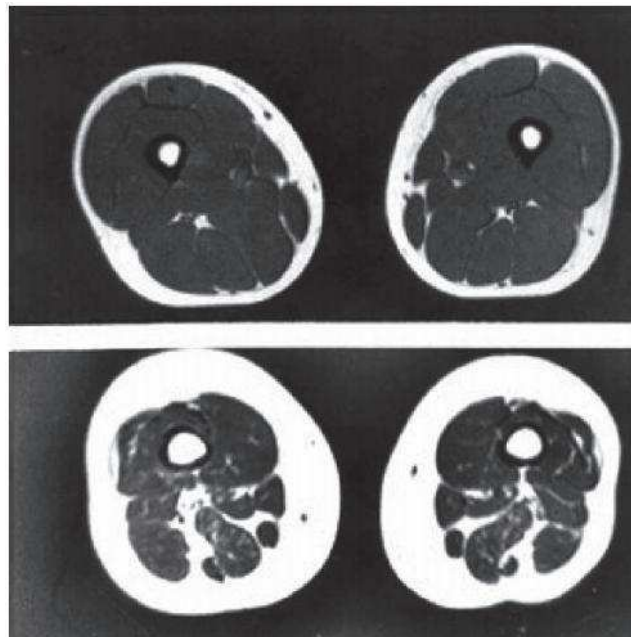


Figura 05 - Sarcopenia. Corte de ressonância magnética da coxa de um adulto de 21 anos, fisicamente ativo (acima) e idoso de 63 anos, sedentário (abaixo). A massa muscular (cinza) está diminuída no idoso; a gordura (branco) subcutânea e intramuscular está aumentada. Adaptada de Roubenoff et al., 2000.

O termo sarcopenia (em grego, sark = carne ; penia = perda) foi pioneiramente utilizado por Irwin H. Rosenberg, para se referir à perda de massa muscular, relacionada à idade e associada à perda de função muscular (força, potência e resistência) (86, 87). O termo não se refere a casos de perda muscular em função de processos inflamatórios, perda de peso, ou doenças em estágios avançados (85). O déficit muscular pode ser relacionado a uma contração muscular inadequada, seja em função de alterações nas proteínas actina e miosina ou por um estresse oxidativo nas células.

Em geral, indivíduos saudáveis começam a ter diminuição da massa muscular a partir dos 45 anos, sendo essa queda posterior ao pico de desempenho muscular nos primeiros anos da vida adulta (88, 89). Durante a senescência, ocorre diminuição da força muscular em uma taxa que varia de 20 a 40% na população entre 70-80 anos e maior que 50% em idosos nonagenários.

A primeira definição da sarcopenia foi desenvolvida por Baumgartner et al. (90) e foi sugerida através da divisão entre a massa esquelética apendicular do indivíduo e sua altura ao quadrado. Esse método é atualmente o mais utilizado para definição da sarcopenia, porém o fato de esta fórmula considerar a massa gorda do indivíduo o torna simplista. Foi observado que, através desse cálculo, indivíduos magros poderiam ser considerados erroneamente como sarcopênicos, enquanto que obesos poderiam ter a sarcopenia mascarada (89).

A sarcopenia está associada à perda de autonomia (90), risco aumentado de quedas (91), complicações metabólicas (92), redução da densidade mineral óssea (93), declínio da capacidade aeróbia (93, 94), diminuição da força muscular, especialmente no pico de torque dos extensores dos joelhos (95, 96), perdas na mobilidade funcional e no desempenho motor do idoso, interferindo assim nas atividades da vida diária (97-100). A redução da mobilidade tem um importante impacto, não somente na capacidade física da mulher idosa, mas também na sua capacidade para manter contato social e conseqüente bem-estar, social e mental (101).

A redução na mobilidade musculoesquelética, através de uma gama de atividades, auxiliaria, por sua vez, nos autocuidados das idosas. A investigação de estratégias para reduzir os problemas da redução musculoesquelética traria um grande número de benefícios, incluindo um aumento geral na independência e bem

estar da mulher idosa e uma significativa redução nos custos dos cuidados e tratamentos (101).

A etiologia da sarcopenia ainda não é totalmente conhecida, mas parece não depender de apenas uma variável e sim de uma influência multifatorial e da inter-relação desses fatores. Estudos epidemiológicos (102, 103) sugerem que diferentes fatores contribuem para o desenvolvimento da sarcopenia, incluindo alterações hormonais, perda de neurônios motores, nutrição inadequada, inatividade física e baixo grau de inflamação crônica. Essas alterações têm sido apresentadas até mesmo em indivíduos saudáveis fisicamente ativos, resultando em perda da massa muscular, em média 1 a 2% por ano, a partir dos 50 anos de idade (104). Sabe-se atualmente que o componente genético contribui de maneira significativa para a variabilidade de massa muscular e força (5, 105), e para o decréscimo de força decorrente do envelhecimento (22). A massa livre de gordura é determinada geneticamente e pode representar cerca de 52% a 84% da massa corporal de um indivíduo (6, 7). Fatores genéticos são responsáveis por cerca de 60 a 80% das variações individuais da massa livre de gordura (106).

O estudo da patogenia da sarcopenia e de suas comorbidades torna-se fundamental, uma vez que mulheres idosas com sarcopenia apresentam maior probabilidade de possuírem baixa densidade óssea (93) e a perda da massa muscular no envelhecimento está relacionada a uma série de doenças ou problemas de saúde, como limitação da mobilidade, osteoporose, aumento do risco de fraturas, dislipidemias, obesidade, resistência à insulina e aumento da mortalidade (23).

3.5 *TRHR*, *ACVR1b*, sarcopenia e força muscular

Estudos prévios observam uma grande variabilidade inter-individual na massa e na força muscular. Essas variações devem-se a fatores ambientais, genéticos e/ou interações ambientais e genéticas (24, 57, 105, 107). Enquanto os efeitos ambientais, como a prática de atividade física, têm sido amplamente investigada, somente recentemente se iniciaram estudos direcionados à influência da genética nos traços musculoesqueléticos. No entanto, os estudos atuais ainda não são suficientes para demonstrar claramente as bases genéticas para a sarcopenia. Até o

momento, foram identificados poucos genes que contribuíram para a variação da força e massa muscular esquelética (29).

Dentre os genes candidatos a associação com a massa livre de gordura e força muscular, estão o *TRHR* e *ACVR1b*. Ao realizarmos uma pesquisa no Catálogo de Publicações de Estudos de Associação Genética (<http://www.genome.gov/26525384>) é possível identificar apenas o estudo de Liu et al. (23) associado ao gene *TRHR*. Anteriormente, o gene estava associado ao desfecho de adenoma pituitário (Igarashi et al., 2003) e à hipertensão arterial (108-110). Não constam artigos relacionados ao *ACVR1b* no Catálogo de Publicações de Estudos de Associação Genética.

O gene *TRHR* (Figura 06) localiza-se em humanos, na região 8q24, e codifica o hormônio receptor da tireotropina. Devido à importante função desse hormônio no desenvolvimento da massa muscular esquelética, o gene *TRHR* é reconhecido como um importante gene candidato para futuras investigações, com consequências potenciais para desfechos relacionados a força e potencia muscular (111). O hormônio liberador de tireotropina (*TRH*) é um neuropeptídeo de pequeno porte (*p*-Glu-His-Pro-NH₂) amplamente distribuído em todo o sistema nervoso central e periférico, bem como nos tecidos extraneurais. O *TRH* exerce seu efeito ao ligar-se ao *TRHR* (localizado na região 8q.23.1) na superfície de células tireotróficas e pituitárias. A principal consequência dessa ligação (*TRH* e *TRHR*) é a estimulação da secreção de hormônio estimulante da tireóide (*TSH*). Como resposta, o *TSH* estimula a liberação de tiroxina, que é importante no desenvolvimento do músculo esquelético de vertebrados (112, 113).

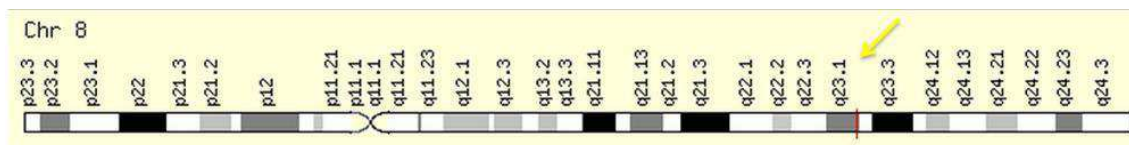


Figura 06 - Localização do gene *TRHR*. Braço longo de cromossomo 8, posição 23. Adaptado de <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRHR>. Acesso em 14jul2012.

Liu et al. (23) realizaram um estudo de associação de genomas para as variações da massa livre de gordura em 1.000 indivíduos. Os autores identificaram que os polimorfismos rs16892496 e rs7832552 do gene (*TRHR*) estão associados à massa livre de gordura (por absormetria por raios-x de dupla energia) em um estudo

com 379.319 SNPs examinados em aproximadamente 1.000 norte-americanos brancos. Os sujeitos que apresentaram esse *SNP* têm, em média, 2,70kg e 2,55 kg menos massa livre de gordura, respectivamente, quando comparados com aqueles com genótipos alternativos. Além disso, o estudo foi replicado e verificou-se as associações significativas em 3 amostras independentes. Após os estudos, os autores sugerem que o *TRHR* é um importante candidato para variações na MLG.

Estudos de ligação genética e de força muscular ainda são escassos. Atualmente, apenas Windelinck et al. (24) relataram resultados relacionando o gene *ACVR1b* (*Activin receptor type-1B*) com a força muscular. Até 2011, o gene era associado apenas a câncer de pâncreas (114) e de pulmão (115). O gene *ACVR1b* (Figura 07), localizado na região cromossômica 12q13, é membro da família de *TGF- β* (*transforming growth factor beta*) (116). O fator de transformação de crescimento beta é uma proteína que controla a proliferação e diferenciação celular, e outras funções na maioria das células. O *ACVR1b* regula a liberação de miostatina e actina e estas, por sua vez, limita o crescimento do tecido muscular (117, 118).

Windelinck et al. (24) verificaram a associação do SNP rs2854464 desse gene candidato com a força muscular do joelho. O estudo foi realizado em uma ampla faixa etária (20-90 anos) e os autores verificaram que indivíduos homozigotos AA para o SNP rs2854464 eram cerca de 2% mais fortes que os carreadores do alelo G.

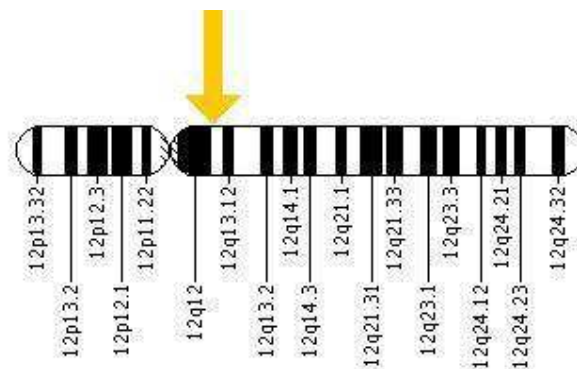


Figura 07 - Localização do gene *ACVR1b*. Braço longo de cromossomo 12, posição 13. Disponível em <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicimages/chromomap/ACVR1B.jpeg>. Acesso em 14jul2012.

4 MÉTODOS

4.1 Sujeitos

Participaram do estudo voluntárias residentes no Distrito Federal e participantes de um Projeto social desenvolvido pela Universidade Católica de Brasília denominado Geração de Ouro. As participantes foram convidadas a ingressar no presente estudo através de ligações telefônicas, nas quais era exposto um breve panorama da investigação. Foi feito contato telefônico com cerca de 500 candidatas, das quais 300 aceitaram participar. As principais causas que levaram à falta de êxito dos demais convites incluíram alteração do número telefônico, motivo de doença e falta de interesse. Após aplicação dos critérios de exclusão, um total de 246 voluntárias compuseram a amostra. Excluiu-se do estudo as participantes que: a) não possuíam nacionalidade brasileira; b) não eram capazes de caminhar de forma independente; c) possuíam prótese unilateral ou bilateral de quadril; d) possuíam prótese metálica; e) eram tabagistas; f) apresentavam desordem metabólica ou endócrina, o que sabidamente afeta o sistema muscular; g) apresentaram anormalidade de condução ou perfusão cardíaca que contra-indicasse a prática de atividades físicas.

Após a aplicação dos critérios de exclusão, o presente estudo contou com 241 idosas voluntárias. Para participar do estudo, as voluntárias assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (CEP/UCB 014/2007).

4.2 Caracterização dos níveis de atividade física das participantes

Os níveis habituais de atividade física de cada uma das participantes foi verificado através da versão longa do IPAQ (do inglês, *International Physical Activity Questionnaire*) (Anexo). O questionário foi administrado em entrevistas “face a face”, conforme recomendação de uso em países em desenvolvimento. O IPAQ foi desenvolvido como um instrumento para monitorar, de forma padronizada, a atividade e a inatividade física em diversos países do Mundo (119), tendo a Organização Mundial de Saúde provido o devido suporte. O modelo usado no

presente estudo foi a tradução oficial em português da versão curta (disponível no site www.celafiscs.com.br), previamente validada para a população brasileira (120). A avaliação leva em consideração a duração e frequência das atividades físicas realizadas em uma semana, considerando-se apenas sessões superiores a 10 minutos contínuos. Os resultados do questionário possibilitam a divisão em quatro categorias: sedentários, insuficientemente ativos, ativos e muito ativos.

4.3 Avaliação da Composição Corporal

As mensurações de composição corporal foram realizadas no laboratório de imagens da Universidade Católica de Brasília. Para realização das medidas antropométricas, as participantes estavam descalças e vestindo roupas leves. A massa corporal foi mensurada em uma balança digital calibrada (mod. 2006pp TOLEDO, Brasil, resolução de 0,1 kg). Para mensuração da estatura, utilizou-se um estadiômetro (CARDIOMED, Brasil, precisão de 0,1 cm), fixado na parede.

A composição corporal foi mensurada através da absorptometria, por raios-x de dupla energia (DXA), utilizando o equipamento da marca Lunar, modelo DPX-IQ (Lunar Corporation, Madison, WI, USA). Esse método expõe o avaliado a mínima quantidade de radiação, e os exames são realizados em um período de tempo relativamente curto (aproximadamente 25 minutos). Segundo Hansen et al. (121), o método é considerado válido para avaliar a composição corporal de mulheres idosas, podendo ser aplicado para mensurar a Massa Livre de Gordura (MLG) dessa população. Adicionalmente, Wang et al. (122) validaram mensuração de massa muscular através do DXA contra valores obtidos com a tomografia computadorizada e relataram diferença inferior a 5%.

Para o procedimento, as voluntárias se posicionaram em decúbito dorsal sobre a mesa do equipamento, sendo em seguida cuidadosamente posicionadas de forma que ficassem totalmente centralizadas em relação às laterais da mesa. As voluntárias foram instruídas a se dispor com os membros inferiores estendidos, sendo utilizada uma fita de velcro para manter os membros inferiores próximos e dar suporte aos pés de forma que ficassem numa angulação de 45° com relação ao plano vertical. Os membros superiores foram dispostos estendidos e posicionados ao longo do corpo, sem que houvesse contato com o tronco. Todas as avaliações

foram realizadas pelo mesmo técnico, o qual é treinado para a realização desses exames e possui experiência no procedimento. Após análise de toda a área corporal, o DXA possibilita a determinação da densidade mineral óssea e dos tecidos. Os tecidos são ainda fracionados em Massa de Gordura e Massa Livre de Gordura (MLG). Os apêndices (membros superiores e inferiores) foram isolados do tronco e da cabeça, utilizando linhas geradas pelo programa, as quais, em seguida, eram manualmente ajustadas, com precisão. Linhas verticais nas articulações dos ombros separaram os membros inferiores do corpo, enquanto que linhas anguladas nas articulações coxo-femorais foram utilizadas para separar os membros superiores do tronco.

Dessa forma, além do equipamento fornecer valores de MLG e massa de gordura do corpo inteiro, é possível também identificar valores de MLG e massa de gordura para as seguintes regiões corporais isoladamente: membros superiores, membros inferiores e tronco. Com base nesses resultados, é possível ainda se chegar ao valor da Massa Livre de Gordura Apendicular (MLGA), a qual é representada pelo somatório da MLG dos membros inferiores e superiores. A importância em analisar a MLGA de pessoas idosas foi previamente demonstrada (90). A MLGT e MLGA foram estudadas relativas ao quadrado da estatura (kg/m^2), de forma análoga ao IMC. Dessa forma, as seguintes variáveis foram utilizadas nas análises posteriores:

- Massa Livre de Gordura Total (MLGT): Tecido não-ósseo livre de gordura, do corpo inteiro, expresso em kg;
- Massa Livre de Gordura Total relativa (MLGT relativa): Tecido não ósseo livre de gordura de corpo inteiro dividido pela estatura ao quadrado, expresso em kg/m^2 . Trata-se de uma fórmula análoga ao IMC, que elimina diferenças na MLG total decorrentes de diferenças de estatura;
- Massa Livre de Gordura Apendicular (MLGA): Tecido não-ósseo, livre de gordura apendicular. Refere-se ao somatório da massa livre de gordura dos membros inferiores e dos membros superiores, expresso em kg;
- Massa Livre de Gordura Apendicular relativa (MLGA relativa): Tecido não-ósseo, livre de gordura apendicular, dividido pela estatura ao quadrado, expresso em kg/m^2 . Trata-se de uma fórmula análoga ao IMC, que elimina diferenças na MLGA decorrentes de diferenças de estatura.

Para uma melhor caracterização da amostra, bem como para verificar diferenças entre os genótipos, foi adotado o ponto de corte também proposto por Baumgartner et al. (90), o qual define como sarcopênicos indivíduos com MLGA relativa inferior a $5,45 \text{ kg/m}^2$. Para classificar as idosas, conforme estado nutricional (sobrepeso e obesidade), foram utilizados os critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde (37).

4.4 Pico de torque isocinético muscular

A força do quadríceps foi mensurada utilizando-se o dinamômetro isocinético Biodex System 3 (Biodex Medical Systems, New York, USA). Todas as medidas foram realizadas por um técnico treinado de acordo com as especificações. Antes do teste, as participantes foram submetidas a 5 minutos de aquecimento em cicloergômetro com baixa carga e velocidade confortável. Após explicação detalhada dos procedimentos da avaliação, as voluntárias foram cuidadosamente posicionadas no assento do equipamento. O eixo de rotação do braço do dinamômetro foi alinhado com o epicôndilo lateral do fêmur dominante das voluntárias. O local da aplicação da força foi posicionado aproximadamente 2 centímetros acima do maléolo medial. Cintos fixados com velcro foram utilizados no tronco, pelve e coxa, a fim de se evitar eventuais movimentos compensatórios. O protocolo consistiu de três séries de quatro contrações musculares ($60^\circ/\text{seg}$) com 30 segundos de intervalo entre as séries (123). O valor registrado para as análises posteriores foi o maior pico de torque (PT) das três séries, o qual foi expresso em valores absolutos (Nm) e relativos à massa corporal (Nm/kg). Foi solicitado às participantes que realizassem as contrações com o maior vigor possível e foi oferecido encorajamento verbal durante a mensuração. A calibração do equipamento foi realizada de acordo com as instruções do fabricante no início das sessões de avaliação e o mesmo avaliador conduziu os procedimentos.

4.5 Análise do DNA

A coleta de amostra sanguínea foi realizada em todas as participantes, através da veia antecubital, procedimento que foi realizado por uma enfermeira devidamente treinada. O material biológico foi colhido em tubos vacutainer estéreis, contendo anticoagulante EDTA, sendo extraído um volume de 3 a 5 ml de sangue. O DNA genômico de alto peso molecular foi extraído dos leucócitos periféricos, utilizando-se o método “salting out” (124) e a quantificação do DNA foi estimada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Para o padrão da quantificação, foi utilizado o lambda DNA em concentrações de 20, 40, 100, 200 e 400ng/μl.

Os procedimentos de extração envolveram basicamente três passos:

a) Quebra das células: com remoção das membranas lipídicas, por meio da adição de um tampão com detergente. A solução usada no procedimento foi denominada Tampão A, composta por sacarose (0.32 M), Tris-HCl (10 mM, pH 7.6), MgCl₂ (5 mM) e o detergente não iônico Triton X 100 (1 %). Após a homogeneização do sangue, um volume inicial de 750 μl foi depositado em um microtubo de 1,5 ml. Adicionou-se 750 μl do Tampão A, sendo o material centrifugado a 2.500 rpm por 20 minutos, para condensação do pellet, com descarte posterior do sobrenadante.

b) Remoção das proteínas celulares e histonas ligadas ao DNA: por meio da adição de uma protease, precipitação com sódio e procedimento de extração com fenol - o pellet foi suspenso em um composto denominado Tampão B (25mM de EDTA com pH 8.0 e 75mM de NaCl), sendo adicionados o SDS (sodium dodecyl sulfate) a 10% e proteinase K (10 mg/ml). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C durante uma hora, para ativação das enzimas. Após a incubação, foi adicionado NaCl (6 M) para precipitar o DNA, seguido de uma nova centrifugação da mistura com a finalidade de precipitar impurezas no fundo dos tubos.

c) Precipitação do DNA em álcool: transferiu-se o sobrenadante obtido no item anterior, sendo adicionado etanol absoluto, na proporção de duas vezes o volume contido no tubo. Misturou-se, por inversões cuidadosas, sendo nesse momento possível a visualização da precipitação do DNA. Foi realizada outra centrifugação com a finalidade de aderir o DNA no fundo dos microtubos, descartando-se em seguida o sobrenadante, com cuidado para não perder o pellet.

Após a evaporação completa do etanol, foram adicionados 300 µl de TE para conservação do DNA.

Os sítios polimórficos foram amplificados através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Essa técnica permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado milhares de vezes em poucas horas. A técnica implica na utilização de fragmentos de DNA fita simples (iniciadores) que delimitam a região a ser amplificada. A técnica de PCR é baseada na capacidade da enzima *Taq* polimerase de não ser inativada em temperaturas elevadas o que normalmente promove a desnaturação do DNA. O fato ocorre pois a enzima é extraída de uma bactéria denominada *Thermus Aquáticus*, que vive em altas temperaturas e tem característica termoestável, sendo de grande importância, uma vez que a reação se processa em diferentes ciclos de temperaturas. O MgCl₂ favorece o estímulo da *Taq* polimerase e os dNTPs conferem maior reprodutibilidade à reação.

Os polimorfismos relacionados à composição corporal e força muscular estão apresentados no Quadro 01, juntamente com iniciadores para extensão. Os iniciadores para PCR de uma única base para a genotipagem foram desenhados utilizando o programa de bioinformática Primo Pro 3.4 (<http://www.changbioscience.com/primo/primoml.html>) e a verificação para a existência de dímeros foi realizada no programa Autodimer. Os iniciadores foram arranjados de tal formar que a distribuição do tamanho dos fragmentos foi detectada. Adicionou-se também uma cauda poli (GACT) na extremidade 5' de cada iniciador (Quadro 01).

Os 7 SNPs selecionados foram amplificados individualmente em um termociclador da marca GeneAmp® PCR System 9700, (Applied Biosystems, Foster City, Ca, EUA). Posteriormente, após verificação de ocorrência perfeita da reação, foi aplicada a metodologia de sistema múltiplo (PCR Multiplex) (Figura 08). A PCR seguiu o seguinte protocolo: KIT Quiagen (2,5 µl); Q solution (0,5 µl); mistura de iniciadores, direto e reverso (1,0 µl) e DNA (1 µl) para completar 12,5 µl.

Quadro 01 - Genes candidatos e polimorfismos, e respectivos iniciadores para extensão.

Gene	SNP	Alelos	Iniciador
<i>FTO</i>	rs9939609	A/T	Direto: 5' – CTTGCGACTGCTGTGAATTT– 3' Reverso: 5' – GCCCAAGGATGGTGTTCCTA– 3'
	rs1861868	A/G	Direto: 5' – CGCATCTCTGCAACTCTTTT– 3' Reverso: 5' – CCCCTTGCATCAGAGTGTTT– 3'
<i>TRHR</i>	rs16892496	A/C	Direto: 5'- TGTGCATAAGGTTGAAGAGCAA- 3' Reverso: 5'- CTCCAAGGGTGAAGAAACCA- 3'
	rs7832552	A/C	Direto: 5'- AAAGCAACGCACTCCATTTT – 3' Reverso: 5'- GATGGTTTTTGTGAGGCACA 3'
<i>ACVR1b</i>	rs2854464	A/G	Direto: 5'- CTGGTGGAAAGTCTTGGGTGT– 3' Reverso: 5'- TTTCCAGGATCTGGGAGATG– 3'
	rs10783485	A/G	Direto: 5'- GTACGTGCTGGATGCTGAGA– 3' Reverso: 5'- CCTGGCTAGAACACCAGCTC– 3'
	rs10783486	A/G	Direto: 5'- TAGCACCAACGTGCTCAAAG– 3' Reverso: 5'- CTGGGGACCTTCGTTCTTCT– 3'

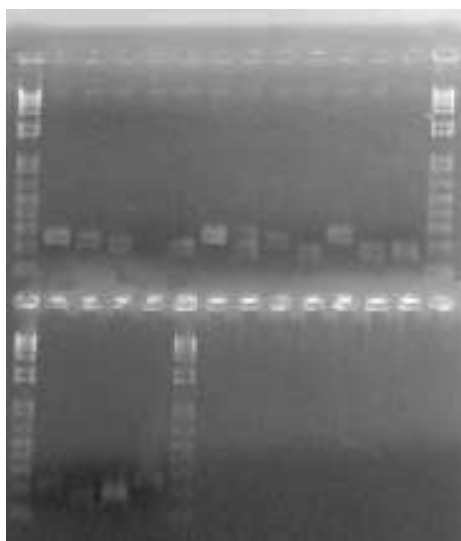


Figura 08 - Gel decorrente de teste dos Primers utilizados na pesquisa.

Após o preparo, a reação foi colocada em um termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), alternando as temperaturas entre 95, 55 e 72 graus Celsius com o intuito de promover, respectivamente, a desnaturação do DNA (separação da fitas devido ao rompimento das pontes de hidrogênio), o anelamento dos iniciadores às fitas simples de DNA, e a incorporação dos dNTPs às novas fitas de DNA. Especificamente, o programa utilizado adotou a seguinte variação de temperatura: 05 minutos a 95°C; 29 ciclos consistidos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C; 10 minutos a 72°; e manutenção da temperatura em 10°C até a reação ser retirada do termociclador.

Após amplificação pela PCR, os produtos co-amplificados passaram por uma purificação enzimática, para a eliminação do excesso de iniciadores e dNTPs não incorporados na reação. Para a purificação, foram utilizadas as enzima exonuclease 1 (Exol), SAP (do inglês, shrimp alkaline phosphatase) e tampão SAP nas quantidades de 0,1 µl, 0,9 µl e 0,5 µl, respectivamente. Para que ocorresse a purificação, foram necessárias condições de termociclagem. Para o processo de minissequenciamento foi utilizado o sistema comercial SNaPshot® Multiplex Genotyping System (Applied Biosystems) (Figura 09). Os amplicons de todos os testes, após serem amplificados, foram analisados com o objetivo de serem confirmados em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo (1 mg/mL). O protocolo seguinte consistiu de: Snap (1,66 µl), Primer Snapshot (1,0 µl) e água deionizada ultra-pura (0,34 µl).

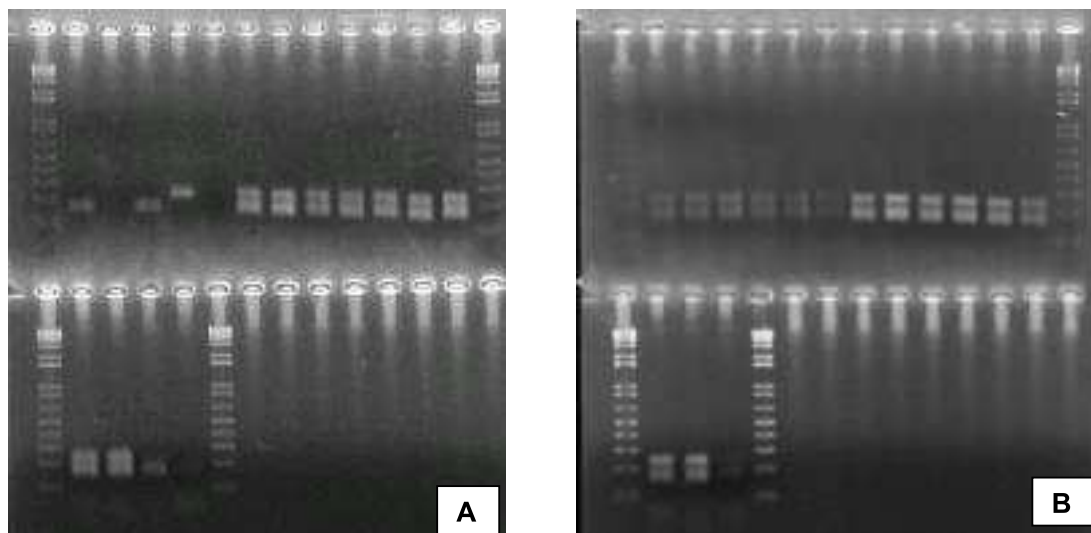


Figura 09 - Eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. (A) Modelo de gel resultante de uma PCR e (B) de um teste de otimização dos primers.

Os fragmentos amplificados pelos métodos de extensão de uma única base foram submetidos a uma nova purificação enzimática, para a remoção dos grupos fosforil das extremidades 5' dos ddNTPs fluorescentes. A eletroforese foi realizada em um sequenciador automático de DNA, modelo ABI prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando o formamida Hi-Di, e o padrão Liz120 Size Standard (Applied Biosystems). Os parâmetros de corrida foram: Polímero ABI3700 POP 7, com tensão de 3 volts e 40 segundos de injeção, e 15 volts de corrida por 800 segundos. As corridas foram analisadas com o programa GeneMapper 4.0. A genotipagem de 19 marcadores informativos de ancestralidade foi realizada sob as mesmas condições descritas acima.

Para estimar a ancestralidade genômica, 19 marcadores informativos de ancestralidade foram genotipados para todas as amostras. A ancestralidade em cada população foi estimada utilizando o software ADMIXMAP (<http://homepages.ed.ac.uk/pmckeigu/admixmap/>), com 2.500 iterações para o período de burnin e 10.000 iterações para medir dados de parâmetro.

4.6 Estatística

Para verificar a normalidade da distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados são apresentados através da estatística descritiva, utilizando-se os procedimentos de média e erro padrão e/ou desvio padrão. O teste qui-quadrado foi conduzido para: a) verificar se a frequência alélica das voluntárias encontrava-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e b) verificar a existência de diferenças entre os genótipos para as variáveis não-continuas, como presença de sarcopenia, suplementação de cálcio, uso de reposição hormonal e nível de atividade física.

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar a existência de diferenças entre os genótipos nas seguintes variáveis: idade, estatura, IMC, percentual de gordura, MLGA, MLGA relativa, MLGT, MLGT relativa, PT e PT relativo. A análise de covariância (ANCOVA) foi realizada para testar a associação entre os genótipos e os fenótipos relacionados à força muscular e à composição corporal. Para tal, utilizou-se como covariáveis os anos de menopausa, reposição hormonal, suplementação de cálcio, níveis de atividade física e ancestralidade africana. Ocorrendo diferença significativa em alguma das variáveis, testes de comparações múltiplas LSD foram adotados para identificação de contrastes relevantes entre as médias.

A análise de Mantel-Haenszel Common Odds Ratio foi utilizada, a fim de averiguar a associação entre os desfechos (fenótipos) e riscos (genótipos), ajustados por idade (quando houve diferença entre os grupos) e ancestralidade. Para tal, as variáveis relacionadas aos fenótipos musculares foram divididas em quartis, sendo Q1 o quartil inferior e Q4 o quartil superior. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$ e os dados foram analisados por meio do programa SPSS 14.0 for Windows.

5 RESULTADOS

Os dados descritivos da amostra, como idade, massa corporal, estatura, IMC, anos de menopausa, composição corporal e pico de torque estão apresentados na Tabela 02. Realizou-se a mensuração da composição corporal, força muscular e coleta sanguínea de 241 mulheres idosas (idade média 66,7 anos).

De acordo com a abordagem proposta por Baumgartner et al. (1998) e OMS (125), 17.3% das voluntárias foram classificadas como sarcopênicas e 73,4% como com excesso de peso ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$). Em relação a reposição hormonal e a suplementação de cálcio, 19 (7.9%) e 56 (23.7 %) idosas, respectivamente, estavam em uso de medicação. Os níveis de atividade física foram os seguintes: 5 (2.1%) eram sedentárias, 69 (28.6%) eram insuficientemente ativas, 163 (67.6%) eram ativas e 4 (1.7%) eram muito ativas.

Tabela 02 - Características das participantes. Os valores são expressos como média \pm Desvio Padrão.

Variáveis	
N	241
Idade (anos)	66.6 \pm 5.5
Massa Corporal (kg)	65.8 \pm 11.9
Estatura (m)	1.53 \pm 0.1
Anos de Menopausa	18.0 \pm 7.5
IMC (kg/m^2)	28.0 \pm 4.5
Percentual de Gordura (%)	39.5 \pm 5.9
MLGT (kg)	37.9 \pm 4.9
MLGT relativa (kg/m^2)	16.1 \pm 1.7
MLGA (kg)	14.6 \pm 2.3
MLGA relativa (kg/m^2)	6.2 \pm 0.8
PT (Nm)	95.1 \pm 22.8
PT relativo ($\text{Nm/kg} \cdot 100$)	145.9 \pm 31.2

IMC: Índice de massa corporal; %G: Percentual de gordura; MLGA: Massa livre de gordura apendicular; MLGT: Massa livre de gordura total; PT: Pico de torque; Excesso de peso: $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$

5.1 *FTO*

Os dados referentes à composição corporal, fenótipos musculares e ósseos, de acordo com os polimorfismos rs9939609 e rs1861868 estão apresentados nas tabelas 03 e 04, respectivamente. A distribuição dos polimorfismos do gene *FTO* (rs9939609 e rs1861868) está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weingerg ($p > 0,05$).

A frequência dos alelos A e T do polimorfismo rs9939609 foi de 0.39 e 0.61, respectivamente. A prevalência de excesso de peso encontrada foi de 69,2%, 77.8% e 70,2%, respectivamente, para os genótipos A/A, A/T e T/T, no entanto, o teste qui-quadrado não revelou diferenças estatísticas significantes entre os grupos. ANOVA e ANCOVA não revelaram diferenças estatísticas significantes para idade, IMC, composição corporal e força muscular para os genótipos.

A frequência do alelo G e A para o polimorfismo rs1868868 foi 0.47 e 0.52, respectivamente. A prevalência de excesso de peso foi 74,5%, 75.6% e 68,7%, respectivamente, para os genótipos G/G, G/A e A/A, no entanto, o teste qui-quadrado não revelou diferenças significativas. Da mesma forma, os testes estatísticos ANOVA e ANCOVA não apontaram diferenças estatísticas significantes para idade, IMC, composição corporal e força muscular.

Tabela 03 - Composição corporal e fenótipos musculares de acordo com o SNP rs9939609 do gene *FTO*. Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual.

Variáveis				p-valor				p-valor
	A/A	A/T	T/T		A/A	A/T+T/T		
N (%)	39(16.2)	108(44.8)	94(39)		39(16.2)			
Idade (anos) ^a	68.1 \pm 7.5	66.3 \pm 5.1	66.4 \pm 5.0	0.18	68.1 \pm 7.5	66.4 \pm 5.0	0.07	
IMC (kg/m ²)	27.8 \pm 0.7	27.9 \pm 0.4	28.1 \pm 0.5	0.94	27.8 \pm 0.7	28.0 \pm 0.3	0.81	
Prevalência sobrepeso (%)	14(35.9)	51(47.2)	34(36.2)	0.64	14(35.9)	85(42.1)	0.77	
Prevalência obesidade (%)	13(33.3)	33(30.6)	32(34.0)	0.64	13(33.3)	65(32.2)	0.77	
Percentual de gordura (%)	39.1 \pm 1.0	40.0 \pm 0.6	38.9 \pm 0.6	0.42	39.1 \pm 1.0	39.4 \pm 0.4	0.77	
MLGT (kg)	37.6 \pm 0.8	37.8 \pm 0.5	38.2 \pm 0.5	0.75	37.6 \pm 0.8	38.0 \pm 0.3	0.63	
MLGT relativa (kg/m ²)	16.0 \pm 0.3	16.0 \pm 0.2	16.3 \pm 0.2	0.46	16.0 \pm 0.3	16.2 \pm 0.1	0.61	
MLGA (kg)	14.2 \pm 0.4	14.7 \pm 0.2	14.6 \pm 0.2	0.58	14.2 \pm 0.4	14.7 \pm 0.2	0.31	
MLGA relativa (kg/m ²)	6.1 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	0.49	6.1 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	0.23	
PT (Nm)	94.5 \pm 3.7	94.2 \pm 2.2	96.5 \pm 2.3	0.75	94.5 \pm 3.7	95.3 \pm 1.6	0.83	
PT relativo (Nm/kg*100)	145.0 \pm 5.1	144.5 \pm 3.0	148.4 \pm 3.2	0.67	145.0 \pm 5.1	146.4 \pm 2.2	0.81	

IMC: Índice de Massa Corporal; MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; MLGT: Massa Livre de Gordura Total; PT: Pique de torque; ^a Valores são apresentados como média e desvio padrão.

Tabela 04 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs1861868 do gene *FTO*. Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual

Variáveis	p-valor			p-valor			
	G/G	A/G	A/A	G/G	A/G+A/A		
N (%)	55(22.8)	119(49.4)	67(27.8)		55(22.8)	186(77.2)	
Idade (anos) ^a	66.4 \pm 5.4	66.3 \pm 5.0	67.4 \pm 6.4	0.43	66.4 \pm 5.4	66.7 \pm 5.6	0.75
IMC (kg/m ²)	28.4 \pm 0.6	27.7 \pm 0.4	28.0 \pm 0.6	0.66	28.4 \pm 0.6	27.8 \pm 0.4	0.40
Prevalência sobrepeso (%)	22(40.0)	54(45.4)	23(34.3)	0.86	22(40.0)	77(41.4)	0.72
Prevalência obesidade (%)	19(34.5)	36(30.3)	23(34.3)	0.86	19(34.5)	59(31.7)	0.72
Percentual de gordura (%)	39.5 \pm 0.8	39.2 \pm 0.6	39.6 \pm 0.7	0.93	39.5 \pm 0.8	39.4 \pm 0.4	0.89
MLGT (kg)	38.7 \pm 0.7	38.0 \pm 0.5	37.3 \pm 0.6	0.30	38.7 \pm 0.7	37.7 \pm 0.4	0.21
MLGT relativa (kg/m ²)	16.3 \pm 0.2	16.2 \pm 0.2	16.0 \pm 0.2	0.75	16.3 \pm 0.2	16.1 \pm 0.1	0.60
MLGA (kg)	14.8 \pm 0.3	14.7 \pm 0.2	14.3 \pm 0.2	0.49	14.8 \pm 0.3	14.5 \pm 0.2	0.53
MLGA relativa (kg/m ²)	6.2 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	6.1 \pm 0.1	0.72	6.2 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	0.96
PT (Nm)	96.7 \pm 3.0	96.8 \pm 2.1	91.2 \pm 2.7	0.23	96.7 \pm 3.0	94.7 \pm 1.7	0.58
PT relativo (Nm/kg*100)	144.5 \pm 4.2	149.7 \pm 2.9	141.5 \pm 3.8	0.20	144.5 \pm 4.2	146.7 \pm 2.3	0.64

IMC: Índice de Massa Corporal; MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; MLGT: Massa Livre de Gordura Total; PT: Pique de torque; ^a Valores são apresentados como média e desvio padrão.

5.2 *TRHR*

A distribuição alélica do gene *TRHR* (rs16892496 e rs7832552) estava de acordo com equilíbrio de Hardy-Weingerg ($p > 0.05$). Os resultados dos genótipos rs16892496 e rs7832552, para composição corporal e fenótipos de força muscular, estão apresentados nas Tabelas 05 e 06, respectivamente.

A prevalência de sarcopenia para o polimorfismo rs16892496 foi de 27.6%, 17.8% e 13.3%, respectivamente, para os genótipos C/C, A/C e A/A, no entanto, o teste qui-quadrado não revelou diferenças estatísticas significantes. A ANOVA não revelou diferenças estatísticas para peso, estatura ou IMC, porém, a idade foi significativamente superior para os indivíduos com genótipo C/C e, dessa forma, essa variável foi utilizada como covariável no teste ANCOVA. Não foram observadas diferenças para IMC e percentual de gordura. ANOVA revelou que MLGA e PT diferiram significativamente entre os grupos, com valores inferiores para MLGA em sujeitos carreadores do genótipo C/C. No entanto, quando a idade e a ancestralidade genômica foram adicionadas como covariáveis, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significantes, mas apenas uma tendência (valores de significância variando entre 0.07 e 0.15; tabela 05). Quando o genótipo C/C foi comparado ao grupo composto pelo alelo A (A/A+A/C), foram observadas diferenças estatísticas significantes para MLGA e MLGA relativa, com valores inferiores para o genótipo C/C (após ajuste para idade e ancestralidade africana).

A prevalência de sarcopenia, conforme polimorfismo rs78322496 foi de 20.6%, 13.6% e 20.6%, respectivamente, para os genótipos T/T, C/T e C/C, no entanto, o teste qui-quadrado não revelou diferenças estatísticas significantes. A ANOVA não revelou diferença estatística para peso, estatura ou idade. Não foram observadas diferenças para variáveis de composição corporal e fenótipos musculares na ANOVA e ANCOVA.

Tabela 05 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs16892496 do gene *TRHR*. Dados são apresentados em média \pm erro padrão (ajustados também para idade).

Variáveis	p-valor			p-valor			
	C/C	A/C	A/A	C/C	A/C+A/A		
N (%)	29 (12)	129 (53.5)	83 (34.5)	29 (12)	212 (88.0)		
Idade (anos) ^a	69.2 \pm 6.23*	66.4 \pm 5.25	66.1 \pm 5.53	0.03	69.2 \pm 6.2*	66.3 \pm 5.35	0.01
IMC (kg/m ²)	27.2 \pm 0.85	28.1 \pm 0.40	28.1 \pm 0.50	0.63	27.2 \pm 0.85	28.1 \pm 0.31	0.33
Percentual de gordura (%)	38.4 \pm 1.11	39.6 \pm 0.52	39.5 \pm 0.65	0.62	38.4 \pm 1.11	39.5 \pm 0.41	0.33
MLGT (kg)	36.9 \pm 0.91	37.9 \pm 0.43	38.4 \pm 0.53	0.40	36.9 \pm 0.91	38.1 \pm 0.33	0.24
MLGT relativa (kg/m ²)	15.9 \pm 0.32	16.1 \pm 0.15	16.3 \pm 0.19	0.59	15.9 \pm 0.32	16.2 \pm 0.12	0.42
MLGA (kg)	13.7 \pm 0.43	14.6 \pm 0.20	14.7 \pm 0.25	0.13	13.7 \pm 0.43*	14.7 \pm 0.16	0.04
MLGA relativa (kg/m ²)	5.9 \pm 0.15	6.2 \pm 0.07	6.2 \pm 0.09	0.14	5.9 \pm 0.15*	6.2 \pm 0.06	0.04
PT (Nm)	90.0 \pm 4.02	93.4 \pm 1.89	99.2 \pm 2.35	0.07	90.0 \pm 4.02	95.7 \pm 1.48	0.20
PT relativo (Nm/kg*100)	143.6 \pm 5.64	143.0 \pm 2.65	151.1 \pm 3.30	0.15	143.6 \pm 5.64	146.2 \pm 2.08	0.67

IMC: Índice de Massa Corporal; MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; MLGT: Massa Livre de Gordura Total; PT: Pique de torque; ^a Valores são apresentados como média e desvio padrão; * diferença estatística significativa (p <0.05) comparada com outros genótipos.

Tabela 06 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs7832552 do gene *TRHR*. Dados são apresentados em média \pm erro padrão.

Variáveis				p-valor		p-valor	
	T/T	C/T	C/C		T/T	C/T+C/C	
N (%)	34(14.1)	110 (45.6)	97 (40.3)		34(14.1)	207(85.9)	
Idade (anos) ^a	67.4 \pm 5.4	66.5 \pm 5.5	66.5 \pm 5.6	0.68	67.4 \pm 5.4	66.5 \pm 5.5	0.39
IMC (Kg/m ²)	27.0 \pm 0.8	28.4 \pm 0.4	27.8 \pm 0.5	0.23	27.0 \pm 0.8	28.1 \pm 0.3	0.17
Percentual de gordura (%)	38.2 \pm 1.0	39.7 \pm 0.6	39.3 \pm 0.6	0.69	38.2 \pm 1.0	39.5 \pm 0.4	0.46
MLGT (kg)	37.1 \pm 0.9	38.5 \pm 0.5	37.6 \pm 0.5	0.25	37.1 \pm 0.9	38.1 \pm 0.3	0.31
MLGT relativa (Kg/m ²)	15.8 \pm 0.3	16.3 \pm 0.2	16.1 \pm 0.2	0.28	15.8 \pm 0.3	16.2 \pm 0.1	0.28
MLGA (kg)	14.2 \pm 0.4	14.8 \pm 0.2	14.4 \pm 0.2	0.30	14.2 \pm 0.4	14.6 \pm 0.2	0.41
MLGA relativa (Kg/m ²)	6.1 \pm 0.1	6.3 \pm 0.1	6.1 \pm 0.1	0.27	6.1 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	0.41
PT (Nm)	94.2 \pm 4.0	96.2 \pm 2.2	94.0 \pm 2.3	0.77	94.2 \pm 4.0	95.1 \pm 1.6	0.82
PT relativo (Nm/kg*100)	150.2 \pm 5.5	144.8 \pm 3.0	145.7 \pm 3.2	0.69	150.2 \pm 5.5	145.2 \pm 2.2	0.40

IMC: Índice de Massa Corporal; MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; MLGT: Massa Livre de Gordura Total; PT: Pique de torque; ^a Valores são apresentados como média e desvio padrão.

A Tabela 07 apresenta os valores referentes a análises de Razão de Chance para o genótipo rs16892496, MLGA relativa e PT relativo. Os valores para essas variáveis foram divididos em quartis para posterior análise de Mantel-Haenszel Common Odds Ratio (ajustado para idade e ancestralidade africana). Verificou-se que o genótipo C/C apresenta maior chance de ser classificado no quartil inferior para MLGA relativa e PT relativo, quando comparado ao genótipo A/A.

Tabela 07 - Razão de chance entre fenótipo e genótipo (ajustada para idade e ancestralidade Africana)

Fenótipo	Genótipo	OR (95%CI)
MLGA relative inferior (<5.7kg)	A/A	1.00
	A/C+C/C	2.24 (1.12 – 4.49)
	C/C	3.95 (1.41 - 11.11)
PT relative inferior (<126.7Nm/kg)	A/A	1.00
	A/C	2.68 (1.18 – 6.10)
	A/C+C/C	2.71 (1.63 – 5.8)
	C/C	3.09 (1.11 - 8.58)

MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; PT: Pique de Torque.

5.3 ACVR1b

Os dados referentes à composição corporal e fenótipos musculares dos polimorfismos do gene *ACVR1b* (rs2854464, rs10783485 e rs10783486) estão apresentados nas tabelas 08, 09 e 10, respectivamente. As distribuições alélicas dos polimorfismos estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weingerg ($p > 0.05$)

Em relação aos polimorfismos do rs2854464 (Tabela 08) verificou-se diferença estatística significativa na prevalência de sobrepeso e obesidade. Não foi observada diferença significativa entre os grupos, nas demais variáveis.

Conforme Tabela 09, houve diferença estatística entre os genótipos na variável prevalência de sobrepeso e obesidade. O genótipo G/T do polimorfismo rs10783485 difere estatisticamente dos demais (G/G e T/T) no %G e PT relativo. Indivíduos carreadores do genótipo T/T apresentaram percentual de gordura estatisticamente inferior aos carreadores do alelo G.

O polimorfismo rs10783486 (tabela 10) não apontou diferença estatística significativa para os fenótipos em questão. Verifica-se que o genótipo G/G tendeu para valores menores de MLGT relativa ($p=0,08$) e MLGA relativa ($p=0,07$).

Tabela 08 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SNP rs2854464 do gene *ACVR1b*. Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual.

Variáveis				p-valor		p-valor	
	A/A	A/G	G/G		A/A	G/G+A/G	
N (%)	53(22.0)	74(30.7)	114(47.3)		53(22.0)	188(78)	
Idade (anos) ^a	66.79 \pm 4.9	66.35 \pm 6.1	66.77 \pm 5.5	0.86	66.79 \pm 4.9	66.61 \pm 5.7	0.83
IMC (kg/m ²)	28.7 \pm 0.6	27.7 \pm 0.5	27.8 \pm 0.4	0.41	28.7 \pm 0.6	27.8 \pm 0.3	0.19
Prevalência sobrepeso (%)	20 (37.7)	28 (37.8)	51 (44.7)	0.03	20(37.7)	79(42.0)	0.02
Prevalência obesidade (%)	24 (45.3)	22 (29.7)	32 (28.1)	0.03	24(45.3)	54(28.7)	0.02
Percentual de gordura (%)	40.7 \pm 0.8	38.7 \pm 0.7	39.2 \pm 0.5	0.18	40.7 \pm 0.8	39.0 \pm 0.4	0.08
MLGT (kg)	38.6 \pm 0.7	38.1 \pm 0.6	37.5 \pm 0.5	0.40	38.6 \pm 0.7	37.8 \pm 0.4	0.26
MLGT relativa (kg/m ²)	16.3 \pm 0.2	16.2 \pm 0.2	16.0 \pm 0.2	0.51	16.3 \pm 0.2	16.1 \pm 0.1	0.44
MLGA (kg)	14.9 \pm 0.3	14.8 \pm 0.3	14.4 \pm 0.2	0.35	14.9 \pm 0.3	14.5 \pm 0.2	0.35
MLGA relativa (kg/m ²)	6.3 \pm 0.1	6.3 \pm 0.1	6.1 \pm 0.1	0.39	6.3 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	0.48
Prevalência sarcopenia (%)	7(13.2)	14(18.9)	21(18.4)	0.43	7(13.2)	35(18.6)	0.24
PT (Nm)	99.2 \pm 3.1	95.7 \pm 2.7	93.0 \pm 2.1	0.25	99.2 \pm 3.1	94.0 \pm 1.6	0.15
PT relativo (Nm/kg*100)	146.8 \pm 4.3	149.2 \pm 3.7	143.9 \pm 2.9	0.53	146.8 \pm 4.3	146.0 \pm 2.3	0.86

IMC: Índice de Massa Corporal; MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; MLGT: Massa Livre de Gordura Total; PT: Pique de torque; ^a Valores são apresentados como média e desvio padrão.

Tabela 09 - Composição corporal e fenótipos musculares, de acordo com o SN rs10783485 do gene *ACVR1b*. Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual.

Variáveis				p-valor			p-valor
	T/T	G/T	G/G		T/T	G/G+G/T	
N (%)	42(17.4)	106(44.0)	93(38.6)		42(17.4)	199(82.6)	
Idade (anos) ^a	65.71 \pm 4.8	66.71 \pm 5.7	67.00 \pm 5.6	0.45	65.71 \pm 4.8	66.84 \pm 5.6	0.23
IMC (kg/m ²)	27.2 \pm 0.7	28.7 \pm 0.4	27.5 \pm 0.5	0.09	27.2 \pm 0.7	28.1 \pm 0.3	0.23
Prevalência sobrepeso (%)	20 (47.6)	36 (34.0)	43 (46.2)	0.04	20 (47.6)	79(39.7)	0.15
Prevalência obesidade (%)	9 (21.4)	44 (41.5)	25 (26.9)	0.04	9 (21.4)	69(34.7)	0.15
Percentual de gordura (%)	37.4 \pm 0.9	40.2 \pm 0.6*	39.5 \pm 0.6	0.04	37.4 \pm 0.9*	39.8 \pm 0.4	0.02
MLGT (kg)	38.2 \pm 0.8	38.3 \pm 0.5	37.5 \pm 0.5	0.50	38.2 \pm 0.8	37.9 \pm 0.4	0.69
MLGT relativa (kg/m ²)	16.2 \pm 0.3	16.3 \pm 0.2	15.9 \pm 0.2	0.27	16.2 \pm 0.3	16.1 \pm 0.1	0.78
MLGA (kg)	15.0 \pm 0.4	14.6 \pm 0.2	14.4 \pm 0.2	0.41	15.0 \pm 0.4	14.5 \pm 0.2	0.22
MLGA relativa (kg/m ²)	6.4 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	6.1 \pm 0.1	0.28	6.4 \pm 0.1	6.17 \pm 0.1	0.19
Prevalência sarcopenia (%)	5(11.9)	19(17.9)	18(19.4)	0.51	5(11.9)	37(18.6)	0.21
PT (Nm)	96.5 \pm 3.5	93.3 \pm 2.2	96.7 \pm 2.3	0.52	96.5 \pm 3.5	98.9 \pm 1.6	0.66
PT relativo (Nm/kg*100)	152.5 \pm 4.7	140.1 \pm 3.0*	149.9 \pm 3.2	0.03	152.5 \pm 4.7	144.7 \pm 2.2	0.14

IMC: Índice de Massa Corporal; MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; MLGT: Massa Livre de Gordura Total; PT: Pique de torque; ^a Valores são apresentados como média e desvio padrão; * diferença estatística significativa (p <0.05) comparada com outros fenótipos.

Tabela 10 - Composição corporal e fenótipos musculares de acordo com o SNP rs10783486 do gene *ACVR1b*. Dados são apresentados em média \pm erro padrão e percentual

Variáveis				p-valor				p-valor
	G/G	A/G	A/A		G/G	A/A+A/G		
N (%)	46 (19.1)	118 (49.0)	77 (31.9)		46(19.1)	195(80.9)		
Idade (anos) ^a	67.09 \pm 5.1	66.13 \pm 5.3	67.18 \pm 6.0	0.36	67.09 \pm 5.1	66.54 \pm 5.6	0.55	
Prevalência sobrepeso (%)	20(43.5)	47(39.8)	32(41.6)	0.24	20(43.5)	79(40.5)	0.32	
Prevalência obesidade (%)	12(26.1)	42(35.6)	24(31.2)	0.24	12(26.1)	66(33.8)	0.32	
IMC (kg/m ²)	27.5 \pm 0.7	28.1 \pm 0.4	28.0 \pm 0.5	0.74	27.5 \pm 0.7	28.1 \pm 0.3	0.46	
Percentual de gordura (%)	39.8 \pm 0.9	39.5 \pm 0.6	39.0 \pm 0.7	0.74	39.8 \pm 0.9	39.3 \pm 0.4	0.58	
MLGT (kg)	37.1 \pm 0.7	38.4 \pm 0.5	37.8 \pm 0.6	0.33	37.1 \pm 0.7	38.2 \pm 0.4	0.20	
MLGT relativa (kg/m ²)	15.7 \pm 0.2	16.3 \pm 0.2	16.2 \pm 0.2	0.19	15.7 \pm 0.2	16.2 \pm 0.1	0.08	
MLGA (kg)	14.2 \pm 0.3	14.9 \pm 0.2	14.4 \pm 0.3	0.15	14.2 \pm 0.3	14.7 \pm 0.2	0.18	
MLGA relativa (kg/m ²)	6.0 \pm 0.1	6.3 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	0.09	6.0 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	0.07	
Prevalência sarcopenia (%)	11(23.9)	20(16.9)	11(14.3)	0.43	11(23.9)	31(15.9)	0.14	
PT (Nm)	93.5 \pm 3.3	98.2 \pm 2.1	91.6 \pm 2.5	0.12	93.5 \pm 3.3	95.6 \pm 1.6	0.59	
PT relativo (Nm/kg*100)	144.8 \pm 4.6	149.5 \pm 2.9	141.9 \pm 3.5	0.24	144.8 \pm 4.6	146.5 \pm 2.2	0.64	

IMC: Índice de Massa Corporal; MLGA: Massa Livre de Gordura Apendicular; MLGT: Massa Livre de Gordura Total; PT: Pique de torque; ^a Valores são apresentados como média e desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

6.1 Prevalência de sarcopenia e excesso de peso

Os dados deste estudo apontam uma prevalência de sarcopenia de 17.3%, a qual se assemelha à prevalência no Novo México, EUA (10 a 20%), entre idosos com idade inferior a 70 anos (90). Segundo Morley (126) é muito comum a ocorrência de prevalência de sarcopenia variar entre 5% a 13% entre idosos com 60 a 70 anos. No entanto, há lugares em que as estatísticas apontam prevalências superiores, como em Connecticut-USA (26.8% - entre idosas com idade entre 64 e 93 anos) (127) e na Tailândia (34.7% - em mulheres com idade entre 20 a 84 anos) (128).

A prevalência de sobrepeso e obesidade na amostra estudada foi elevada (41,1% e 32,4%, respectivamente) ao se comparar a população chinesa (129) (32,8% e 5,6%, respectivamente), apresentando-se similar às prevalências relatadas na população norte-americana (44) (42,3% e 31,1%, respectivamente). Esse achado é preocupante em função das comorbidades associadas à obesidade (com maior impacto entre idosos) e pela equiparação de prevalências alarmantes de um país desenvolvido com um emergente. É possível constatar que o Brasil também está enfrentando as consequências da transição nutricional (130).

Dessa forma, é clara a necessidade de implantação de intervenções visando a manutenção da massa magra e controle da gordura corporal em mulheres idosas. Nesse sentido, a combinação da dieta com o exercício físico regular vem sendo apontada como uma conduta eficaz na redução de peso e, conseqüentemente, na redução do risco metabólico em mulheres obesas (131).

6.2 *FTO*

O primeiro estudo e associação genética que identificou a relação entre o gene *FTO* e a obesidade data de 2007 (12, 132). No artigo em questão, foram identificados múltiplos polimorfismos do gene, associados a diabetes mellitus do tipo

2 (DM2). No entanto, após ajuste para o IMC, a associação não foi verificada, mostrando que, possivelmente, esses polimorfismos estavam associados ao IMC e ao aumento de peso e se portaram como fatores de risco para o desenvolvimento de DM2. Carreadores do genótipo A/A apresentavam aproximadamente 3kg a mais de massa corporal e uma probabilidade 1.67 vezes maior de apresentar obesidade, enquanto o genótipo heterozigoto apresentou um ganho de 1.5kg (12).

Frayling (12) foi o pioneiro, no entanto, os estudos de replicação se expandiram para outras etnias, idades e raças (13, 14, 16, 133). Recentemente, Mei e colaboradores (134) concluíram que as variações do gene *FTO* (em especial o alelo A) podem acelerar o início precoce e aumentar a probabilidade de sobrepeso em adultos jovens. Em relação à realização de estudos com a população brasileira, foram encontrados na literatura três artigos (20, 135, 136) que replicaram GWAS nessa amostra (no caso, análises referentes ao gene *FTO*). Da Silva et al. (20) analisou a associação dos polimorfismos em uma amostra com crianças de até 8 anos, concluindo que as variações do *FTO* estão associadas ao aumento do IMC e das dobras cutâneas em crianças brasileiras com idade acima de 4 anos. Ramos et al. (135) encontrou associação entre o SNP rs9939609 e variáveis metabólicas e cardiovasculares em idosos (glicose sanguínea, circunferência da cintura e hipertensão), no entanto, não foi verificada associação ao IMC. Ramos et al. (136) estudaram a contribuição do polimorfismo rs9939609 para a ocorrência da obesidade extrema em brasileiros (idade média de 45 anos). Os autores constataram que esse polimorfismo contribui para a obesidade em indivíduos brasileiros.

O presente estudo, além de envolver uma amostra de indivíduos idosos e a avaliação do IMC, valeu-se do DXA para um diagnóstico mais sofisticado de composição corporal. Não foi observada diferença estatística significativa para os polimorfismos do gene *FTO*, mesmo após análises adicionais com covariáveis (idade, anos de menopausa, nível de atividade física, reposição hormonal, suplementação de cálcio e ancestralidade) nas variáveis relacionadas ao fenótipo de massa gorda (IMC, %G, prevalência de excesso de peso, MLGT, MLGT relativa, MLGA e MLGA relativa). Esses resultados corroboram os estudos realizados por Ramos et al. (135), Jacobsson et al. (137) e Jacobsson et al. (138).

Jacobsson et al. (138) verificaram que o alelo de risco do polimorfismo rs9939609 para obesidade não se associa ao aumento de IMC, em um estudo de

coorte realizado com homens adultos suecos. Ramos et al. (135) testaram a associação entre o rs9939609 e variáveis metabólicas e cardiovasculares, no período pós-menopausa, em mulheres brasileiras. Os autores concluíram que o polimorfismo é um preditor para doenças cardiovasculares (valores elevados de razão cintura-quadril, pressão arterial e acumulação lipídica), mas não houve associação do SNP com o IMC. Jacobsson et al. (137) examinaram se o gene *FTO* está associado a sobrepeso e a fenótipos de composição corporal (circunferência da cintura, massa gorda total, massa gorda do tronco, massa gorda dos membros inferiores, tecido visceral e subcutâneo) em idosos. Da mesma forma, os autores não verificaram associação de nenhum polimorfismo, entre eles o rs9939609, com fenótipos da composição corporal (incluindo sobrepeso) em ambos os sexos. Os autores concluíram que o gene *FTO* é menos associado a sobrepeso e a fenótipos de composição corporal (circunferência da cintura, massa gorda total, massa gorda do tronco, massa gorda dos membros inferiores, tecido visceral e subcutâneo) em idosos do que em jovens. Notadamente, a temática é ainda controversa.

A média de idade (70.2 anos) da amostra de Jacobsson et al. (137) é similar à desse trabalho (66.5 anos). Os demais estudos que, diferentemente, encontraram associação entre o rs9939609 e fenótipos ligados à obesidade (12, 139) possuem médias de idade diferentes e amplitudes de idade elevadas; fatos que podem causar vieses de análise, além de que, aparentemente, os efeitos do *FTO* na composição corporal parecem menos profundos entre idosos do que em idade mais jovens (137).

O polimorfismo rs1861868 do gene *FTO* tem sido explorado na literatura internacional, visando melhor entendimento da associação do SNP com fenótipos de massa gorda. Ao se realizar a busca desse polimorfismo no Banco de Dados de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (140) verifica-se a citação do polimorfismo em apenas 3 artigos (79, 80, 141), sendo um desses de revisão (141). Rampersaud et al. (79) identificaram que o SNP rs1861868 associa-se ao IMC de indivíduos que apresentaram baixos escores para nível de atividade física (após ajuste para sexo e idade), não revelando efeito naqueles que apresentaram nível de atividade física acima da média. Rodríguez-López et al. (80) identificaram que os indivíduos portadores do alelo A para rs1861868 mostraram um aumento do risco (OR: 3.03; IC95%: 1.74–5.27) a desenvolver obesidade mórbida. No presente estudo, não foi verificada diferença estatística significativa entre os genótipos. Os mesmos não diferiram, mesmo após o ajuste das médias para as covariáveis. Observa-se,

novamente, um viés de análise decorrente de amplitude de idades, e idades médias diferentes do presente estudo. Rampersaud et al. (79) avaliaram indivíduos com 43.6 ± 3.4 anos e Rodríguez-López et al. (80) apresentaram uma elevada amplitude de idade (6 a 81 anos).

Em relação ao nível de atividade física, é importante citar que o gene *FTO* não se associa ao nível de atividade física (63, 82), desta forma, a adoção de hábitos de prevenção, como a prática de atividade física regular, auxilia no combate ao risco aumentado de desenvolvimento da obesidade, devido à suscetibilidade genética do *FTO* (63, 79).

6.3 *TRHR*

Liu et al. (23) publicaram o primeiro estudo de associação genética com traços musculares, especificamente MLG. Embora a força muscular não tenha sido avaliada em sua investigação, os autores identificaram que os polimorfismos rs16892496 e rs7832552 do gene *TRHR*, estavam associados à MLG (avaliada através da DXA) em um estudo de 9.350.000 SNP. Além disso, os autores replicaram as associações significativas em três amostras independentes. Outros estudos evidenciaram associação entre um número razoável de polimorfismos de genes candidatos e fenótipos musculares relacionados, mas com pouca consistência sobre a contribuição de forma significativa dos mesmos (29, 111, 142). No ano de 2012 foram desenvolvidas poucas pesquisas na área da genética e fenótipos musculares. Dos trabalhos que foram publicados, a maioria apresentou amostras pequenas ou resultados inconclusivos, não sendo verificado GWAS significativos que estudaram o gene *TRHR*, nesse ano (11). Dessa forma, pesquisadores da área do exercício precisam priorizar os projetos de alta qualidade e estudos de replicação, com grandes tamanhos de amostra e fenótipos musculares (111).

O gene *TRHR* codifica o hormônio receptor da tireotropina. Devido à importante função desse hormônio, no desenvolvimento da massa muscular esquelética, o gene *TRHR* é assim reconhecido como um importante gene candidato para futuras investigações, com consequências potenciais para os desfechos correlacionados à força e à potência muscular (111). O hormônio liberador de tireotropina é um neuropeptídeo de pequeno porte, amplamente distribuído por todo

o sistema nervoso central e nos tecidos periféricos, bem como nos tecidos extraneurais. Esse hormônio exerce o seu efeito por ligação ao *TRHR* (localizado na região 8q.23.1) na superfície de células tireotróficas e pituitárias. A principal consequência dessa ligação é a estimulação da secreção do hormônio estimulante da tireoide. Como resposta, o hormônio estimulador da tireoide estimula a liberação de tiroxina, que é importante para o desenvolvimento do músculo esquelético dos vertebrados (112, 113).

O estudo realizado por Liu et al. (23) é apontado pelo catálogo do Instituto de Pesquisa do Genoma Humano (143) como o único trabalho que encontrou a associação entre gene *TRHR* com a massa magra. Estudos com esse gene apontavam, até então, associação com outros fenótipos, tais como adenomas de hipófise (144) e hipertensão (108, 109). O presente estudo replicou o estudo de Liu et al. (23) em uma amostra de idosas brasileiras, sugerindo uma modesta associação entre o rs16892496 e o MLG. Os indivíduos carreadores do genótipo C/C apresentaram uma maior chance (OR: 3,95; IC: 1,41 – 11,11) para valores inferiores de MLGA, quando comparados aos homozigotos A/A. Indivíduos A/A e A/C, apresentaram 1kg e 900g, respectivamente, de MLGA extra, quando comparados aos carreadores do genótipo C/C. Além disso, observou-se uma tendência para diferença entre genótipos na variável PT. Os portadores do alelo C possuíam maior probabilidade (OR: 3,09; IC: 1,11 – 8,58) de serem classificados no quartil mais baixo da força muscular. No entanto, as diferenças observadas no presente estudo foram modestas ao se considerar a alta hereditariedade de fenótipos musculares (23, 145).

Assim, os resultados desse estudo demonstram que o polimorfismo estudado (rs16892496) no gene *TRHR* é uma variante genética que contribui para a força muscular e MLG em análises transversais, embora a sua relevância clínica ainda deva ser investigada. Analisados em conjunto com os resultados de Liu et al.(23), os achados sugerem que o gene *TRHR* poderia ser um candidato importante para diferenças interindividuais em fenótipos musculares. Os principais resultados do presente estudo fornecem mais provas de uma associação entre o polimorfismo rs16892496 *TRHR* e MLG.

6.4 *ACVR1b*

O *ACVR1b* é um gene explorado em estudos relacionados a câncer de pâncreas (114) e pulmão (115), mas, recentemente, foi associado à força muscular (24). Esse gene carece de estudos relacionados a fenótipos musculares (MLG e força muscular) visto que apenas Windelinckx (24) relatou tal associação com o polimorfismo rs2854464 (140, 143).

Windelinckx et al. (2011) verificaram que o SNP rs2854644 associa-se à força muscular do joelho humano em três amostras independentes, a partir de uma ampla faixa etária (20 a 90 anos). Os mesmos autores verificaram que indivíduos homocigotos A/A para o polimorfismo rs2854464 eram ~2% mais fortes que os portadores do alelo G. No presente estudo, os portadores do par de alelos A apresentaram, de forma geral, valores superiores para os fenótipos musculares, no entanto, não foi verificada diferença estatística significativa com os demais genótipos portadores do alelo G.

Um achado, ao acaso do, presente estudo diz respeito à diferença estatística entre os genótipos do rs2854464 para a prevalência de sobrepeso e obesidade. Embora não tenha sido encontrada uma maior probabilidade (Odds Ratio) de um genótipo em questão apresentar maior tendência a quadros de excesso de peso, foi verificada diferença significativa entre os grupos. Chama atenção o fato do genótipo A/A apresentar valores condizentes para um fenótipo muscular positivo (MLGT, MLGT relativa, MLGA, MLGA relativa, PT e PT relativo superiores e menor prevalência de sarcopenia) e valores contraditórios para a composição corporal (maior prevalência de obesidade, percentual de gordura e menor prevalência para ocorrência de sobrepeso).

Os polimorfismos rs10783485 e rs10783486 ainda não foram relacionados a nenhum fenótipo (140). No entanto, verificaram-se resultados interessantes na amostra desse estudo. Os genótipos do rs10783485 diferiram estatisticamente na variável percentual de gordura. Indivíduos portadores do genótipo T/T apresentaram percentual de gordura estatisticamente inferior aos portadores do alelo G. O mesmo genótipo (T/T), embora não tenha apresentado diferença significativa do genótipo G/G, apresentou valor superior para PT relativo, MLGT, MLGT relativa, MLGA e MLGA relativa, além de menor prevalência de sarcopenia,

confirmando assim uma tendência positiva para fenótipos de composição corporal e força muscular.

O alelo A, do polimorfismo rs10783486 (tabela 10), mostrou tendência à ocorrência de fenótipo favorável para valores superiores de MLGT relativa ($p=0,08$) e MLGA relativa ($p=0,07$).

O *ACVR1b* é um regulador da liberação de miostatina (107, 108), e essa, por sua vez, limita o crescimento do tecido muscular. A miostatina também é expressa no tecido adiposo, porém, em menores quantidades, quando comparado ao tecido muscular. A inibição da miostatina no músculo acarreta em diminuição do tecido adiposo e aumento do tecido muscular (146-148), auxiliando assim no entendimento dos resultados relatados nessa amostra.

Windelinckx et al. (24) foram os pioneiros, e até o momento, os únicos a verificarem associação do gene *ACVR1b* com fenótipos musculares. O presente estudo buscou replicar os resultados desses autores em uma amostra de idosas brasileiras, sendo encontradas tendências do gene para o fenótipo em questão, inclusive, com associação a percentual de gordura.

6.5 Considerações finais

Os conhecimentos sobre Genética e Biologia (molecular e evolutiva) do envelhecimento, aliados aos fatores ambientais, tais como nutrição, estilo de vida e características biopsicossociais, são o caminho para se começar a desvendar a rede de complexidade biológica que envolve os processos de saúde, doença, envelhecimento e longevidade humana (25).

A associação genética e os desfechos que acompanham o envelhecimento (sarcopenia, osteoporose e obesidade) ainda são pouco explorados e estudados na literatura nacional e internacional. No ano de 2012, poucos artigos qualificados sobre exercícios físicos e genética foram publicados (11), enfatizando, a importância da realização de trabalhos visando investigar e determinar a associação dos polimorfismos com desfechos variados. Possibilitar-se-á assim, a realização de intervenções antecipadas, de forma precisa e adequada, com o intuito de se minimizar ou até mesmo retardar os efeitos deletérios do envelhecimento.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados, conclui-se que o gene *FTO* não é determinante no fenótipo de obesidade (sobrepeso, obesidade e MLG) em uma amostra de mulheres idosas brasileiras. O polimorfismo rs16892496 do gene *TRHR* forneceu evidências adicionais de que o SNP pode desempenhar um papel na variação da MLG e o gene candidato *ACVR1b* apontou tendência para fenótipo muscular positivo (A/A - rs2854464, T/T - rs10783485 e A - rs10783486) e diferenças genóticas para o percentual de gordura e prevalência de excesso de peso.

8 REFERÊNCIAS

1. Maes HHM, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavior genetics*. 1997;27(4):325-51.
2. Marti A, Moreno-Aliaga M, Hebebrand J, Martinez J. Genes, lifestyles and obesity. *International Journal of Obesity*. 2004;28:S29-S36.
3. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(22):2355-65.
4. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkarsdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, et al. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Annals of internal medicine*. 2009;151(8):528-37.
5. Arden N, Spector T. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(12):2076-81.
6. Nguyen T, Howard G, Kelly P, Eisman JA. Bone mass, lean mass, and fat mass: Same genes or same environments? *American journal of epidemiology*. 1998;147(1):3-16.
7. Hsu FC, Lenchik L, Nicklas BJ, Lohman K, Register TC, Mychaleckyj J, et al. Heritability of Body Composition Measured by DXA in the Diabetes Heart Study*
&*. *Obesity*. 2005;13(2):312-9.
8. Lima R, Leite T, Pereira R, Rabelo H, Roth S, Oliveira R. ACE and ACTN3 genotypes in older women: muscular phenotypes. *Int J Sports Med*. 2011;32(1):66-72.
9. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *The Lancet*. 2003;361(9357):598-604.
10. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(5):1590.
11. Pérusse L, Rankinen T, Hagberg JM, Loos R, Roth SM, Sarzynski MA, et al. *Advances in Exercise, Fitness, and Performance Genomics in 2012*. *Medicine and science in sports and exercise*. 2013.

12. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007;316(5826):889-94. Epub 2007/04/17.
13. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS genetics*. 2007;3(7):e115.
14. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature genetics*. 2007;39(6):724-6.
15. Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brönner G, Müller TD, et al. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One*. 2007;2(12):e1361.
16. Loos R, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obesity Reviews*. 2008;9(3):246-50.
17. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CNA. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(24):2558-66.
18. Legry V, Cottel D, Ferrières J, Arveiler D, Andrieux N, Bingham A, et al. Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. *Metabolism*. 2009;58(7):971-5.
19. Luczynski W, Zalewski G, Bossowski A. The association of the FTO rs9939609 polymorphism with obesity and metabolic risk factors for cardiovascular diseases in Polish children. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2012;63(3):241.
20. da Silva CF, Zandoná MR, Vitolo MR, Campagnolo PD, Rotta LN, Almeida S, et al. Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. *BMC medical genetics*. 2013;14(1):34.
21. Liu J, Hutchison K, Perrone-Bizzozero N, Morgan M, Sui J, Calhoun V. Identification of genetic and epigenetic marks involved in population structure. *PLoS One*. 2010;5(10):e13209. Epub 2010/10/16.

22. Carmelli D, Reed T. Stability and change in genetic and environmental influences on hand-grip strength in older male twins. *Journal of Applied Physiology*. 2000;89(5):1879-83.
23. Liu XG, Tan LJ, Lei SF, Liu YJ, Shen H, Wang L, et al. Genome-wide association and replication studies identified TRHR as an important gene for lean body mass. *Am J Hum Genet*. 2009;84(3):418-23. Epub 2009/03/10.
24. Windelinckx A, De Mars G, Huygens W, Peeters MW, Vincent B, Wijmenga C, et al. Comprehensive fine mapping of chr12q12-14 and follow-up replication identify activin receptor 1B (ACVR1B) as a muscle strength gene. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011;19(2):208-15. Epub 2010/11/11.
25. Gottlieb M, Carvalho D, Schneider R, Cruz I. Aspectos genéticos do envelhecimento e doenças associadas: uma complexa rede de interações entre genes e ambiente. *Rev Bras Geriatr Gerontol*. 2007;10(3).
26. Song Y, You N, Hsu YH, Howard BV, Langer RD, Manson JAE, et al. FTO polymorphisms are associated with obesity but not diabetes risk in postmenopausal women. *Obesity*. 2008;16(11):2472-80.
27. Wing MR, Ziegler J, Langefeld CD, Ng MCY, Haffner SM, Norris JM, et al. Analysis of FTO gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. *Human genetics*. 2009;125(5):615-26.
28. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nature genetics*. 2008;41(1):18-24.
29. Tan LJ, Liu SL, Lei SF, Papasian CJ, Deng HW. Molecular genetic studies of gene identification for sarcopenia. *Hum Genet*. 2012;131(1):1-31. Epub 2011/06/28.
30. McPherson JD, Marra M, Hillier LD, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. A physical map of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):934-41.
31. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61.
32. Larder R, Cheung M, Tung Y, Yeo GSH, Coll AP. Where to go with FTO? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011;22(2):53-9.
33. de Araújo KL, Madeira KP, Daltoé RD, Rangel LBA, Silva IV. O Papel dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) Pvu II e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs)(TA) no (GT) n do Receptor de Estrogênio Alfa

(ESR1) na Suscetibilidade do Câncer da Mama (BRCA). *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009;55(2):185-92.

34. Organization WH. *Physical Status: the use and interpretation of anthropometry—Report of a WHO Expert Committee*. Geneva; 1995. WHO technical report series.854.

35. Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocrine reviews*. 2006;27(7):750-61.

36. Monteiro CA, Conde WL. A tendência secular da obesidade segundo estratos sociais: Nordeste e Sudeste do Brasil, 1975-1989-1997. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 1999;43(3):186-94.

37. Consultation W. *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. World Health Organization technical report series. 2000(894).

38. Kannel WB, Wilson PWF, D'Agostino RB. Risk stratification of obesity as a coronary risk factor. *The American journal of cardiology*. 2002;90(7):697-701.

39. Tonstad S, Hjermann I. A high risk score for coronary heart disease is associated with the metabolic syndrome in 40-year-old men and women. *European Journal of Cardiovascular Risk*. 2003;10(2):129-35.

40. Ono T, Guthold R, Strong K. *WHO Global comparable estimates*. New York: Global Infobase. 2005.

41. Organization WH. *WHO Global Health Observatory (GHO)*. 2010.

42. WHO. *WHO Global Infobase*. 2013.

43. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2002;288(14):1723-7.

44. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2012;307(5):491-7.

45. Rennie K, Jebb S. Prevalence of obesity in Great Britain. *Obesity Reviews*. 2005;6(1):11-2.

46. Xi B, Liang Y, He T, Reilly K, Hu Y, Wang Q, et al. Secular trends in the prevalence of general and abdominal obesity among Chinese adults, 1993–2009. *Obesity Reviews*. 2012.

47. Cameron AJ, Welborn TA, Zimmet PZ, Dunstan DW, Owen N, Salmon J, et al. Overweight and obesity in Australia: the 1999-2000 Australian diabetes, obesity and lifestyle study (AusDiab). *Medical Journal of Australia*. 2003;178(9):427-32.
48. Pasco JA, Nicholson GC, Brennan SL, Kotowicz MA. Prevalence of Obesity and the Relationship between the Body Mass Index and Body Fat: Cross-Sectional, Population-Based Data. *PLoS One*. 2012;7(1):e29580.
49. Moraes SA, Humberto JSM, Freitas ICM. Estado nutricional e fatores sociodemográficos em adultos residentes em Ribeirão Preto, SP, 2006: projeto OBEDIARP; Nutritional and socioeconomic status in adults living in Ribeirão Preto, SP, 2006: OBEDIARP Project. *Rev bras epidemiol*. 2011;14(4):662-76.
50. Marra C, dos Santos Barbosa F, Sichieri R. Changes of Body Mass Index among Young Men in Brazil over Two Decades. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011;59(2-4):79-83.
51. Gigante DP, de França GVA, Sardinha LMV, Iser BPM, Meléndez GV. Variação temporal na prevalência do excesso de peso e obesidade em adultos: Brasil, 2006 a 2009. *Rev Bras Epidemiol*. 2011;14(1):157-65.
52. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Ministério do Planejamento OeG. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2010. Acesso em 22 de março de 2013. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_e_ncaa/pof_20082009_encaa.pdf. 2010.
53. OLIVEIRA JC, Albuquerque F, Lins IB. Projeção da população do Brasil por sexo e idade para o período 1980-2050—revisão 2004. Rio de Janeiro, IBGE. 2004.
54. Loos RJF, Rankinen T. Gene-diet interactions on body weight changes. *Journal of the American Dietetic Association*. 2005;105(5):29-34.
55. O'Rahilly S, Farooqi I. Human obesity as a heritable disorder of the central control of energy balance. *International Journal of Obesity*. 2008;32:S55-S61.
56. van der Hoeven F, Schimmang T, Volkmann A, Mattei MG, Kyewski B, Ruther U. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development*. 1994;120(9):2601-7.
57. Peters T, Ausmeier K, Ruther U. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mammalian genome*. 1999;10(10):983-6.

58. Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM, et al. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology*. 2008;149(5):2062-71.
59. Gerken T, Girard CA, Tung YCL, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 2007;318(5855):1469-72.
60. Stratigopoulos G, Padilla SL, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, et al. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008;294(4):R1185-R96.
61. Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruukonen A, et al. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes*. 2008;57(5):1419-26.
62. Peeters A, Beckers S, Verrijken A, Roevens P, Peeters P, Van Gaal L, et al. Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;93(4):481-4.
63. Lappalainen TJ, Tolppanen AM, Kolehmainen M, Schwab U, Lindström J, Tuomilehto J, et al. The common variant in the FTO gene did not modify the effect of lifestyle changes on body weight: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Obesity*. 2009;17(4):832-6.
64. Yang J, Loos RJ, Powell JE, Medland SE, Speliotes EK, Chasman DI, et al. FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. *Nature*. 2012.
65. Fox CS, Liu Y, White CC, Feitosa M, Smith AV, Heard-Costa N, et al. Genome-wide association for abdominal subcutaneous and visceral adipose reveals a novel locus for visceral fat in women. *PLoS genetics*. 2012;8(5):e1002695.
66. Kristiansson K, Perola M, Tikkanen E, Kettunen J, Surakka I, Havulinna AS, et al. Genome-Wide Screen for Metabolic Syndrome Susceptibility Loci Reveals Strong Lipid Gene Contribution But No Evidence for Common Genetic Basis for Clustering of Metabolic Syndrome Traits. *CLINICAL PERSPECTIVE. Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2012;5(2):242-9.

67. Okada Y, Kubo M, Ohmiya H, Takahashi A, Kumasaka N, Hosono N, et al. Common variants at CDKAL1 and KLF9 are associated with body mass index in east Asian populations. *Nature genetics*. 2012;44(3):302-6.
68. Kilpeläinen TO, Zillikens MC, Stančáková A, Finucane FM, Ried JS, Langenberg C, et al. Genetic variation near IRS1 associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile. *Nature genetics*. 2011;43(8):753-60.
69. Wang J, Mei H, Chen W, Jiang Y, Sun W, Li F, et al. Study of eight GWAS-identified common variants for association with obesity-related indices in Chinese children at puberty. *International Journal of Obesity*. 2011.
70. Dorajoo R, Blakemore A, Sim X, Ong RT, Ng D, Seielstad M, et al. Replication of 13 obesity loci among Singaporean Chinese, Malay and Asian-Indian populations. *International Journal of Obesity*. 2011.
71. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature genetics*. 2010;42(11):937-48.
72. Scherag A, Dina C, Hinney A, Vatin V, Scherag S, Vogel CI, et al. Two new loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and German study groups. *PLoS genetics*. 2010;6(4):e1000916.
73. Cotsapas C, Speliotes EK, Hatoum IJ, Greenawalt DM, Dobrin R, Lum PY, et al. Common body mass index-associated variants confer risk of extreme obesity. *Human molecular genetics*. 2009;18(18):3502-7.
74. Meyre D, Delplanque J, Chèvre J-C, Lecoœur C, Lobbens S, Gallina S, et al. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nature genetics*. 2009;41(2):157-9.
75. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nature genetics*. 2008;41(1):25-34.
76. Hotta 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. *Journal of human genetics*. 2008;53(6):546-53.
77. Ho AJ, Stein JL, Hua X, Lee S, Hibar DP, Leow AD, et al. A commonly carried allele of the obesity-related FTO gene is associated with reduced brain volume in the

- healthy elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(18):8404.
78. Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V, Klovins J, Gyllensten U, Marcus C, et al. Major gender difference in association of FTO gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;368(3):476-82.
79. Rampersaud E, Mitchell BD, Pollin TI, Fu M, Shen H, O'Connell JR, et al. Physical activity and the association of common FTO gene variants with body mass index and obesity. *Archives of internal medicine*. 2008;168(16):1791.
80. Rodríguez-López R, González-Carpio M, Serrano M, Torres G, García CMT, Herrera T, et al. Association of FTO gene polymorphisms and morbid obesity in the population of Extremadura (Spain)]. *Endocrinología y nutrición: órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*. 2010;57(5):203.
81. Albuquerque D, Nóbrega C, Manco L. Association of FTO Polymorphisms with Obesity and Obesity-Related Outcomes in Portuguese Children. *PLoS One*. 2013;8(1):e54370.
82. Berentzen T, Kring SII, Holst C, Zimmermann E, Jess T, Hansen T, et al. Lack of association of fatness-related FTO gene variants with energy expenditure or physical activity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(7):2904-8.
83. Forbes GB. Adult decline in lean body mass.[sup 40/K tracer technique]. *Hum Biol;(United States)*. 1976;48(1).
84. Gallagher D, Visser M, De Meersman RE, Sepúlveda D, Baumgartner RN, Pierson RN, et al. Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender, and ethnicity. *Journal of Applied Physiology*. 1997;83(1):229-39.
85. Roubenoff R. Origins and clinical relevance of sarcopenia. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 2001;26(1):78-89.
86. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *The Journal of nutrition*. 1997;127(5):990S-1S.
87. de Araujo Silva TA, Junior AF, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(6):391-7.
88. Evans WJ, Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 1995;50(Special Issue):11.

89. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2002;50(5):889-96.
90. Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American journal of epidemiology*. 1998;147(8):755-63.
91. Whipple R, Wolfson L, Amerman P. The relationship of knee and ankle weakness to falls in nursing home residents: an isokinetic study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1987;35(1):13.
92. Bloesch D, Schutz Y, Breitenstein E, Jequier E, Felber J. Thermogenic response to an oral glucose load in man: comparison between young and elderly subjects. *Journal of the American College of Nutrition*. 1988;7(6):471-83.
93. Lima RM, Bezerra L, Rabelo HT, Silva MAF, Silva AJR, Bottaro M, et al. Fat-free mass, strength, and sarcopenia are related to bone mineral density in older women. *Journal of Clinical Densitometry*. 2009;12(1):35-41.
94. Fleg JL, Lakatta EG. Role of muscle loss in the age-associated reduction in VO₂ max. *Journal of Applied Physiology*. 1988;65(3):1147-51.
95. Frontera WR, Hughes VA, Fielding RA, Fiatarone MA, Evans WJ, Roubenoff R. Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *Journal of Applied Physiology*. 2000;88(4):1321-6.
96. Morse CI, Thom JM, Davis MG, Fox KR, Birch KM, Narici MV. Reduced plantarflexor specific torque in the elderly is associated with a lower activation capacity. *European journal of applied physiology*. 2004;92(1):219-26.
97. Basseij EJ, Fiatarone MA, O'Neill EF, Kelly M, Evans WJ, Lipsitz LA. Leg extensor power and functional performance in very old men and women. *Clinical science (London, England: 1979)*. 1992;82(3):321.
98. Baumgartner RN, Wayne SJ, Waters DL, Janssen I, Gallagher D, Morley JE. Sarcopenic Obesity Predicts Instrumental Activities of Daily Living Disability in the Elderly. *Obesity*. 2004;12(12):1995-2004.
99. Rabelo H, Oliveira R, Bottaro M. Effects of resistance training on activities of daily living in older women. *Biology of Sports*. 2004;21:325-36.
100. Dupont-Versteegden EE. Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Experimental gerontology*. 2005;40(6):473-81.

101. Organization WH. Women, Ageing and Health. Achieving health across the lifespan. Retrieved January. 1998;27:2003.
102. Dreyer HC, Volpi E. Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *Journal of the American College of Nutrition*. 2005;24(2):140S-5S.
103. Vandervoort AA. Aging of the human neuromuscular system. *Muscle & nerve*. 2002;25(1):17-25.
104. Hughes VA, Frontera WR, Roubenoff R, Evans WJ, Singh MAF. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(2):473-81.
105. Tiainen K, Sipilä S, Kauppinen M, Kaprio J, Rantanen T. Genetic and environmental effects on isometric muscle strength and leg extensor power followed up for three years among older female twins. *J Appl Physiol*. 2009;106(5):1604-10. Epub 2009/02/21.
106. Seeman E, Hopper JL, Young NR, Formica C, Goss P, Tsalamandris C. Do genetic factors explain associations between muscle strength, lean mass, and bone density? A twin study. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1996;270(2):E320-E7.
107. Roubenoff R, Heymsfield S, Kehayias J, Cannon J, Rosenberg I. Standardization of nomenclature of body composition in weight loss. *The American journal of clinical nutrition*. 1997;66(1):192-6.
108. García SI, Porto PI, Dieuzeide G, Landa MS, Kirszner T, Plotquin Y, et al. Thyrotropin-releasing hormone receptor (TRHR) gene is associated with essential hypertension. *Hypertension*. 2001;38(3):683-7.
109. Ruixing Y, Jinzhen W, Shangling P, Weixiong L, Dezhai Y, Yuming C. Sex differences in environmental and genetic factors for hypertension. *The American journal of medicine*. 2008;121(9):811-9.
110. Zwermann O, Suttman Y, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Reincke M. Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. *European Journal of Endocrinology*. 2009;160(3):443-51.
111. Rankinen T, Roth SM, Bray MS, Loos R, Pérusse L, Wolfarth B, et al. Advances in exercise, fitness, and performance genomics. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2010;42(5):835.

112. Larsson L, Li X, Teresi A, Salviati G. Effects of thyroid hormone on fast-and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. *The Journal of physiology*. 1994;481(Pt 1):149-61.
113. Gáspár E, Hardenbicker C, Bodó E, Wenzel B, Ramot Y, Funk W, et al. Thyrotropin releasing hormone (TRH): a new player in human hair-growth control. *The FASEB Journal*. 2010;24(2):393-403.
114. Su GH, Bansal R, Murphy KM, Montgomery E, Yeo CJ, Hruban RH, et al. ACVR1B (ALK4, activin receptor type 1B) gene mutations in pancreatic carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(6):3254.
115. Huang CW, Chen HY, Yen MH, Chen JJW, Young TH, Cheng JY. Gene Expression of Human Lung Cancer Cell Line CL1–5 in Response to a Direct Current Electric Field. *PLoS One*. 2011;6(10):e25928.
116. Röijer E, Miyazono K, Åström AK, van Kessel AG, Ten Dijke P, Stenman G. Chromosomal localization of three human genes encoding members of the TGF- β superfamily of type I serine/threonine kinase receptors. *Mammalian genome*. 1998;9(3):266-8.
117. Joulia-Ekaza D, Cabello G. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7(3):310-5.
118. Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2008;104(3):579-87.
119. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2003;35(8):1381.
120. Matsudo S, Araújo T, Marsudo V, Andrade D, Andrade E, Braggion G. Questionário internacional de atividade física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil; International physical activity questionnaire (IPAQ): study of validity and reability in Brazil. *Rev bras ativ fís saúde*. 2001;6(2):05-18.
121. Hansen RD, Raja C, Aslani A, Smith RC, Allen BJ. Determination of skeletal muscle and fat-free mass by nuclear and dual-energy X-ray absorptiometry methods in men and women aged 51–84 y. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(2):228-33.
122. Wang Z, Visser M, Ma R, Baumgartner R, Kotler D, Gallagher D, et al. Skeletal muscle mass: evaluation of neutron activation and dual-energy X-ray absorptiometry methods. *Journal of Applied Physiology*. 1996;80(3):824-31.

123. Bottaro M, Russo A, Oliveira R. The effects of rest interval on quadriceps torque during an isokinetic testing protocol in elderly. *Journal of Sports Science and Medicine*. 2005;4(3):285-90.
124. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.
125. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organization technical report series. 2000(894).
126. Morley JE. Sarcopenia: diagnosis and treatment. *The journal of nutrition, health & aging*. 2008;12(7):452-6.
127. Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM, Kenny AM. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2002;57(12):M772-M7.
128. Pongchaiyakul C, Limpawattana P, Kotruchin P, Rajatanavin R. Prevalence of sarcopenia and associated factors among Thai population. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2013:1-5.
129. Wang H, Wang J, Liu M-M, Wang D, Liu Y-Q, Zhao Y, et al. Epidemiology of general obesity, abdominal obesity and related risk factors in urban adults from 33 communities of northeast china: the CHPSNE study. *BMC public health*. 2012;12(1):967.
130. Machado RP, Coelho MSC. Risk of malnutrition among Brazilian institutionalized elderly: A study with the Mini Nutritional Assessment (MNA) questionnaire. *The journal of nutrition, health & aging*. 2011;15(7):532-5.
131. Tonacio A, Trombetta I, Rondon M, Batalha L, Kuniyoshi F, Laterza M, et al. Effects of diet and exercise training on neurovascular control during mental stress in obese women. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2006;39(1):53-62.
132. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(23):9362.
133. Vasan S, Fall T, Job V, Gu H, Ingelsson E, Brismar K, et al. A common variant in the FTO locus is associated with waist-hip ratio in Indian adolescents. *Pediatric obesity*. 2013.

134. Mei H, Chen W, Mills K, He J, Srinivasan SR, Schork N, et al. Influences of FTO gene on onset age of adult overweight. *Human genetics*. 2012;1-9.
135. Ramos RB, Casanova GK, Maturana MA, Spritzer PM. Variations in the fat mass and obesity-associated (FTO) gene are related to glucose levels and higher lipid accumulation product in postmenopausal women from southern Brazil. *Fertility and sterility*. 2011.
136. Ramos AV, Bastos-Rodrigues L, Resende BA, Friedman E, Campanha-Versiani L, Miranda DM, et al. The contribution of FTO and UCP-1 SNPs to extreme obesity, diabetes and cardiovascular risk in Brazilian individuals. *BMC medical genetics*. 2012;13(1):1-9.
137. Jacobsson JA, Almén MS, Benedict C, Hedberg LA, Michaëlsson K, Brooks S, et al. Detailed Analysis of Variants in FTO in Association with Body Composition in a Cohort of 70-Year-Olds Suggests a Weakened Effect among Elderly. *PLoS One*. 2011;6(5):e20158.
138. Jacobsson J, Risérus U, Axelsson T, Lannfelt L, Schiöth H, Fredriksson R. The common FTO variant rs9939609 is not associated with BMI in a longitudinal study on a cohort of Swedish men born 1920-1924. *BMC medical genetics*. 2009;10(1):131.
139. Liu G, Zhu H, Lagou V, Gutin B, Stallmann-Jorgensen IS, Treiber FA, et al. FTO variant rs9939609 is associated with body mass index and waist circumference, but not with energy intake or physical activity in European-and African-American youth. *BMC medical genetics*. 2010;11(1):57.
140. Kitts A, Sherry S. The single nucleotide polymorphism database (dbSNP) of nucleotide sequence variation. *The NCBI handbook*. 2003;5.1-5.30.
141. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends in Genetics*. 2010;26(6):266-74.
142. Lima R, Leite T, Pereira R, Rabelo H, Roth S, Oliveira R. ACE and ACTN3 genotypes in older women: muscular phenotypes. *International journal of sports medicine*. 2011;32(1):66.
143. Hindorff LA, Junkins HA, Mehta J, Manolio T. A catalog of published genome-wide association studies. National Human Genome Research Institute (Available at <http://www.genome.gov/26525384>). 2010.
144. Igarashi-Migitaka J, Yamada S, Hara M, Sano T, Ozawa Y, Ohtani-Kaneko R, et al. Gene expression study of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor using

RT-PCR: relationship to clinical and immunohistochemical phenotypes in a series of human pituitary adenomas. *Endocrine journal*. 2003;50(4):459.

145. De Mars G, Windelinckx A, Huygens W, Peeters MW, Beunen GP, Aerssens J, et al. Genome-wide linkage scan for contraction velocity characteristics of knee musculature in the Leuven Genes for Muscular Strength Study. *Physiological genomics*. 2008;35(1):36-44.

146. Artaza JN, Bhasin S, Magee TR, Reisz-Porszasz S, Shen R, Groome NP, et al. Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T (1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology*. 2005;146(8):3547-57.

147. Feldman BJ, Streeper RS, Farese Jr RV, Yamamoto KR. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(42):15675-80.

148. Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One*. 2009;4(3):e4937.

ANEXO A - Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa**Universidade Católica de Brasília - UCB**
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Brasília, 20 de março de 2007

Ofício CEP/UCB N° 024/2007

Prezado senhor,

É com satisfação que informamos formalmente a V. Sa. que o projeto "Genética e atividade física em idosos brasileiros: estudo de associação e respostas ao exercício entre polimorfismos dos genes VCR, GDF-8, Col1 A1, ACE e a variação nos fenótipos massa e força muscular, controle motor, densidade mineral óssea, respostas hormonais e VO₂ max. proposto por Rinaldo Wellerson, Adriana Cardoso Furtado, Lídia Mara Aguiar Bezerra, Maria Alcione Freitas e Silva, Heloisa Thomaz Rabelo, Tailce Kaley Moura Leite, Ricardo Moreno Lima, Carlos Ernesto Santos Ferreira, Túlio César de Lima Lins, Breno Silva de Abreu, Ana Claudia de Jesus Teixeira, Meiriele Luisa da Silva, Priscila Álvares Lasse e Rodrigo Gomes Vieira, orientados pelo prof. Dr. Ricardo Jacó de Oliveira", foi aprovado por este CEP, em sua 61ª Reunião, realizada em 20 de março do corrente., podendo, portanto, o projeto ter a sua fase de coleta de dados iniciada. Informamos ainda que no prazo máximo de 1 (um) ano a contar desta data deverá ser enviado a este CEP um relatório sucinto sobre o andamento da presente pesquisa.

Informamos ainda que para efeito de utilização em publicações, o referido projeto encontra-se registrado sob o número **CEP/UCB 014/2007**.


Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcelo Silveira de Alcântara". The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the end.

Prof. Marcelo Silveira de Alcântara, M.Sc.
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa - UCB

Ilmo Sr
Ricardo Jacó de Oliveira
Brasília – DF
NESTA

ANEXO B - Carta de aceite do artigo

▶ **Your Submission JAAA-D-12-00837R1** de Journal of the American Aging Association **Aug. 28, 2016** 

Dear Dr. Lundardi:

Congratulations, I am pleased to inform you that your manuscript, "ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN THE TRHR GENE, FAT FREE MASS AND MUSCLE STRENGTH IN OLDER WOMEN," has been accepted for publication in AGE. Both advisors were very impressed with the effort invested in the revision.

Please remember to quote the manuscript number, JAAA-D-12-00837R1, whenever inquiring about your manuscript.

Also let Springer know as soon as possible, by filling out the order form, if you wish to opt for Springer's Open Choice program, which would make your article's online version available with open access. Detailed information about the Springer Open Choice option and an order form can be found at: www.springer.com/openchoice.

If you choose to participate in Open Choice your paper will be freely available with open access, ensuring the widest possible access to your research. Open Choice articles are also clearly indicated so users know about their enhanced access.

If you do not wish your article to be published with open access, no further action is necessary.

Again we greatly appreciate your interest in our journal and look forward to receiving future submissions representing work from your laboratory and those of your collaborators.

With best regards,

Donald K. Ingram, Ph.D.
Editor-in-Chief
AGE

Reviewer #1: The Ms has been significantly improved; as to the main concern (the genetic non homogeneity of the Brazilian population, it has not be solved but certainly it has been seriously addressed and acknowledged.

ANEXO C - Artigo aceito para publicação na revista Journal of the American Aging Association

AUTHOR'S PROOF

JrnllID 11357_ArtID 9526_Proof# 1 - 18/03/2013

AGE

DOI 10.1007/s11357-013-9526-y

13001

Association between polymorphisms in the *TRHR* gene, fat-free mass, and muscle strength in older women

Cláudia C. Lunardi · Ricardo M. Lima ·
Rinaldo W. Pereira · Tailce K. M. Leite ·
Ana B. M. Siqueira · Ricardo J. Oliveira

Received: 16 August 2012 / Accepted: 12 March 2013
© American Aging Association 2013

Abstract A previous genome-wide association study suggested that polymorphisms in the thyrotrophin-releasing hormone receptor (*TRHR*) gene contribute to fat-free mass (FFM) variation. The aim of the present study was to examine the association between polymorphisms in the *TRHR* gene with FFM and muscle strength in older women. Volunteers ($n=241$; age= 66.65 ± 5.5 years) underwent quadriceps strength assessment using isokinetics and fat-free mass by dual-energy X-ray absorptiometry. *TRHR* polymorphisms and ancestry-informative markers were genotyped through standard procedures. No significant difference was observed for rs7832552. Regarding the rs16892496, ANCOVA revealed that appendicular fat-free mass (AFFM) and relative AFFM were significantly different between groups ($p=0.04$ and $p=0.05$, respectively). Individuals carrying A/A and A/C genotypes respectively showed, on

average, an extra 1 kg and 900 g of AFFM when compared to C/C genotype carriers. Also, the C/C genotype group presented a significantly higher chance to have reduced muscle strength. The observations presented here provide further evidence that the rs16892496 polymorphism in the *TRHR* gene may play a role in FFM variation. Moreover, the results bring the novel insight that this genetic variant can present a modest contribution to muscle strength in older women.

Keywords Aging · Sarcopenia · Genetic variation

Introduction

Sarcopenia is described as the loss of skeletal muscle mass and strength related to aging (Forbes 1976; Gallagher et al. 1997; Hughes et al. 2001). This process is associated with negative consequences among the elderly, such as loss of functional capacity and autonomy (Fleg and Lakatta 1988; Baumgartner et al. 1998; Lima et al. 2009), increased risk of falls (Whipple et al. 1987), metabolic impairments (Bloesch et al. 1988), and reduced bone mineral density (Gentil et al. 2007a, b, 2009; Lima et al. 2009). Previous reports provide evidence that sarcopenia has significant health-care cost implications that warrant efforts to understand and counteract this age-related muscle mass and strength decline (Janssen et al. 2004).

The etiology of sarcopenia is not completely known but seems to be influenced by a variety and interrelated

C. C. Lunardi (✉)
College of Physical Education, University of Brasilia,
SMU/QRS/RCG, Rua E, Casa 504,
Brasilia, Distrito Federal, Brazil
e-mail: claudia_lunardi@yahoo.com.br

R. W. Pereira · T. K. M. Leite · A. B. M. Siqueira
College of Physical Education,
Catholic University of Brasilia,
Brasilia, Brazil

R. M. Lima · R. J. Oliveira
College of Physical Education, University of Brasilia,
SQN 212, Bloco G, Apto 206,
Brasilia, Distrito Federal, Brazil

56	factors. It is well established that heritability significantly	(rs16892496 and rs7832552) and muscle strength and	105
57	contributes to the interindividual variability of muscle	FFM phenotypes in a sample of Brazilian elderly wom-	106
58	mass and strength (Arden and Spector 1997; Tiainen et	en. Aware of the high admixture in Brazilians and of its	107
59	al. 2009) and to the decrease of strength due to aging	potential complications when performing association	108
60	(Carmelli and Reed 2000). Previous studies provide	studies in such population (Lins et al. 2011), 19	109
61	evidence that genetic factors are responsible for about	ancestry-informative single-nucleotide polymorphisms	110
62	60–80 % of the interindividuals variation in fat-free mass	were genotyped, and the estimated genetic ancestry	111
63	(Soeman et al. 1996). However, although the heritability	values were included as covariates during the analysis.	112
64	of muscle-related phenotypes is well documented in the		
65	literature, the identification of genes and polymorphisms		
66	associated with these phenotypes requires further stud-		
67	ies. A reasonable number of allelic variants have been		
68	studied, but lack of consistency on replicating the find-		
69	ings makes the identification of genes with significant		
70	contribution still unclear. Detection of significant con-		
71	tributor's genetic variants may assist in improving the life		
72	quality of seniors, enabling to target preventive practices		
73	best suited to each individual, reducing the risk of devel-		
74	oping dependence and related complications. The advent		
75	of biotechnology and reduced costs of genotyping have		
76	made genome-wide association studies (GWAS) an im-		
77	portant tool in the search for candidate genes.		
78	Regarding muscle-related phenotypes, few GWAS		
79	have been conducted, and few candidate genes have		
80	been identified. De Mars et al. (2008) sought to iden-		
81	tify chromosomal regions linked to muscle area and		
82	bone cross-sectional, knee flexors, and extensors iso-		
83	metric torque in twins. The authors concluded that		
84	many genes still have little explanation for muscle		
85	strength determination (De Mars et al. 2008). Liu et		
86	al. (2009) studied the association of the thyrotrophin-		
87	releasing hormone receptor (<i>TRHR</i>) gene and fat-free		
88	mass (FFM) in 1,000 individuals. The authors reported		
89	that the polymorphisms rs16892496 (GG) and		
90	rs7832552 (TT) in the <i>TRHR</i> gene are associated with		
91	FFM and replicated these findings in three independent		
92	samples. According to the authors, subjects with these		
93	genotypes have, on average, 2.70 and 2.55 kg less FFM,		
94	respectively, when compared to those with other geno-		
95	types. However, it was not in the scope of the report to		
96	examine the association with muscle strength.		
97	Studies conducted in different populations are		
98	needed to better understand the influence of the		
99	<i>TRHR</i> gene on muscle phenotypes. Accordingly, this		
100	study sought to examine candidate genes previously		
101	identified through GWAS against muscle phenotypes.		
102	Specifically, the objective was to replicate the results		
103	of previous studies, to verify whether there is an		
104	association between polymorphisms in the <i>TRHR</i> gene		
		Methodology	113
		Subjects	114
		After applying the exclusion criteria, this study includ-	115
		ed 241 women aged between 60 to 82 years and	116
		participants in a voluntary project developed at the	117
		university. The following were excluded from the	118
		study participants: those who (a) did not have	119
		Brazilian nationality, (b) were not able to walk inde-	120
		pendently, (c) had unilateral or bilateral hip prosthetic,	121
		(d) had a prosthetic heart valve, (e) were smokers, (f)	122
		had endocrine or metabolic disorder known to affect	123
		the muscular system, and (g) had abnormal cardiac	124
		conduction or infarction that would contraindicate the	125
		practice of physical activities. To take part in the study,	126
		volunteers signed a written consent. The study was	127
		approved by the Research Ethics Committee of the	128
		university (CEP/LCB 014/2007).	129
		The official Portuguese long version of the	130
		International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)	131
		was used to determine the physical activity level of	132
		each volunteer. The questionnaire was performed in	133
		face-to-face interviews as recommended. The IPAQ was	134
		developed by investigators from various countries with	135
		the support of the World Health Organization. It has	136
		been reported as an instrument with acceptable measure-	137
		ment properties in various countries (Craig et al. 2003).	138
		Assessment of body composition	139
		Body composition measurements were conducted using	140
		dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (DPX-L,	141
		Lunar Radiation Corporation, Madison, WI). All mea-	142
		surements were carried out by the same trained techni-	143
		cian according to the procedures previously described	144
		(Lima et al. 2007). Besides total FFM (TFFM) and fat	145
		mass, computer-generated lines with subsequent manual	146
		adjustment enabled specification of FFM for the arms,	147

AUTHOR'S PROOF

JrnID 11357_ArtID 9526_Proof# 1 - 19/03/2013

AGE		
148	legs, and trunk. Appendicular FFM (AFFM) was calculated as the sum of both arms and legs FFM. In addition to the use of absolute TFFM and AFFM, these variables were considered relative to body height squared (in kilogram per square meter) (Baumgartner et al. 1998). Coefficients of variation observed for the DXA were 2.1 and 1.9 % for fat mass and FFM, respectively.	193
149		194
150		195
151		196
152		197
153		198
154		199
155	Isokinetic muscle peak torque	200
156	Quadriceps strength was measured using the Biodex System 3 isokinetic dynamometer (Biodex Medical Systems, New York, USA). Before each test, participants underwent 5 min of warm-up in a cycle ergometer with low load and comfortable speed. After a detailed explanation of the evaluation procedures, volunteers were carefully positioned on the seat of the equipment. The rotation axis from the dynamometer arm was aligned with the dominant femoral epicondyle. The force application point was positioned 2 cm above the medial malleolus. Fastened Velcro belts were used on the trunk, pelvis, and thigh to avoid compensatory movements. The protocol consisted of three sets of four concentric muscle contractions (60°/s) with 30-s rest intervals between sets (Bottaro et al. 2005). The recorded value for analysis was the highest peak torque (PT) of the three series, which was expressed in absolute values (in normal meter) and relative to body mass (in normal meter per kilogram). Participants were asked to perform the contractions with the greatest possible force, and verbal encouragement was offered during the measurement. The calibration of the equipment was performed according to manufacturer's specifications at the beginning of the evaluation sessions, and the same evaluator carried out the procedures.	201
157		202
158		203
159		204
160		205
161		206
162		207
163		208
164		209
165		210
166		211
167		212
168		213
169		214
170		215
171		216
172		217
173		218
174		219
175		220
176		221
177		222
178		223
179		224
180		225
181		226
182	Genotyping	227
183	Blood samples from all participants were collected in the antecubital vein, and genomic DNA of high molecular weight was extracted from peripheral leukocytes by the "salting out" method (Miller et al. 1988).	228
184		229
185		230
186		231
187	Genotyping of the rs16892496 (A/C) and rs7832552 (A/C) SNPs was performed using a multiplex PCR (Qiagen® Multiplex PCR kit), followed by purification with <i>exonuclease I</i> and <i>shrimp alkaline phosphatase</i> , and single-base extension method (ABI Prism® SNaPshot® Multiplex kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) followed by purification with shrimp alkaline phosphatase. An aliquot of this purified product, prepared with a molecular size standard (GS120 Liz, Applied Biosystems) and highly deionized formamide, was denatured at 95 °C to the subsequent capillary electrophoresis (ABI 3130xl, Applied Biosystems). The electropherograms were analyzed using the GeneMapper™ 4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotyping of 19 ancestry-informative markers was performed under the same conditions described above.	232
188		233
189		234
190		235
191		236
192		237
	Genetic ancestry evaluation	204
	To estimate genomic ancestry, 19 ancestry-informative markers were genotyped for all the samples, and individual ancestry in each parental population was estimated using the software ADMIXMAP (http://homepages.ed.ac.uk/pmckeigu/admixmap/), with 2,500 iterations for the burn-in period and 10,000 iterations to measure parameter data.	205
		206
		207
		208
		209
		210
		211
	Statistical analysis	212
	Normality of data distribution was examined using the Kolmogorov–Smirnov test. Data are presented using descriptive statistics, with mean and standard deviations procedures (unless otherwise noted). To verify if the allelic frequencies were in accordance with the Hardy–Weinberg equilibrium, the chi-square test was used. Analysis of variance (ANOVA) was applied to test for differences between genotypes in the following variables: age, weight, height, BMI, and fat percentage. To verify differences between genotypes for noncontinuous variables such as the prevalence of sarcopenia, calcium supplementation, use of hormone replacement therapy, and physical activity level, the chi-square test was conducted. To test the association between genotypes and muscle-related phenotypes, analysis of covariance models was performed with LSD post hoc covariates which included years of menopause, hormone replacement, calcium supplementation, and physical activity levels. The inclusion of individual African genomic ancestry was also used as covariate as an attempt to correct for population stratification. Mantel–Haenszel common odds ratio analysis was used to investigate the association between outcomes (phenotypes) and risks (genotype), adjusted for age and genomic ancestry. To reach this end, muscle phenotypes variables were	213
		214
		215
		216
		217
		218
		219
		220
		221
		222
		223
		224
		225
		226
		227
		228
		229
		230
		231
		232
		233
		234
		235
		236
		237

238 divided into quartiles, where Q1 was the lower quartile,
 239 and Q4, the highest. The significance level was $p \leq 0.05$,
 240 and data were analyzed using SPSS 13.0 for Windows.

241 Results

242 The descriptive data of the sample such as age, weight,
 243 height, BMI, years since menopause, peak torque, and
 244 body composition are shown in Table 1. According to
 245 the approach proposed by Baumgartner et al. (1998),
 246 17.3 % of subjects were classified as sarcopenic. In
 247 relation to hormone replacement therapy and calcium
 248 supplements, 19 (7.9 %) and 56 (23.7 %) women were
 249 using both, respectively. Physical activity levels were
 250 as follows: 5 (2.1 %) were sedentary, 69 (28.6 %) were
 251 insufficiently active, 163 (67.6 %) were active, and 4
 252 (1.7 %) were very active.

253 The genotype distribution of the *TRHR* gene
 254 (rs16892496 and rs7832552) was consistent with
 255 Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). No significant
 256 difference was observed for rs7832552, and thus, the
 257 results are all related to the rs16892496. The prevalence
 258 of sarcopenia was 27.6, 17.8, and 13.3 %, respectively,
 259 for genotypes C/C, A/C, and A/A; however, the chi-
 260 square test did not reveal significant differences.
 261 Furthermore, ANOVA revealed no significant differ-
 262 ence for weight, height, or BMI; however, age was

263 significantly higher for those with genotype C/C and,
 264 therefore, was used as covariate in subsequent analyses
 265 along with African genomic ancestry. The results of
 266 body composition and muscle-related phenotypes
 267 (i.e., FFM and strength) according to the rs16892496
 268 genotypes are shown in Table 2. No significant differ-
 269 ences were observed for BMI or body fat percentage.
 ANOVA revealed that AFFM and PT were significantly
 270 different between groups, with lower values of AFFM in
 271 subjects carrying C/C genotype. However, when age
 272 and genomic ancestry were entered as covariates, the
 273 results did not reach a statistical significance, but only a
 274 trend (p values ranging from 0.07 to 0.15; Table 2).
 275 When genotype C/C was compared to the group com-
 276 posed by A allele carriers (i.e., A/A+A/C), significant
 277 differences were observed for AFFM and relative
 278 AFFM with lower values for the C/C genotype (after
 279 adjustment for age and African genomic ancestry).

281 Appendicular FFM relative to height squared and PT
 282 relative to body weight were divided into quartiles, and
 283 the odds ratio in relation to genotype groups are
 284 presented in Table 3. It was observed that the C/C
 285 genotype group presented a significantly higher chance
 286 to be classified in the lower quartile of AFFM when
 287 compared to both A/A genotypes. Regarding PT relative
 288 to body weight, the C/C genotype presented a threefold
 289 increase in the chance to be classified in the lower
 290 quartile when compared to the A/A genotype.

t1.1 **Table 1** Characteristics of participants. Values are expressed as
 mean \pm standard deviation

t1.2	Variables	
t1.3	<i>N</i>	241
t1.4	Age (year)	66.6 \pm 5.5
t1.5	Body mass (kg)	65.8 \pm 11.9
t1.6	Height (m)	1.53 \pm 0.1
t1.7	Years of menopause	18.0 \pm 7.5
t1.8	BMI (kg/m ²)	28.0 \pm 4.5
t1.9	Percentage of fat (%)	39.5 \pm 5.9
t1.10	TFFM (kg)	37.9 \pm 4.9
t1.11	Relative TFFM (kg/m ²)	16.1 \pm 1.7
t1.12	AFFM (kg)	14.6 \pm 2.3
t1.13	Relative AFFM (kg/m ²)	6.2 \pm 0.8
t1.14	PT (Nm)	85.1 \pm 22.8
t1.15	Relative PT (Nm/kg)	145.9 \pm 31.2

t1.16 *BMI* body mass index, *AFFM* appendicular fat-free mass, *TFFM*
 total fat-free mass, *PT* peak torque

Discussion

291 Based on previous GWAS showing an association
 292 between the rs16892496 and rs7832552 and FFM in
 293 different populations with a wide age range, the pres-
 294 ent study was designed to examine its association in
 295 older women not only with FFM but also with muscle
 296 strength. Muscle mass and strength decline with adv-
 297 ancing age (Goodpaster et al. 2008), and this process
 298 is associated with negative clinical outcomes in the
 299 elderly (Baumgartner et al. 1998; Lima et al. 2009).
 300 Therefore, it is of particular interest to examine the
 301 association of gene polymorphisms and muscular phe-
 302 notypes in the elderly. The main findings of the pres-
 303 ent study provide further evidence of an association
 304 between the *TRHR* rs16892496 polymorphism and
 305 FFM. Moreover, the results bring the insight that this
 306 genetic variant can present a contribution to muscle
 307 strength in older women. Of note, these observations

AUTHOR'S PROOF

JrnIID 11357_ArtID 9526_Proof# 1 - 19/03/2013

AGE

Table 2 Body composition and muscle phenotypes according to the genotypes of rs16892496. Data are presented as age- and African genomic ancestry-adjusted mean \pm standard error

Variables	C/C	A/C	A/A	<i>p</i> values	C/C	A/C+A/A	<i>p</i> values
N (%)	29 (12)	129 (53.5)	83 (34.5)		29 (12)	212 (88.0)	
Age (year) ^a	69.2 \pm 6.23*	66.4 \pm 5.25	66.1 \pm 5.53	0.03	69.2 \pm 6.2*	66.3 \pm 5.35	0.01
BMI (kg/m ²)	27.2 \pm 0.85	28.1 \pm 0.40	28.1 \pm 0.50	0.63	27.2 \pm 0.85	28.1 \pm 0.31	0.33
Percentage of fat (%)	38.4 \pm 1.11	39.6 \pm 0.52	39.5 \pm 0.65	0.62	38.4 \pm 1.11	39.5 \pm 0.41	0.33
AFFM (kg)	13.7 \pm 0.43	14.6 \pm 0.20	14.7 \pm 0.25	0.13	13.7 \pm 0.43	14.7 \pm 0.16	0.04
Relative AFFM (kg/m ²)	5.9 \pm 0.15	6.2 \pm 0.07	6.2 \pm 0.09	0.14	5.9 \pm 0.15	6.2 \pm 0.06	0.05
TFFM (kg)	36.9 \pm 0.91	37.9 \pm 0.43	38.4 \pm 0.53	0.40	36.9 \pm 0.91	38.1 \pm 0.33	0.24
Relative TFFM (kg/m ²)	15.9 \pm 0.32	16.1 \pm 0.15	16.3 \pm 0.19	0.59	15.9 \pm 0.32	16.2 \pm 0.12	0.42
PT (Nm)	90.0 \pm 4.02	93.4 \pm 1.89	99.2 \pm 2.35	0.07	90.0 \pm 4.02	95.7 \pm 1.48	0.20
Relative PT (Nm/kg)	143.6 \pm 5.64	143.0 \pm 2.65	151.1 \pm 3.30	0.15	143.6 \pm 5.64	146.2 \pm 2.08	0.67

BMI body mass index, AFFM appendicular fat-free mass, TFFM total fat-free mass, PT peak torque

**p*<0.05, significantly different compared with other genotypes; **p*<0.05, significantly different compared to genotype A/A

^aValues are presented as mean and standard deviation

remained significantly after adjustment for genomic African ancestry.

A variety of previous reports had shown association between a reasonable number of candidate gene polymorphisms and muscle-related phenotypes, but with little agreement on significant contributors (Rankinen et al. 2010; Lima et al. 2011; Tan et al. 2012). GWAS has become an important tool for better understanding the association between phenotypes and genotypes. Exercise scientists need to prioritize high-quality research designs, and replication studies with large sample sizes are urgently needed (Rankinen et al. 2010). Liu et al. (2009) published the first GWAS focusing on skeletal muscular traits, specifically FFM. Although muscle strength was not assessed in their investigation, the authors identified that rs16892496 and rs7832552 polymorphisms in the

TRHR gene were associated with FFM (by dual-energy X-ray absorptiometry) in a study of 9,350,000 SNPs examined in nearly 1,000 unrelated US whites. Moreover, these authors replicated the significant associations in three independent samples. Taken together with the present results, these observations suggest that the *TRHR* gene might be an important candidate for interindividual differences in muscular phenotypes.

This replication study in a sample of Brazilian elderly suggests a modest association between rs16892496 and FFM. Individuals carrying the C/C genotype presented a higher chance for low values of AFFM when compared to homozygous A/A. Individuals A/A and A/C, on average, respectively showed an extra 1 kg and 900 g of AFFM compared to C/C genotype carriers. Furthermore, we observed a trend for the difference between genotypes for isokinetic peak torque. It was observed that the C allele carriers were more likely to be classified in the lower quartile of muscle strength. However, the differences observed in the present study were modest when considering the high heritability of muscle-related phenotypes (Liu et al. 2009; De Mars et al. 2008). Probably, many genes with small contributions, rather than few genes with strong influence, are expected to determine the interindividual differences of such traits (Thompson et al. 2004; De Mars et al. 2008; Pescatello et al. 2006). Thus, the present study provides evidence that the studied polymorphism (rs16892496) in the *TRHR* gene is one genetic variant

Table 3 Odds ratio/association adjusted for age and ancestry between phenotype and genotype

Phenotype	Genotype	OR (95 % CI)
Low relative AFFM (<5.7 kg)	A/A	1.00
	A/C+C/C	2.24 (1.12–4.49)
	C/C	3.95 (1.41–11.11)
Low relative PT (<126.7 Nm/kg)	A/A	1.00
	A/C	2.68 (1.18–6.10)
	A/C+C/C	2.71 (1.63–5.8)
	C/C	3.09 (1.11–8.58)

AFFM appendicular fat-free mass, PT peak torque

355 that contributes to FFM and muscle strength in cross-
 356 sectional analyses, though its clinical relevance remains
 357 to be investigated.

358 In fact, heritability of a variety of complex pheno-
 359 types is well documented in the literature (Thompson
 360 et al. 2004; Tainen et al. 2009; Tan et al. 2012);
 361 however, the contributory genes remain unclear.
 362 Understanding the relationship between genotypes
 363 and muscular phenotypes in the elderly might contrib-
 364 ute to assist in an early intervention and allow preven-
 365 tive practices best suited to each individual, thus
 366 ultimately improving life quality in this population.
 367 Identification of significant genetic variants underly-
 368 ing sarcopenia will provide valuable insights into im-
 369 portant potential targets for risk stratification, as well
 370 as pharmacogenetic interventions aimed at increasing
 371 muscle mass and strength. Few genes have been iden-
 372 tified to date, but lack of replication does not enable
 373 unequivocal conclusions (Tan et al. 2012).

374 The *TRHR* gene encodes the thyrotrophin-releasing
 375 hormone receptor. Because of the functional importance
 376 of thyroid hormone in skeletal muscle development, the
 377 *TRHR* gene is thus recognized as an important candidate
 378 gene for future investigations, with potential conse-
 379 quences for the correlated traits of muscle strength and
 380 power (Rankinen et al. 2010). Thyrotrophin-releasing
 381 hormone is a small neuropeptide widely distributed
 382 throughout the central nervous system and peripheral
 383 tissues, as well as in the extraneural tissues. This hor-
 384 mone exerts its effect by binding to *TRHR* (located in
 385 the region 8q.23.1) on the surface, thyrotrophic pituitary
 386 cells. The main consequence of this connection is the
 387 stimulation of secretion of thyroid-stimulating hormone.
 388 In response, the thyroid-stimulating hormone stimulates
 389 the release of thyroxine, which is important in develop-
 390 ing skeletal muscle of vertebrates (Larsson et al. 1994;
 391 Gáspár et al. 2010). The study by Liu et al. (2009) is
 392 pointed by the catalog of the National Human Genome
 393 Research Institute (Hindorf et al. 2010) as the only
 394 work that found the association of *TRHR* gene and body
 395 mass (lean). Until then, studies with this gene were
 396 associated with other outcomes such as pituitary adeno-
 397 ma (Igarashi-Migitaka et al. 2003) and hypertension
 398 (García et al. 2001; Ruixing et al. 2008).

399 In summary, the observations presented here provide
 400 further evidence that the rs16892496 polymorphism in
 401 the *TRHR* gene may play a role in FFM variation.
 402 Moreover, the results bring the novel insight that this
 403 genetic variant can present a contribution to muscle

strength in older women. These results remained
 unchanged with the inclusion of genomic ancestry as a
 measure to correct for population stratification.
 Determination of genetic variants associated with mus-
 cular phenotypes in the elderly may be useful in identi-
 fying individuals who are more susceptible to lose
 muscle mass and strength with advancing age. For in-
 stance, however, it seems that the adoption of preventive
 habits such as regular physical activity practice is the
 intervention of choice for all individuals, independent of
 their genetic background.

Acknowledgments We thank the participants of the study.
 Funding was provided by a grant 193.000.555/2009 from the
 Research Support Foundation of the Federal District (FAP-DF)
 and by a grant from the National Council for Scientific and
 Technological Development (CNPq).

References

- Arden N, Spector T (1997) Genetic influences on muscle
 strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin
 study. *J Bone and Mineral Res* 12(12):2076–2081
- Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L,
 Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ, Lindeman RD
 (1998) Epidemiology of sarcopenia among the elderly in
 New Mexico. *Am J Epidemiol* 147(8):755–763
- Blaesch D, Schutz Y, Breitenstein E, Jequier E, Felber J (1988)
 Thermogenic response to an oral glucose load in man:
 comparison between young and elderly subjects. *J Am
 College of Nutr* 7(6):471–483
- Bottaro M, Russo A, Oliveira R (2005) The effects of rest
 interval on quadriceps torque during an isokinetic testing
 protocol in elderly. *J Sports Sci and Med* 4(3):285–290
- Carmelli D, Reed T (2000) Stability and change in genetic and
 environmental influences on hand-grip strength in older
 male twins. *J Appl Physiol* 89(5):1879–1883
- Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML,
 Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF (2003)
 International physical activity questionnaire: 12-country reli-
 ability and validity. *Med Sci in Sports Exercise* 35(8):1381
- De Mars G, Windelincx A, Huygens W, Peeters MW, Beunen
 GP, Aerssens J, Vlietinck R, Thomas MAJ (2008) Genome-
 wide linkage scan for contraction velocity characteristics of
 knee musculature in the Leuven Genes for Muscular
 Strength Study. *Physiol Genomics* 35(1):36–44
- Fleg JL, Lakatta EG (1988) Role of muscle loss in the age-
 associated reduction in $\dot{V}O_2$ max. *J Appl Physiol* 65
 (3):1147–1151
- Forbes GB (1976) Adult decline in lean body mass. [sup 40K
 tracer technique]. *Hum Biol (United States)* 48 (1)
- Gallagher D, Visser M, De Meersman RE, Sepúlveda D,
 Baumgartner RN, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB
 (1997) Appendicular skeletal muscle mass: effects of age,
 gender, and ethnicity. *J Appl Physiol* 83(1):229–239

AUTHOR'S PROOF

JmJlID 11357_ArtID 9526_Proof# 1 - 19/03/2013

AGE

- 459 Garcia SI, Porto PI, Dieuzeide G, Landa MS, Kirszner T,
460 Plotquin Y, Gonzalez C, Pirola CJ (2001) Thyrotropin-
461 releasing hormone receptor (TRHR) gene is associated
462 with essential hypertension. *Hypertension* 38(3):683–687
- 463 Gáspár E, Hardenbicker C, Bodó E, Wenzel B, Ramot Y, Funk
464 W, Kromminga A, Paus R (2010) Thyrotropin releasing
465 hormone (TRH): a new player in human hair-growth con-
466 trol. *FASEB J* 24(2):393–403
- 467 Gentil P, de Lima LTC, Lima RM, De Abreu BS, Grattapaglia
468 D, Bottaro M, De Oliveira RJ, Pereira RW (2009) Vitamin-
469 D-receptor genotypes and bone-mineral density in post-
470 menopausal women: interaction with physical activity. *J*
471 *Aging and Phys Act* 17(1):31
- 472 Gentil P, Lima R, Lins T, Abreu B, Pereira R, Oliveira R (2007a)
473 Physical activity, Cdx-2 genotype, and BMD. *Int J Sports*
474 *Med* 28(12):1065
- 475 Gentil P, Lima RM, Jacó de Oliveira R, Pereira RW, Reis VM
476 (2007b) Association between femoral neck bone mineral
477 density and lower limb fat-free mass in postmenopausal
478 women. *J Clin Densitom* 10(2):174–178
- 479 Goodpaster BH, Chomentowski P, Ward BK, Rossi A, Glynn
480 NW, Delmonico MJ, Kritchevsky SB, Pahor M, Newman
481 AB (2008) Effects of physical activity on strength and
482 skeletal muscle fat infiltration in older adults: a randomized
483 controlled trial. *J Appl Physiol* 105(5):1498–1503
- 484 Hindorf LA, Junkins HA, Mehta J, Manolio T (2010) A catalog
485 of published genome-wide association studies. National
486 Human Genome Research Institute (Available at <http://www.genome.gov/gwastudies>)
- 487 Hughes VA, Frontera WR, Wood M, Evans WJ, Dallal GE,
488 Roubenoff R, Singh MAF (2001) Longitudinal muscle
489 strength changes in older adults. *J Gerontology Series A: Biol Sci and Med Sci* 56(5):B209–B217
- 490 Igarashi-Migitaka J, Yamada S, Hara M, Sano T, Ozawa Y, Ohtani-
491 Kaneko R, Hirata K (2003) Gene expression study of thyro-
492 tropin releasing hormone (TRH) receptor using RT-PCR:
493 relationship to clinical and immunohistochemical phenotypes
494 in a series of human pituitary adenomas. *Endocr J* 50(4):459
- 495 Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R (2004)
496 The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* 52(1):80–85
- 497 Larsson L, Li X, Teresi A, Salvati G (1994) Effects of thyroid
498 hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in
499 young and old rats. *J Physiol* 481(Pt 1):149–161
- 500 Lima R, Leite T, Pereira R, Rabelo H, Roth S, Oliveira R (2011)
501 ACE and ACTN3 genotypes in older women: muscular
502 phenotypes. *Int J Sports Med* 32(1):66
- 503 Lima RM, Bezerra L, Rabelo HT, Silva MAF, Silva AJR,
504 Bottaro M, De Oliveira RJ (2009) Fat-free mass, strength,
505 and sarcopenia are related to bone mineral density in older
506 women. *J Clin Densitom* 12(1):35–41
- 507 Lima RM, De Abreu BS, Gentil P, de Lima Lins TC, Grattapaglia
508 D, Pereira RW, De Oliveira RJ (2007) Lack of association
509 between vitamin D receptor genotypes and haplotypes with
510 fat-free mass in postmenopausal Brazilian women. *J Gerontology Series A: Biol Sci and Med Sci* 62(9):966–972
- 511 Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R,
512 Oliveira RJ, Pereira RW (2011) Genetic heterogeneity of
513 self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian pop-
514 ulation. *J Epidemiol* 21(4):240–245
- 515 Liu XG, Tan LJ, Lei SF, Liu YJ, Shen H, Wang L, Yan H, Guo
516 YF, Xiong DH, Chen XD, Pan F, Yang TL, Zhang YP, Guo
517 Y, Tang NL, Zhu XZ, Deng HY, Levy S, Recker RR,
518 Papanicolaou CJ, Deng HW (2009) Genome-wide association
519 and replication studies identified TRHR as an important
520 gene for lean body mass. *Am J Hum Genet* 84(3):418–423.
521 doi:10.1016/j.ajhg.2009.02.004
- 522 Miller S, Dykes D, Polesky H (1988) A simple salting out
523 procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
524 *Nucleic Acids Res* 16(3):1215
- 525 Pescatello LS, Kostek MA, Gondish-Dressman H, Thompson
526 PD, Seip RL, Price TB, Angelopoulos TJ, Clarkson PM,
527 Gordon PM, Moyna NM (2006) ACE1D genotype and the
528 muscle strength and size response to unilateral resistance
529 training. *Med Sci in Sports Exercise* 38(6):1074
- 530 Rankinen T, Roth SM, Bray MS, Loos R, Pérusse L, Wolfarth
531 B, Hagberg JM, Bouchard C (2010) Advances in exercise,
532 fitness, and performance genomics. *Med Sci in Sports Exercise* 42(5):835
- 533 Ruixing Y, Jinchun W, Shangping P, Weixiong L, Dezhai Y,
534 Yuming C (2008) Sex differences in environmental and
535 genetic factors for hypertension. *Am J Med* 121(9):811–819
- 536 Seeman E, Hopper JL, Young NR, Formica C, Goss P,
537 Tsalamandris C (1996) Do genetic factors explain associations
538 between muscle strength, lean mass, and bone density? A twin
539 study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270(2):E320–E327
- 540 Tan LJ, Liu SL, Lei SF, Papanicolaou CJ, Deng HW (2012) Molec-
541 ular genetic studies of gene identification for sarcopenia.
542 *Hum Genet* 131(1):1–31. doi:10.1007/s00439-011-1040-7
- 543 Thompson PD, Moyna N, Seip R, Price T, Clarkson P,
544 Angelopoulos T, Gordon P, Pescatello L, Visich P, Zoeller
545 R (2004) Functional polymorphisms associated with human
546 muscle size and strength. *Med Sci in Sports Exercise* 36
547 (7):1132
- 548 Taiminen K, Sipilä S, Kauppinen M, Kaprio J, Rantanen T (2009)
549 Genetic and environmental effects on isometric muscle
550 strength and leg extensor power followed up for three years
551 among older female twins. *J Appl Physiol* 106(5):1604–
552 1610. doi:10.1152/jappphysiol.91056.2008
- 553 Whipple R, Wolfson L, Amerman P (1987) The relationship of
554 knee and ankle weakness to falls in nursing home residents:
555 an isokinetic study. *J Am Geriatr Soc* 35(1):13

ANEXO D - Artigo submetido à revista Arquivos Brasileiro de Metabologia e Endocrinologia

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE FTO E COMPOSIÇÃO CORPORAL EM IDOSAS BRASILEIRAS

ASSOCIATION STUDY BETWEEN FTO GENE VARIATIONS AND BODY COMPOSITION IN OLDER BRAZILIAN WOMEN

Cláudia C. Lunardi¹, Rinaldo W. Pereira², Tailce K.M. Leite², Ana B. M. Siqueira², Ricardo M. Lima¹, Ricardo J. Oliveira¹

¹ Faculdade de Educação Física, Universidade de Brasília, Brasil; ² Faculdade de Educação Física, Universidade Católica de Brasília, Brasil

Autor principal: Cláudia Cruz Lunardi

Endereço: SMU/QRS/QCG rua E casa 504. Setor militar complementar, Brasília – DF

Email: claudia_lunardi@yahoo.com.br

Título abreviado: GENE *FTO* E COMPOSIÇÃO CORPORAL

RESUMO

Objetivo: Examinar a associação entre os polimorfismos no gene FTO (rs9939609 e rs1861868) e fenótipos de adiposidade em uma amostra de idosas brasileiras

Métodos: A amostra foi composta por 241 mulheres (66,65±5,5 anos) recrutadas de um projeto desenvolvido na Universidade. Os dados referentes à composição corporal foram mensurados através da absorptometria por raios-x de dupla energia (DXA) e a genotipagem dos SNPs foi realizada utilizando o sistema SnaPSHOT Multiplex System (Applied Biosystems).

Resultados: Não foi observado diferença estatística significativa para Índice de Massa Corporal ($p=0.99$), Massa Gorda ($p=0.67$), Percentual de Gordura ($p=0.28$) e Massa Livre de Gordura ($p=0.30$) entre os genótipos nos polimorfismos estudados.

Conclusões: Nesta amostra de idosas brasileiras os polimorfismos do gene FTO (rs9939609 e rs1861868) não mostraram associação a fenótipos de obesidade (sobrepeso, obesidade, percentual de gordura e massa gorda).

Descritores: gene, obesidade, idoso, variação genética, densitometria, IMC

ABSTRACT

Objective: Examine the association of polymorphisms in the FTO gene (rs9939609 and rs1861868) with obesity phenotypes in a sample of Brazilian elderly women

Methods: The sample included 241 older women project's volunteer developed at the University. Data concerning body composition were measured by dual energy X-ray absorptiome (DXA) and genotyping of SNPs was carried out using the system snapshot Multiplex System (Applied Biosystems).

Results: The elderly showed age, body mass and body mass index average of 66, 65, 65.81 kg and 27.99 kg/m², respectively. There was no significantly different between genotypes the polymorphisms studied.

Conclusions: In this sample of elderly Brazilian, the FTO gene polymorphisms (rs9939609 and rs1861868) showed no association with phenotypes of obesity (overweight, obesity, body fat percentage and fat mass).

Keywords: gene, obesity, genetic variation, aged, densitometry, BMI,

INTRODUÇÃO

O excesso de gordura corporal constitui um problema de saúde pública, sendo associado a condições negativas como dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos, distúrbios do aparelho locomotor, alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e diabetes (1-3). A prevalência da obesidade vem aumentando nas últimas décadas (4-8), tornando-se particularmente preocupante no envelhecimento, devido a perda progressiva da massa magra concomitante ao aumento da proporção de gordura corpórea (9). Os estudos epidemiológicos sobre o estado nutricional em idosos indicam que os distúrbios nutricionais estão associados com aumentado risco de morbidade e de mortalidade (3, 10). Desta forma, atenção deve ser demandada nesse sentido uma vez que o número de idosos vem aumentando progressivamente.

A obesidade apresenta etiologia multifatorial, envolvendo fatores nutricionais, inatividade física, aspectos psicológicos dentre outros (11, 12). Adicionalmente, estudos envolvendo pares de gêmeos uni e bivitelinos fornecem evidências de que a adiposidade corporal apresenta um importante influência hereditária. Fatores genéticos estimam cerca de 40 a 70% da variação de adiposidade (13). Evidências recentes indicam que a obesidade é causada por uma complexa interação entre genes e ambiente (14-16) e o estudo dessa interação é importante para determinar quais indivíduos são mais propensos a desenvolver obesidade em resposta a um determinado meio (15, 17, 18). Embora seja bem documentado que a hereditariedade contribui para determinar a adiposidade, a identificação de genes específicos requer futuros estudos. Mais de 253 genes já foram associados com índices de adiposidade em estudos prévios, porém, apenas 61 foram reproduzidos em pelo menos cinco estudos (19).

Estudos denominados GWAS (do inglês, Genomewide association studies) proporcionam investigar a associação entre inúmeras variantes genéticas e um fenótipo de interesse e vem sendo apontado como uma ferramenta mais robusta para identificação de genes candidatos. Dentre os estudos de GWAS realizados, o estudo de Frayling et al (15) merece destaque pois foi o primeiro a identificar a relação entre o gene *FTO* e a obesidade. O gene *Fat mass and obesity associated gene (FTO)* vem sendo associado com traços de obesidade em populações de diferentes etnias e idades (15, 16, 20, 21). Dentre os polimorfismos de nucleotídeo simples (*SNP*) do gene *FTO*, o rs9939609 é estudado com maior frequência, pois apresenta maior sucesso na taxa de genotipagem (100%) e possibilita associações com menores chances de erro (15). Estudos mais recentes apontam uma relação direta entre o rs1861868, índice de massa corporal (IMC) e obesidade (22, 23).

Não obstante, a literatura disponível é controversa em relação ao gene *FTO*, pois embora alguns estudos tenham observado associação (15, 24), outros não confirmaram esses resultados (25-27). Nesse sentido, poucos estudos foram conduzidos em indivíduos idosos e limitaram-se a utilização do IMC como método de avaliação da composição corporal. Desta forma, torna-se importante que futuros estudos avaliem a composição corporal por meio de métodos diretos como a Absorção Radiológica de Dupla Energia (DXA) (28). Ademais, uma vez que o número de idosos vem aumentando consistentemente e que o percentual de gordura aumenta com o avançar da idade, é importante investigar genes candidatos nessa população.

Dessa forma, o presente estudo buscou examinar os genes candidatos previamente identificados em estudos de GWAS para fenótipos de obesidade. Especificamente, o objetivo foi o de replicar os resultados de estudos anteriores, para

verificar se existe uma associação entre polimorfismos no gene FTO (rs9939609 e rs1861868) e obesidade em uma amostra de mulheres idosas brasileiras.

MÉTODOS

Sujeitos

Após a aplicação dos critérios de exclusão, este estudo incluiu 241 participantes idosos mulheres em um projeto voluntário desenvolvido na Universidade. Foram excluídos os participantes do estudo que: a) não tinham nacionalidade brasileira, b) não foram capazes de caminhar de forma independente, c) possuíam prótese de quadril unilateral ou bilateral d) possuíam prótese metálica, e) fumantes, f) apresentavam desordem metabólica ou endócrina que sabidamente afeta o sistema muscular; g) apresentavam anormalidade de condução ou perfusão cardíaca que contraindique a prática de atividades físicas. Para participar as voluntárias do estudo assinaram um termo de consentimento escrito. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade (CEP / UCB 014/2007).

A versão longa do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) foi utilizada para determinar o nível de atividade física de cada voluntária. O questionário foi realizado em entrevistas “face-a-face” como recomendado (29).

Avaliação da Composição Corporal

Para realização das medidas antropométricas as participantes estavam descalças e vestindo roupas leves. A massa corporal foi mensurada em uma balança digital calibrada digital (mod 2006pp TOLEDO, Brasil, resolução de 0,1 kg). Para mensuração

da estatura utilizou-se um estadiômetro (CARDIOMED, Brasil, precisão de 0,1 cm) fixado na parede.

Os dados referentes à MLG foram mensurados através da absorptometria por raios-x de dupla energia (DXA). Para tal, utilizou-se o equipamento da marca Lunar, modelo DPX-IQ (Lunar Corporation, Madison, WI, USA) conforme procedimentos previamente especificados por Lima et al. (30). Brevemente, as voluntárias foram posicionadas em decúbito dorsal sobre a mesa do equipamento, sendo em seguida cuidadosamente posicionadas de forma que ficassem totalmente centralizadas em relação às laterais da mesa. Após análise de toda a área corporal, o DXA possibilita a determinação da MLG para diferentes regiões corporais. Com base nesses resultados, é possível se chegar ao valor da MLG Apendicular (MLGA), a qual é representada pelo somatório da MLG dos membros inferiores e superiores.

Genotipagem

Amostra sanguínea de todas as participantes foi coletada na veia antecubital e o DNA genômico de alto peso molecular foi extraído dos leucócitos periféricos pelo método “Salting Out” (Miller). A genotipagem dos SNPs foi realizada utilizando o sistema *SnaPSHOT Multiplex System* (Applied Biosystems). A genotipagem através deste sistema envolveu a amplificação pela PCR dos fragmentos de DNA contendo os sítios polimórficos. Em seguida a purificação dos produtos da amplificação com *ExoI* e *SAP*, respectivamente uma exonuclease e uma fosfatase para eliminação dos primers e do excesso de dNTPs utilizados na PCR. Os produtos da PCR de diferentes fragmentos contendo até dez SNPs a serem genotipados foram misturados. Uma alíquota desta mistura foi adicionada ao kit e a outra mistura contendo os primers adjacentes aos SNPs a serem genotipados. Esta mistura foi levada ao termociclador onde utilizando um

programa de ciclagem recomendado pelo fabricante permite-se a extensão de uma única base. A cada um dos ddNTPs tem-se uma fluorescência diferente o que permitiu a genotipagem dos SNPs. Os fragmentos gerados durante a reação para extensão de uma única base são purificados com *SAP* para remoção do excesso de ddNTPs fluorescentes não incorporados. Uma alíquota deste produto purificado foi adicionada a um padrão de tamanho molecular (GS120 Liz, Applied Biosystems) e a formamida altamente deionizada. Esta mistura foi desnaturada a 95°C durante 3 minutos e em seguida mantida em gelo por no mínimo 5 minutos. As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese em um seqüenciador automático de DNA ABI Prism 3100. Os eletroferogramas foram analisados pelo software GeneMapper v3.5.

Análise estatística

Para verificar a normalidade da distribuição dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados são apresentados através da estatística descritiva, utilizando-se os procedimentos de média e erro padrão. Para verificar se a frequência alélica das voluntárias encontrava-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o teste chi-quadrado. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para testar a existência de diferenças entre os genótipos nas seguintes variáveis: idade, massa corporal, estatura, IMC e percentual de gordura. Para verificar a existência de diferenças entre os genótipos para as variáveis não contínuas como suplementação de cálcio, uso de reposição hormonal e nível de atividade física, foi conduzido o teste chi-quadrado. Para verificar a associação entre os genótipos com os fenótipos relacionados à composição corporal, foram realizados modelos de análise de covariância (ANCOVA). Ocorrendo diferença significativa em alguma das variáveis, testes de comparações múltiplas LSD foram adotados para identificação de contrastes relevantes entre as

médias. Na ANCOVA utilizou-se como covariáveis os anos de menopausa, reposição hormonal, suplementação de cálcio e níveis de atividade física. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$ e os dados foram analisados por meio do programa SPSS 13.0 *for Windows*.

RESULTADOS

Os dados descritivos da amostra (idade, anos de menopausa e composição corporal) estão apresentados na tabela 01. De acordo com OMS (3) 73,4% dos sujeitos foram classificados como sobrepeso ou obesidade ($IMC > 25 \text{kg/m}^2$). Em relação a reposição hormonal e suplementação de cálcio, 19 (7.9%) e 56 (23.7 %) mulheres estavam em uso de ambos, respectivamente. Os níveis de atividade física foram os seguintes: 5 (2.1%) eram sedentários, 69 (28.6%) eram insuficientemente ativos, 163 (67.6%) era ativos e 4 (1.7%) muito ativos.

Tabela 01

As distribuições genotípicas do gene FTO (rs9939609 e rs1861868) estiveram de acordo com equilíbrio de Hardy-Weingerg ($p > 0.05$). Os resultados da composição corporal de acordo com o genótipo do rs9939609 estão apresentados na Tabela 02. A frequência dos alelos A e T foram 0.39 e 0.61, respectivamente. A prevalência de sobrepeso e obesidade foi de 69,2%, 77.8% e 70,2?%, respectivamente, para os genótipos A/A, A/T e T/T, no entanto, o teste chi-quadrado não revelou diferença estatísticas significante entre os grupos. Além disso, a ANOVA e ANCOVA não revelou diferença estatística significante para idade, IMC e composição corporal avaliada através do DXA.

Tabela 02

A Tabela 3 apresenta os resultados da composição corporal de acordo com o genótipo rs1861868. Não foram observadas diferenças significativas para rs1861868. A

frequência do alelo G e A foi 0.47 e 0.52, respectivamente. A prevalência de sobrepeso foi 74,5%, 75.6% e 68,7%, respectivamente, para os genótipos G/G, G/A e A/A, no entanto, o teste chi-quadrado não revelou diferenças significativas. Da mesma forma, os testes estatísticos ANOVA e ANCOVA não apontaram diferença estatística significativa para idade, IMC e composição corporal.

Tabela 03

DISCUSSAO

Com base em resultados de GWAS prévios apontando uma associação entre polimorfismos no gene *FTO* (rs9939609 e rs1861868) e obesidade em populações diferentes com uma ampla faixa etária, o presente estudo objetivou verificar essa associação em uma amostra brasileira. Entretanto, esse estudo envolveu uma amostra de indivíduos idosos e avaliou, além do IMC, a adiposidade por um método mais sofisticado que é o DXA. Os principais resultados não indicaram associação entre as duas variantes genéticas examinadas com nenhuma das variáveis relacionadas a gordura corporal (i.e., massa corporal, IMC, gordura corporal ou percentual de gordura).

O primeiro GWAS que identificou a relação entre o gene *FTO* e a obesidade data de 2007 (15, 31). No artigo em questão identificou-se múltiplos polimorfismos do gene associados a diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). No entanto, após ajuste para o IMC a associação não foi verificada, mostrando que, possivelmente, os polimorfismos estavam associados ao IMC e se portou como um fator de risco para o desenvolvimento de DM2. Carreadores do genótipo A/A apresentavam, aproximadamente, uma média de 3kg a mais na massa corporal e uma probabilidade de 1,67 vezes de apresentar obesidade enquanto o genótipo heterozigoto apresentou um ganho de 1,5kg (15). Frayling (15) foi o pioneiro, no entanto, os estudos de replicação se expandiram para outras etnias, idades e raças (16, 20, 21). Recentemente, Mei et al. (32) concluíram que

as variações do gene *FTO* (em especial o alelo A) podem acelerar o início precoce e aumentar a probabilidade de sobrepeso em adultos jovens. Resultados semelhantes foram apontados por Pyrzak et al. (33) ao estudar o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*. Os autores concluíram que esse polimorfismo está associado a IMC e %G em crianças.

O presente estudo não observou diferença estatística significativa para os polimorfismos candidatos do gene *FTO*, mesmo após análises adicionais com covariáveis (idade, anos de menopausa, nível de atividade física, reposição hormonal e suplementação de cálcio) nas variáveis relacionadas ao fenótipo de massa gorda (IMC, %G e prevalência de excesso de peso). Estes resultados corroboram os estudos realizados por Jacobsson et al. (25), Ramos et al. (26) e Jacobsson et al. (27)

Jacobsson et al (25) verificaram, em um estudo de coorte, que o alelo de risco (A - rs9939609) para obesidade não se associa ao aumento de IMC em homens adultos suecos. Ramos et al (26) testaram a associação entre o rs9939609 e variáveis metabólicas e cardiovasculares no período pós-menopausa em mulheres brasileiras e concluíram que o polimorfismo é um preditor para doenças cardiovasculares (valores elevados de razão cintura-quadril, pressão arterial e acumulação lipídica). Os autores não verificaram associação do SNP com o IMC e, após a revisão de literatura realizada, foi o único estudo a examinar o gene *FTO* em brasileiros. Jacobsson et al (27), concluíram que o gene *FTO* é menos associado a sobrepeso e fenótipos de composição corporal (circunferência da cintura, massa gorda total, massa gorda do tronco, massa gorda dos membros inferiores, tecido visceral e subcutâneo) em idosos do que em jovens. Notadamente, a temática é ainda controversa.

A amostra do estudo de Jacobsson et al. (27) foi composta por uma idade média de 70,2 anos, a qual é similar a deste trabalho (66,5 anos). Os demais estudos que,

diferentemente, encontraram associação entre o rs9939609 e fenótipos ligados à obesidade (15, 24) possuem médias de idade diferentes e amplitude de idades elevadas. Fatos que podem causar viés de análise, além de que, aparentemente, os efeitos do FTO na composição corporal parecem menos profundos entre idosos comparados com idade mais jovens (27). Ramos et al. (26) relatam uma média de idade ligeiramente inferior a desta pesquisa (52 anos), no entanto, este foi o único trabalho encontrado que buscou associação do gene FTO com fenótipos de composição corporal entre uma amostra brasileira (Porto Alegre, RS, Brasil). Os resultados aqui apresentados corroboram o supracitado estudo no que diz respeito a não existência da associação do rs9939609 com o IMC.

Outro polimorfismo do gene FTO associado a fenótipos de massa gorda é rs1861868. Ao realizar a busca deste polimorfismo no Banco de Dados de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (34) verifica-se a citação do polimorfismo em apenas 3 artigos (22, 23, 35), sendo um destes de revisão (35). Rampersaud et al. (22) identificou que o SNP rs1861868 está associado ao IMC de indivíduos que apresentaram baixos escores para nível de atividade física (após ajuste para sexo e idade), não revelando efeito naqueles que apresentaram nível de atividade física acima da média (gasto energético acima de 860 e 980 calorias para mulheres e homens, respectivamente). Rodríguez-López et al. (23) identificaram que os indivíduos portadores do alelo G para rs1861868 mostraram um aumento do risco (odds ratio de 3,03; intervalo de confiança de 95%: 1,74–5,27) a desenvolver obesidade mórbida. No presente estudo, não foi verificado diferença estatística significativa entre os genótipos (rs1861868). Em relação ao nível de atividade física, é importante citar que o gene *FTO* não se associa ao nível de atividade física (36, 37), desta forma, a adoção de hábitos de prevenção, como a prática de

atividade física regular, auxilia no combate ao risco aumentado de desenvolvimento da obesidade, devido à suscetibilidade genética do *FTO* (22, 37).

Possivelmente, diversos são os genes que contribuem para fenótipos relacionados à adiposidade. A identificação de polimorfismos funcionais que contribuem para os fenótipos de adiposidade aumentarão o conhecimento dos mecanismos fisiológicos que permeiam a obesidade. A combinação da informação genética com os fatores de risco ambientais pode ser futuramente utilizada para identificar aqueles com risco aumentado e encaminhá-los a programas de prevenção e tratamento. Por outro lado, a identificação desses genes é uma tarefa desafiadora, particularmente, devido ao fato de que um outro polimorfismo pode ser uma variável de confundimento para aquele polimorfismo que está sendo estudado (38). Resultados conflitantes não são inesperados em estudos de associação, podendo estar relacionado a diferenças de etnia, interações com outros genes ou a definição do fenótipo (39). Outros fatores de confundimento incluem diferenças entre os genótipos para idade e hábitos que interfiram no fenótipo estudado, bem como o método utilizado para avaliar a variável de estudo.

Com base nos resultados observados, conclui-se que o gene *FTO* não é determinante no fenótipo de obesidade em uma amostra de mulheres idosas brasileiras. No presente estudo a obesidade foi avaliada através de dois métodos comumente utilizados no meio acadêmico (IMC e %G) e através do DXA, método pouco utilizado mas de mensuração direta e considerado padrão ouro na avaliação dos componentes corporais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as voluntárias do estudo. O auxílio financeiro foi realizado pelo Fundo de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF - 193.000.555/2009) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 301086/2007-9).

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Kannel WB, Wilson PWF, D'Agostino RB. Risk stratification of obesity as a coronary risk factor. *The American journal of cardiology*. 2002;90(7):697-701.
2. Tonstad S, Hjermmann I. A high risk score for coronary heart disease is associated with the metabolic syndrome in 40-year-old men and women. *European Journal of Cardiovascular Risk*. 2003;10(2):129-35.
3. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organization technical report series. 2000(894).
4. Cameron AJ, Welborn TA, Zimmet PZ, Dunstan DW, Owen N, Salmon J, et al. Overweight and obesity in Australia: the 1999-2000 Australian diabetes, obesity and lifestyle study (AusDiab). *Medical Journal of Australia*. 2003;178(9):427-32.
5. Rennie K, Jebb S. Prevalence of obesity in Great Britain. *Obesity Reviews*. 2005;6(1):11-2.
6. Marra C, dos Santos Barbosa F, Sichieri R. Changes of Body Mass Index among Young Men in Brazil over Two Decades. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011;59(2-4):79-83.
7. Gigante DP, de França GVA, Sardinha LMV, Iser BPM, Meléndez GV. Variação temporal na prevalência do excesso de peso e obesidade em adultos: Brasil, 2006 a 2009. *Rev Bras Epidemiol*. 2011;14(1):157-65.
8. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2012;307(5):491-7.
9. Steen B. Body composition and aging. *Nutrition Reviews*. 1988;46(2):45-51.
10. Visscher T, Seidell J, Menotti A, Blackburn H, Nissinen A, Feskens E, et al. Underweight and Overweight in Relation to Mortality Among Men Aged 40–59 and 50–69 Years The Seven Countries Study. *American journal of epidemiology*. 2000;151(7):660-6.
11. Agurs-Collins T, Bouchard C. Gene-nutrition and gene-physical activity interactions in the etiology of obesity. *Obesity*. 2008;16:S2-S4.
12. Bouchard C, Rankinen T. Exciting advances and new opportunities. *Genomics of Obesity*. Taylor and Francis Group, LLC: New York.
13. Allison D, Faith M, Nathan J. Risch's lambda values for human obesity. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1996;20(11):990.
14. Loos RJF, Rankinen T. Gene-diet interactions on body weight changes. *Journal of the American Dietetic Association*. 2005;105(5):29-34.
15. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007;316(5826):889-94. Epub 2007/04/17.
16. Loos R, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obesity Reviews*. 2008;9(3):246-50.
17. Maes HHM, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavior genetics*. 1997;27(4):325-51.
18. Marti A, Moreno-Aliaga M, Hebebrand J, Martinez J. Genes, lifestyles and obesity. *International Journal of Obesity*. 2004;28:S29-S36.
19. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*. 2012;14(4):529-644.

20. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS genetics*. 2007;3(7):e115.
21. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature genetics*. 2007;39(6):724-6.
22. Rampersaud E, Mitchell BD, Pollin TI, Fu M, Shen H, O'Connell JR, et al. Physical activity and the association of common FTO gene variants with body mass index and obesity. *Archives of internal medicine*. 2008;168(16):1791.
23. Rodríguez-López R, González-Carpio M, Serrano M, Torres G, García CMT, Herrera T, et al. Association of FTO gene polymorphisms and morbid obesity in the population of Extremadura (Spain)]. *Endocrinología y nutrición: órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*. 2010;57(5):203.
24. Liu G, Zhu H, Lagou V, Gutin B, Stallmann-Jorgensen IS, Treiber FA, et al. FTO variant rs9939609 is associated with body mass index and waist circumference, but not with energy intake or physical activity in European-and African-American youth. *BMC medical genetics*. 2010;11(1):57.
25. Jacobsson J, Risérus U, Axelsson T, Lannfelt L, Schiöth H, Fredriksson R. The common FTO variant rs9939609 is not associated with BMI in a longitudinal study on a cohort of Swedish men born 1920-1924. *BMC medical genetics*. 2009;10(1):131.
26. Ramos RB, Casanova GK, Maturana MA, Spritzer PM. Variations in the fat mass and obesity-associated (FTO) gene are related to glucose levels and higher lipid accumulation product in postmenopausal women from southern Brazil. *Fertility and sterility*. 2011.
27. Jacobsson JA, Almén MS, Benedict C, Hedberg LA, Michaëlsson K, Brooks S, et al. Detailed Analysis of Variants in FTO in Association with Body Composition in a Cohort of 70-Year-Olds Suggests a Weakened Effect among Elderly. *PLoS One*. 2011;6(5):e20158.
28. Toombs RJ, Ducher G, Shepherd JA, De Souza MJ. The impact of recent technological advances on the trueness and precision of DXA to assess body composition. *Obesity*. 2012;20(1):30-9.
29. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2003;35(8):1381.
30. Lima RM, De Abreu BS, Gentil P, de Lima Lins TC, Grattapaglia D, Pereira RW, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and haplotypes with fat-free mass in postmenopausal Brazilian women. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2007;62(9):966-72.
31. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(23):9362.
32. Mei H, Chen W, Mills K, He J, Srinivasan SR, Schork N, et al. Influences of FTO gene on onset age of adult overweight. *Human genetics*. 2012:1-9.
33. Pyrzak B, Wisniewska A, Majcher A, Tysarowski A, Demkow U. Relation of Fat-Mass and Obesity-Associated Gene Polymorphism to Fat Mass Content and Body Mass Index in Obese Children. *Respiratory Regulation-The Molecular Approach*. 2013:255-62.
34. Kitts A, Sherry S. The single nucleotide polymorphism database (dbSNP) of nucleotide sequence variation. *The NCBI handbook*. 2003:5.1-5.30.

35. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: *FTO* leads the way. *Trends in Genetics*. 2010;26(6):266-74.
36. Berentzen T, Kring SII, Holst C, Zimmermann E, Jess T, Hansen T, et al. Lack of association of fatness-related *FTO* gene variants with energy expenditure or physical activity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(7):2904-8.
37. Lappalainen TJ, Tolppanen AM, Kolehmainen M, Schwab U, Lindström J, Tuomilehto J, et al. The common variant in the *FTO* gene did not modify the effect of lifestyle changes on body weight: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Obesity*. 2009;17(4):832-6.
38. Thompson PD, Moyna N, Seip R, Price T, Clarkson P, Angelopoulos T, et al. Functional polymorphisms associated with human muscle size and strength. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2004;36(7):1132.
39. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiologic reviews*. 2000;22(2):203-17.

TABELAS

Tabela 01. Características das participantes. Valores são expressos em média \pm desvio padrão.

Variáveis	
<i>N</i>	241
Idade (anos)	66,65 \pm 5,5
Massa Corporal (Kg)	65,81 \pm 11,9
Estatura (m)	1,53 \pm 0,1
Anos de menopausa	17,96 \pm 7,5
IMC (Kg/m ²)	27,99 \pm 4,5
Massa Gorda (kg)	26,43 \pm 7,9
Percentual de gordura (%)	39,46 \pm 5,9
MLGT (kg)	37,95 \pm 4,9
MLGT Relativa (Kg/m ²)	16,15 \pm 1,7
MLGA (kg)	14,56 \pm 2,3
MLGA Relativa (Kg/m ²)	6,19 \pm 0,8

IMC: Índice de massa corporal; MLGT: Massa livre de gordura total; MLGA: Massa livre de gordura apendicular.

Tabela 02. Dados descritos e composição corporal de acordo com genótipo rs9939609. Valores são expressos em média \pm desvio padrão

Variáveis				p-valor
	A/A	A/T	T/T	
N (%)	39(16,2)	108(44,8)	94(39)	
Idade	68,13 \pm 7,5	66,29 \pm 5,1	66,45 \pm 5,0	0.18
IMC (Kg/m ²)	27,96 \pm 4,9	28,04 \pm 4,3	27,95 \pm 4,6	0.99
Massa Gorda (kg)	26,40 \pm 8,7	26,91 \pm 7,6	25,90 \pm 8,0	0.67
Percentual de gordura (%)	39,48 \pm 6,3	40,07 \pm 5,3	38,74 \pm 6,3	0.28
MLGT (kg)	37,48 \pm 4,6	37,95 \pm 5,2	38,15 \pm 4,8	0.77
MLGT Relativa (Kg/m ²)	16,02 \pm 1,5	16,09 \pm 1,6	16,27 \pm 1,8	0.64
MLGA (kg)	14,03 \pm 2,4	14,70 \pm 2,5	14,61 \pm 2,0	0.30
MLGA Relativa (Kg/m ²)	5,98 \pm 0,8	6,22 \pm 0,9	6,23 \pm 0,8	0.22

IMC: Índice de massa corporal; MLGT: Massa livre de gordura total; MLGA: Massa livre de gordura apendicular.

Tabela 03. Dados descritos e composição corporal de acordo com genótipo rs1861868. Valores são expressos em média \pm desvio padrão

Variáveis				p-valor
	G/G	A/G	A/A	
N (%)	55(22,8)	119(49,4)	67(27,8)	
Idade	66,44 \pm 5,4	66,33 \pm 5,0	67,39 \pm 6,4	0.43
IMC (Kg/m ²)	28,25 \pm 4,6	27,70 \pm 3,7	24,47 \pm 4,2	0.65
Massa Gorda (kg)	27,67 \pm 9,7	25,96 \pm 6,5	26,25 \pm 8,5	0.40
Percentual de gordura (%)	39,92 \pm 6,2	39,61 \pm 5,6	39,33 \pm 5,6	0.75
MLGT (kg)	14,65 \pm 1,9	14,60 \pm 2,1	14,10 \pm 1,9	0.21
MLGT Relativa (Kg/m ²)	6,14 \pm 0,6	6,21 \pm 0,8	6,07 \pm 0,6	0.45
MLGA (kg)	38,75 \pm 5,0	37,81 \pm 4,1	36,89 \pm 4,4	0.37
MLGA Relativa (Kg/m ²)	16,23 \pm 1,6	16,10 \pm 1,5	15,91 \pm 1,6	0.50

IMC: Índice de massa corporal; MLGT: Massa livre de gordura total; MLGA: Massa livre de gordura apendicular