UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DIANA OLIVEIRA RIBEIRO

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA EM UMA POPULAÇÃO URBANA

Ribeirão Preto, 2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DIANA OLIVEIRA RIBEIRO

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS AO ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA EM UMA POPULAÇÃO URBANA

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Genética).

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Ribeirão Preto, 2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ribeiro, Diana Oliveira.

Análise de polimorfismos associado ao índice de massa corpórea em uma população urbana.
Ribeirão Preto, 2018.
117 f.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientador: Silva Jr, Wilson Araújo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diana Oliveira Ribeiro

Análise de polimorfismos associado ao índice de massa corpórea em uma população urbana.

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Genética).
Área de Concentração: Genética
Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

FINANCIAMENTO E SUPORTE

Este trabalho foi desenvolvido com financiamento e apoio das seguintes instituições:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

FAEPA - Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

À meu pai e minhas mães Lúcia e Dolores, por todo cuidado e carinho até hoje.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, meu orientador, agradeço pela oportunidade e por todo o crescimento profissional que tive durante o período do doutorado em que participei do seu grupo de pesquisa.

À Prof.ª Dr.ª Ana Lilia Alzate Marin, por todo apoio que recebi no início do doutorado.

Ao Dr. João Guerreiro da Universidade Federal do Pará (UFPA) e Dr.ª Heloisa Bettiol (HC-USP), pela parceria no desenvolvimento desse projeto de doutorado. Muito obrigada.

Ao meu pai Ribamar pelo amor incondicional, carinho, apoio e compreensão. Sempre me apoiando e incentivando a ir o mais longe que puder na busca do conhecimento. À minha mãe Eliana (*in memoriam*) que mesmo partindo cedo, me deu a vida e motivação para ser uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos Marcos e Márcia, por serem um dos pilares que me fortalecem todos os dias. Sou muito abençoada e agradecida por tê-los em minha vida.

À minha grande e querida família, por todo carinho de sempre. Em especial à minha amada tia Lúcia e minha amada vó Dolores, que deram o melhor si para que eu tivesse um caráter ilibado e uma educação exemplar. As amo como uma filha ama sua mãe.

Aos amigos de laboratório, Isabela, Bruna, Àdamo, Simone, Dani, Luiza, Greice, Andrés, Thaís, Jéssica, Camila, Anelisa, Carlos, Grazi, Felipe, Nati e Cibele pela sempre agradável convivência diária. Em especial ao baixo clero, sempre levarei vocês no coração!

À Kamilla, Anemari e Adriana pela amizade e por todo apoio técnico recebido durante esse tempo.

À Meire Tarlá e Carla pela disponibilidade me socorrer com problemas administrativos, muito obrigada.

Ao meu casal favorito aqui de Ribeirão Preto, Salvador e Dilo. Vocês proporcionaram os melhores momentos, quer fosse indo no cinema, nos jantares das sextas, em Delfinópolis ou quando me visitaram em Bragança-Pa. Obrigada pela amizade e por todo o resto, amo muito vocês! E Salvador, muito obrigada por todas às vezes que lestes e corrigistes meus textos!

Aos amigos do Hemocentro/USP/CCAA, em especial Hudson, Ildercílio, Igor, Vitor, Josi, Rômulo, Fernando, Vaxcu, Paula, Hamilton, Hugo Pessotti, Hugo Rego, Reginaldo e Henry, obrigada pela amizade e o companheirismo de todos os dias, vocês são incríveis.

As minhas primeiras companheiras de república Patty e Carol, a primeira vez que me senti em casa, aqui em Ribeirão Preto, foi com vocês. As minhas de sempre companheiras de república Maritza, Gabi e Marisa, com as quais formamos a nossa não tradicional família brasileira. Não tenho palavras para dizer o quanto é maravilhoso ter vocês na minha vida e quão sortuda sou pela amizade de vocês.

Aos meus amigos de Bragança, que mesmo longe eram presença constante na minha vida. Aliviaram a saudade que vez e sempre baita no peito de minha Bragança. Em especial a Yasmin (Marida) e Gustavo (Guga), por todas as vezes que me ouviram, por toda torcida, apoio, companheirismo e amor que sempre recebi. Vocês são mais que amigos, são meus irmãos de alma.

Aos membros titulares da banca, por aceitarem avaliar meu trabalho.

Ao departamento de Genética e ao programa de pós-graduação em Genética pela oportunidade.

À Susie, secretária do departamento de genética, por todo o auxílio e disponibilidade durante toda a pós-graduação.

Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Fundação Hemocentro, pelo local e equipamentos de trabalho proporcionados.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

Epígrafe

“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua. ”

Stephen Hawking

RESUMO

Ribeiro, DO. **Análise de polimorfismos associado ao índice de massa corpórea em uma população urbana**. 2018. 117f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A obesidade, que atinge uma grande parcela da população mundial é resultado do acumulo excessivo de gordura corporal, podendo afetar gravemente a saúde. É considerada multifatorial, com maior susceptibilidade ao ganho de massa em indivíduo que possuírem maior predisposição genética. Além disso, também está associada a doenças como diabetes, hipertensão, neoplasias e disfunções endócrinas. No Brasil, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 51,7% da população encontra-se com sobrepeso ou obesa. A literatura mostra que polimorfismos de nucleotídeos único (SNPs) são marcadores frequentemente usados em estudos de associação de doenças complexas, e trabalhos sobre obesidade focados em populações tri-híbridas, tal como é a brasileira, ainda são escassos. Este trabalho buscou identificar um conjunto de SNPs relacionados com o aumento do Índice de Massa Corpórea (IMC) a partir do exoma de ameríndios brasileiros e verificar se o padrão seria o mesmo na coorte de Ribeirão Preto – SP. O projeto desenvolvido foi devidamente aprovado pelo projeto pelo Comitê de Ética (CAAE 74509817.4.0000.5440). Um conjunto de 17 SNPs foi selecionado após o sequenciamento do exoma ameríndio, realizado pelo Dr. João Guerreiro, cada SNP foi validado posteriormente mediante a realização da genotipagem por PCR em tempo real, confirmando as mutações encontradas nos ameríndios. Para a coorte de Ribeirão Preto, utilizamos DNA genômico de 180 indivíduos, sendo 89 normais e 91 obesos, coletados previamente no Sistema Único de Saúde (SUS) por Barbieri et al (2006). A ancestralidade tri-híbrida de 45 indivíduos desses indivíduos foi confirmada por um conjunto de 15 polimorfismos do tipo inserção/deleção (InDels) escolhidos do painel desenvolvido por Santos et al. (2010), demostrando predominância europeia (87%), seguida de ameríndia (9%) e africana (4%). Os 17 SNPs selecionados apresentaram somente mutações sinônimas, onde rs2277552 e rs3731900 tiveram predição de patogenicidade positiva. A frequência do alelo mutante na coorte de Ribeirão Preto variou em função do SNP e da população comparada do banco de dados do *Ensembl*. A exemplo, rs8133052 exibiu diferença em seus valores quando a população comparada com a coorte de Ribeirão Preto era a total, 50% e 37% respectivamente. A análise de componentes principais (PCA) não foi sensível o bastante para separar o grupo obeso do controle. O teste de associação optou-se pelos modelos dominante e recessivo para todos os SNPs, porém nenhuma correlação foi observada quando o fenótipo observado era a obesidade (IMC>30). Entretanto, rs231591 para o MD e rs1824152 para o MR mostraram valores significativos de proteção para a obesidade central (razão entre cintura e estatura), com odds ratio de 0,27 ($p = 0.0013$) e 0.37 ($p = 0.0056$), respectivamente. Uma análise mais refinada considerando a influência do sexo dentro da coorte foi realizada e, dependendo do fenótipo e do sexo observado quatro SNPs (rs1824152, rs3732378, rs231591 e rs744224) apresentaram valores significativos de proteção. Destes três (rs1824152, rs231591 e rs744224) ainda não haviam sido relacionados diretamente com seu caráter protetivo para a obesidade.

Palavras-chave: SNP, Exoma, Obesidade, População urbana, Ancestralidade.

ABSTRACT

Ribeiro, DO. **Association of Single Nucleotide Polymorphisms with Index Body Mass in an urban population**. 2018. 117f. Doctoral thesis. Ribeirão Preto Medical School-University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Obesity affects a big portion of global population and it results from excessive accumulation of body fat, what can seriously affect health. It is known the obesity is multifactorial, and it will be stronger the greater is the individual genetic predisposition. Besides that, it is associated with many diseases like diabetes, hypertension, neoplasms, and endocrine dysfunctions. In Brazil, according to the World Health Organization, about 51.7% of the population is classified as being overweight or obese. Moreover, the literature shows that molecular markers called Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are widely used in association studies of complex diseases, like obesity, and there are still few genetic researches whose focus is the obesity in mixed populations such as Brazil's. Therefore, after we got the acceptance for this work by the Ethics Committee (CAAE 74509817.4.0000.5440), we looked for a set of SNPs, based the obese Brazilian's indigenous exome, related to the increase of the Body Mass Index (BMI) and aimed to verify if that pattern is the same in a cohort of Ribeirão Preto (SP, Brazil). A set of 17 SNPs was selected after the indigenous exome was sequenced by Dr. João Guerreiro and each SNP was posteriorly validated by Real-Time PCR and verified by genotyping of the indigenous samples. For the cohort of Ribeirão Preto (SP), we used genomic DNA obtained from 180 individuals (89 normal-weight and 91 obese) from Sistema Único de Saúde (SUS) of Ribeirão Preto, previously collected by Barbieri (2006). We then confirmed the trihybrid ancestry of 45 individuals from the cohort using a set of 15 Insertion Deletion Polymorphisms (InDels) selected from the panel developed by Santos et al. (2010), what showed to be predominantly European, followed by African and Amerindian, with frequencies of 87%, 9% and 4%, respectively. The 17 SNPs showed synonymous mutations, from which rs2277552 and rs3731900 presented pathogenicity prediction. The cohort mutant allele frequency compared to Ensembl database varied in function of the SNP and the population. For example, rs8133052 varied when total population and the Ribeirão Preto cohort were compared, with 37% and 50%, respectively. The Principal Component Analysis (PCA) was not sensitive enough to separate obese from non-obese. The association test used the dominant and the recessive models for all SNPs, and no correlation was observed for the obese phenotype (IBM>30), independently of the model. However, rs231591 and rs1824152, for dominant and recessive models, in this order, showed values significantly associated to the protection against central obesity (ratio between waist and height), with odds ratio of 0,27 ($p = 0,0013$) and 0,37 ($p = 0,0056$), respectively. A more refined analysis of the associated test was realized, considering the influence of sex in the observed phenotype within the cohort. Four SNPs (rs1824152, rs3732378, rs231591 and rs744224) showed significant protection values, depending on the sex and the model adopted. From theses, three SNPs (rs1824152, rs231591 e rs744224) had never been directly associated to protection against obesity.

Keywords: SNP, Exome, Obesity, trihybrid population, Ancestrality.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DA GORDURA CORPORAL DIFERENCIANDO UM INDIVÍDUO NORMAL, OBESO E OBESO CENTRAL. 24

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA MOSTRANDO OS DIFERENTES FATORES QUE PODEM OCASIONAR A OBESIDADE. 25

FIGURA 3 - LOCALIZAÇÃO DAS TRIBOS ASURINI DO XINGU E XIKRIN DO CATETÉ. 35

FIGURA 4 – AMERÍNDIO REPRESENTANTE DA TRIBO XIKRIN DO CATETÉ SELECIONADO PARA O SEQUENCIAMENTO DO EXOMA. 36

FIGURA 5 – AGRUPAMENTO DOS INDIVÍDUOS DA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO DE ACORDO COM SUA ANCESTRALIDADE PARA OS 15 MARCADORES INDELS DESCRITOS POR SANTOS ET AL. (2010). 46

FIGURA 6 – COMPOSIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL DA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO, OBTIDA A PARTIR DE 15 INDELS DESENVOLVIDOS POR SANTOS (2010). 47

FIGURA 7 - ONCONPRINT CONTENDO AS INFORMAÇÕES CLÍNICAS E MUTACIONAIS DOS 17 SNPS SELECIONADAS A PARTIR DO EXOMA INDÍGENA E RELACIONADOS À OBESIDADE. 48

FIGURA 8 - ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS. 53

FIGURA 9 - PCA UTILIZANDO O CONJUNTO DE 17 SNPS NA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO. 54

FIGURA 10 - SEGUNDA PCA UTILIZANDO O CONJUNTO DE SNPS QUE APRESENTARAM P-VALOR SIGNIFICATIVO NA ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA CONDICIONADA PARA FRENTE. 56

FIGURA 11 – DISPOSIÇÃO GRÁFICA DO RESULTADO DO TESTE DE ASSOCIAÇÃO E AUMENTO DE IMC NA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO COM OS SNPS SELECIONADOS A PARTIR DO EXOMA AMERÍNDIO. 58

FIGURA 12 - DISPOSIÇÃO GRÁFICA DO RESULTADO DO TESTE DE ASSOCIAÇÃO E OBESIDADE CENTRAL NA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO COM OS SNPS SELECIONADOS A PARTIR DO EXOMA AMERÍNDIO. 59

FIGURA 13 - TESTE DE ASSOCIAÇÃO PARA O IMC E OC NA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO LEVANDO EM CONSIDERAÇÃO O FENÓTIPO E O SEXO PARA CADA FENÓTIPO OBSERVADO. 60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DO ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC) SEGUNDO CRITÉRIOS DA OMS, E RISCO DE MORTE RELACIONADO A DOENÇAS CLÍNICAS ASSOCIADAS COM O AUMENTO DE PESO (RISCO DE COMORBIDADES). 23

TABELA 2 - TABELA COM DADOS CLÍNICOS E DE ANCESTRALIDADE DOS AMERÍNDIOS SELECIONADOS PARA O SEQUENCIAMENTO DO EXOMA. 36

TABELA 3 - CONJUNTO DE MARCADORES INDELS INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE DESENVOLVIDOS POR SANTOS (2010) E SELECIONADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DESTE TRABALHO. 43

TABELA 4 - FREQUÊNCIA DA ANCESTRALIDADE DE CADA POPULAÇÃO UTILIZANDO 15 INDELS DESENVOLVIDOS POR SANTOS ET AL (2010). 45

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS SNPS ASSOCIADOS COM A OBESIDADE SELECIONADOS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO DO EXOMA AMERÍNDIO (GUERREIRO - DADOS NÃO PUBLICADOS) E SUA RELAÇÃO COM A PATOGENICIDADE. 47

TABELA 6 - GENES SELECIONADOS A PARTIR DO CONJUNTO DE SNPS QUE POSSUEM ARTIGOS PUBLICADOS NA LITERATURA ASSOCIANDO-OS COM OBESIDADE E FENÓTIPOS CORRELACIONADOS. 51

TABELA 7- DADOS DA LITERATURA ASSOCIADOS À OBESIDADE E FENÓTIPOS CORRELACIONADOS, PARA O CONJUNTO DE SNPS SELECIONADOS NESTE TRABALHO. 52

TABELA 8 - FREQUÊNCIA ALÉLICA MUTANTE EM PORCENTAGEM PARA TODOS OS SNPS SELECIONADOS NESTE ESTUDO NA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO E DO BANCO DE DADOS *ENSEMBL*. 52

TABELA 9 - VALORES ENCONTRADOS PARA O TESTE DE ASSOCIAÇÃO NA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO UTILIZANDO OS SNPS SELECIONADOS A PARTIR DO EXOMA AMERÍNDIO E O IMC. 58

TABELA 10 - VALORES ENCONTRADOS PARA O TESTE DE ASSOCIAÇÃO NA COORTE DE RIBEIRÃO PRETO UTILIZANDO OS SNPS SELECIONADOS A PARTIR DO EXOMA AMERÍNDIO E OBESIDADE CENTRAL. 59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

A	Altura
ACOT11	do inglês, *Acyl-CoA Thioesterase 11*
AFR	Africana
AME	Ameríndia
Anc	Ancestralidade
BAT	do inglês, *Brown Adipose Tissue*
BM	Base Mutada
CAPN10	do inglês, *Calpain 10*
CBR3-AS1	do inglês,*CBR3 Antisense RNA 1*
CCDC159	do inglês, *Coiled-Coil Domain Containing 159*
CNPPD1	do inglês, *Cyclin Pas1/PHO80 Domain Containing 1*
CPAMD8	do inglês, *C3 And PZP Like, Alpha-2-Macroglobulin Domain Containing 8*
Ct	do inglês, *Cycle threshold*
CX3CR1	do inglês, *C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1*
DL	Desequilibro de Ligação
DMT1	*Diabetes mellitus* tipo 1
DMT2	*Diabetes mellitus* tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERLEC1	do inglês, *Endoplasmic Reticulum Lectin 1*
EUR	Europeia
F2RL3	do inglês, *F2R Like Thrombin/Trypsin Receptor 3*
F2RL3	do inglês, *F2R Like Thrombin Or Trypsin Receptor 3*
FAM134A	do inglês, *Family With Sequence Similarity 134, Member A*
FTO	do inglês, *Fat-Mass and Obesity-Associated*
GALNT2	do inglês, *Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 2*
Glc	Glicose
GPCR	do inglês, *G protein-coupled receptor*
H3K9	do inglês, *Tri-methylation of lysine 9 of histone 3*
HRM	do ingles, *High resolution Melting*
I39	Protease alfa-2-macroglobulina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
ID	Identificação
Id	Idade
IGFLR1	do inglês, *IGF Like Family Receptor 1*
IMC	Índice de Massa Corporal
InDels	do inglês, *Insertion-Deletion polymorphisms*
IQGAP3	do inglês, *IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 3*
KIR3DL3	do inglês, *Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor, Three Ig Domains And Long Cytoplasmic Tail 3*
KMT2	do inglês, *Lysine Methyltransferase*
KMT2B	do inglês, *Lysine Methyltransferase 2B*
LDLR	do inglês, *Low Density Lipoprotein Receptor*
LEPR	do inglês, *Leptin Receptor*
LPGAT1	do inglês, *Lysophosphatidylglycerol Acyltransferase 1*
MC4R	do inglês, *Receptor de Melanocortina 4*
M-CAP	do inglês, *Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*
MD	Modelo Dominante
MIA	Marcadores Indicativos de Ancestralidade
MNS	Mutação não sinônima
MR	Modelo Recessivo
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro

mtDNA	DNA mitocondrial
NOX5	do inglês, *NADPH Oxidase 5*
NRY	do inglês, *Non-Recombinant of the Y chromosome*
OC	Obesidade Central
OECD	do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Do inglês, *Odd Ratio*
P	Peso
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNPLA3	do inglês, *Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3*
PolyPhen-2	do inglês, *Polymorphism Phenotyping*
POMC	do inglês, *Proopiomelanocortin*
PPARγ	do inglês, *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*
Q	Q-score
RCE	Razão Cintura Estatura
SBS	do inglês, *Sequencing-by-Synthesis*
SIFT	do inglês, *Sorting Tolerant From Intolerant*
SLC6A14	do inglês, *Solute Carrier Family 6 Member 14*
SNAP	do inglês, *Screening for Non-Acceptable Polymorphisms*
SNP	do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*
SP	São Paulo
SPESP1	do inglês, *Sperm Equatorial Segment Protein 1*
STR	do inglês, *Short Tandem Repeats*
T	Temperatura
UBQLN4	do inglês, *Ubiquilin 4*
UCP	do inglês, *Mitochondrial uncoupling proteins*
UCP1	do inglês, *Uncoupling Protein 1*
UCP2	do inglês, *Uncoupling Protein 2*
UTR	do inglês, *Untranslated region*
VIP	Importância da Variável na Projeção
VNTR	do inglês, *Variable Number Tndem Repeats*
ZBTB32	do inglês, *Zinc Finger And BTB Domain Containing 32*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
’	Minutos
”	Segundos
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
°C	Grau Celsius
µl	Microlitro
Chr	Cromossomo
Cm	Centímetros
Dl	Decilitro
Kg	Kilograma
m^2	Metro quadrado
Mb	Megabase
Mg	Miligrama
Ml	Mililitro
Ng	Nanograma
nM	Nanomolar
Pb	Pares de bases
pM	Picomolar

ÍNDICE

1 Introdução 19
1.1 Obesidade 19
1.1.1 Brasil e obesidade 20
1.1.2 Índios e obesidade 20
1.2 IMC e RCE como medida para classificação da obesidade 22
1.2.1 Índice de Massa Corpórea 22
1.2.2 Razão Cintura Estatura 23
1.3 Obesidade genética 24
1.3.1 Obesidade sindrômica 25
1.3.2 Obesidade monogênica 25
1.3.3 Obesidade poligênica 26
1.4 Marcadores Moleculares 28
1.4.1 SNP 28
1.4.2 InDels 30
1.4.3 Ancestralidade genética brasileira 31
2 HIPÓTESE 33
3 OBJETIVOS 34
3.1 Objetivo Geral 34
3.2 Objetivos Específicos 34
4 MATERIAL E MÉTODOS 35
4.1 Recrutamento dos participantes 35
4.2 Considerações Éticas 37
4.3 Extração de DNA 38
4.4 Preparo da biblioteca genômica 38
4.5 Sequenciamento do exoma e mapeamento 39
4.6 Análises de bioinformática 39
4.7 Validação 40
4.8 Genotipagem da população de Ribeirão Preto 40
4.9 Ancestralidade 41
4.10 Sequenciamento Sanger 42
4.11 Análises dos dados 43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 Ancestralidade 45
5.2 Caracterização dos SNPs 47

5.3 Genotipagem 52
5.4 Considerações Finais 62
6 CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64
APÊNDICE 76
Apêndice A – Informações extras sobre a coorte de Ribeirão Preto cedidas pelo Drª Heloisa Bettiol. 76
Apêndice B – Sequência do conjunto de InDels informativos de ancestralidade, posição cromossômica e sequencia dos *amplicons* (Santos 2010). 80
Apêndice C - Análise de ancestralidade no programa *Structure*, ... 82
Apêndice D – Valor da análise de desequilíbrio de ligação para cada SNP e suas possíveis combinações (D estatístico). 94
Apêndice E - Valor da análise de desequilíbrio de ligação para cada SNP e suas possíveis combinações (p-valor; Método de Fisher). 95
Apêndice F - Tabela da análise de regressão logística condicionada para frente utilizando o conjunto de 18 SNP na coorte de Ribeirão Preto, modelo dominante. 96
Apêndice G - Tabela da análise de regressão logística condicionada para frente utilizando o conjunto de 18 SNP na coorte de Ribeirão Preto, modelo recessivo. 97
ANEXOS 98
Anexo A – Termo de aprovação do comitê de ética. 98
Anexo B – Manuscrito do trabalho que será submetido a uma revista indexada. 102

1 Introdução

1.1 Obesidade

A obesidade é considerada a mais importante desordem nutricional do mundo, atingindo um número de pessoas nunca antes observado. A ingestão alimentar diária maior que a necessária, acompanhada de diminuição no nível de atividade física ou sedentarismo estão entre as principais causas da obesidade ("WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic", 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que o número de pessoas acima do peso praticamente dobrou quando se compara a população mundial de 2014 com a da década de 80. Ainda sobre o ano de 2014, a prevalência de indivíduos com excesso de peso, cerca de 1,9 bilhões de adultos, foi maior em quase todo mundo, exceto em uma parte da África subsaariana e Ásia ("WHO | Obesity and overweight", 2017).

A *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) prevê para o ano de 2030 aumentos significativos na taxa de obesidade em diferentes países. Os Estados Unidos lideram as previsões (47%), seguido por México (39%) e Inglaterra (35%). Em contraponto, os países com menor taxa de crescimento da obesidade são Coréia (9%), Itália (13%), Suíça (15%), França (20%) e Espanha (21%) (OECD| OBESITY UPDATE, 2017).

Outro dado alarmante diz respeito à quantidade de mortes em decorrência dos problemas de saúde causados pela obesidade. Estimativas preveem o excesso de peso ou obesidade geram a cada ano, 2,8 milhões de morte, superando em número os óbitos causados por desnutrição ("WHO | Obesity and overweight", 2017). Entre crianças menores de cinco anos a tendência não muda: em 2015 havia 42 milhões com excesso de peso. De forma semelhante aos adultos, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e *Diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) é maior em crianças com sobrepeso ou obesas, do que aquelas que apresentam peso normal ("WHO | Obesity and overweight", 2017). É importante lembrar que classificar a obesidade durante a infância ou adolescência é mais complicado, uma vez que seus corpos estão em crescimento tanto em altura, quanto em composição corporal. Além disso, existem ainda diferenças significativas quanto ao início da puberdade e as taxas de acúmulo de gordura existentes individualmente por país ("WHO | Obesity and overweight", 2017).

1.1.1 Brasil e obesidade

No Brasil, a obesidade enquanto problema de saúde pública é um acontecimento recente. Apesar disso, todas as regiões do país independente dos diferentes traços socioeconômicos apresentam números significativos no ganho de peso corporal, sendo mais elevados em famílias de baixa renda (FRANCISCHI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000). Segundo pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) encomendada pelo Plano Nacional da Saúde, 56,9% da população brasileira possui excesso de peso, dos quais 20,8% são considerados exclusivamente obesos (IBGE, 2014). Malta et al (2014) fizeram uma análise da prevalência de sobrepeso e obesidade na população brasileira, no período de 2006 a 2012, onde constataram a predominância de excesso de peso na população adulta das 27 cidades estudadas, representando os 26 estados mais o distrito federal. Houve um crescimento de 43,2% em 2006 para 51% em 2012 de pessoas com excesso de peso, com taxa de aumento anual de 0,89% (MALTA et al., 2014).

Um estudo mais recente avaliou o excesso de peso em diferentes momentos da vida adulta de indivíduos de Pelotas, Rio Grande do Sul. Os autores observaram os maiores valores de IMC (Índice de Massa Corpórea) e percentual de gordura em adultos, quando estes exibiam sobrepeso na adolescência e/ou idade adulta. Nos casos onde o sobrepeso era apenas na infância, os valores foram similares daqueles que nunca apresentaram excesso de peso, indicando o benéfico da interrupção precoce do sobrepeso/obesidade (CALLO et al., 2016).

1.1.2 Índios e obesidade

Populações pequenas, tais como as ameríndias, sofrem forte influência da deriva genética, levando como consequência à rápida fixação de um determinado alelo (FUTUYMA, 2009). Em alguns casos, este alelo pode estar associado a certa característica, e sob esse aspecto, estudos que buscam variantes genéticas e associação com doenças dentro de uma população tem maior chance de sucesso quando os marcadores utilizados são baseados na ancestralidade, uma vez que as frequências alélicas para um polimorfismo pode variar entre e dentro das populações (HESTER et al., 2012; LI et al., 2008; PRAKASH et al., 2016; TEMPLETON, 2011).

Assim, populações ameríndias que estão sofrendo drásticas mudanças, em função da forte influência da sociedade moderna em seus padrões de vida e dietas, são um excelente alvo para estudos de características complexa como a obesidade. A interação entre índios e sociedade moderna já ocasionou alguns aspectos negativos, tais como o surgimento de doenças até então inexistentes entre as populações ameríndias, como por exemplo a obesidade, DMT2 e hipertensão, que vem se tornando um sério problema dentro dessas comunidades (SALZANO; HUTZ, 2005).

A literatura relata alguns estudos que buscaram compreender melhor o mecanismo da obesidade tendo por base populações ameríndias. Knowler et al. (1991) estudaram como alterações no padrão de vida podem levar ao ganho de peso na tribo Pima, localizada nos Estados Unidos. Sabe-se que seus ancestrais viviam no deserto, onde possivelmente sofreram seleção positiva para a capacidade de armazenar gordura corporal, entretanto a atual mudança de ambiente, aliada à transformação no estilo de vida dos seus descendentes, pode ser uma possível explicação para a alta prevalência de obesos na tribo (KNOWLER et al., 1991).

Traurig et al. (2013) em um estudo de associação sequenciaram o exoma completo de 112 Pimas, onde encontraram duas variantes, rs112662024 e rs12058008, fortemente relacionadas com o IMC e de caráter hereditário. As variáveis encontravam-se dentro do gene LPGAT1 que estava relacionado com pré-adipócitos, contribuindo de forma significativa com a obesidade nos ameríndios (TRAURIG et al., 2013).

Mattevi et al. (2000) realizaram um estudo nas tribos brasileiras Xavante, Wai Wai, Zoró, Gavião e Suruí, buscando avaliar os polimorfismos no gene LDLR e sua associação com IMC e parâmetros antropométricos. Eles encontraram valores significativos para os polimorfismos no gene LDLR, contudo, não encontraram nenhuma mudança de aminoácidos que justificasse os resultados. Atribuíram esses dados a um possível desequilíbrio de ligação de LDLR com outro gene dentro do cromossomo 19 (MATTEVI et al., 2000).

Já Oliveira et al (2015) em um estudo transversal, entre 2009 a 2011, estimaram a prevalência do excesso de peso entre indígenas da aldeia Jaguapiru, próximo à cidade de Dourados em Mato Grosso do Sul. A predominância do excesso de peso entre os indígenas foi alta, de 1608 indivíduos, 61% apresentavam sobrepeso, dos quais 66% eram mulheres e 34% homens. Outros 33,7% foram considerados obesos e, novamente, as

elevadas taxas de obesos, estavam correlacionadas com as mulheres (Oliveira et al., 2015).

1.2 IMC e RCE como medida para classificação da obesidade

1.2.1 Índice de Massa Corpórea

A definição de obesidade adotada neste trabalho será a mesma da OMS, que a define como o resultado do acúmulo de gordura corporal de forma anormal ou excessiva no tecido adiposo. Essa condição em particular é caracterizada pelo desequilíbrio entre ingestão e gasto de energia, com o qual vários problemas de saúde estão frequentemente relacionados. Entre eles pode-se citar a DMT2, doenças coronárias, hipertensão, neoplasias, disfunções endócrinas, artrites entre outras (BRESSLER et al., 2010; FRANCISCHI et al., 2000; JANKOVIĆ et al., 2012; KOPELMAN, 2000; LEIBA et al., 2017; RAVUSSIN; BOUCHARD, 2000; RE, 2009; "WHO | Obesity and overweight", 2017).

Sob muitos aspectos uma classificação de acordo com o peso é interessante, já que possibilita identificar indivíduos e grupos com maior risco de morbidade e mortalidade, além de permitir a comparação do peso entre e dentro de populações, de forma significativa. Além disso, permite definir prioridades de intervenção a nível individual e de grupo, bem como estabelece uma base firme para avaliar as intervenções ("WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic", 2015).

Atualmente a medida de classificação utilizada para medir o nível de gordura corporal e o risco à saúde em indivíduos adultos, é o Índice de Massa Corpórea (IMC), determinada pela razão entre peso em Kg por altura em m^2. Ele se baseia na premissa de que a variação física de pessoas com mesma altura devido à massa de gordura corporal que cada um apresenta ("WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic", 2015).

A classificação em função do IMC para indivíduos abaixo do peso, normal e com excesso de peso de acordo com a OMS encontra-se na tabela 1. O valor atribuído à obesidade é dado pelo IMC ≥ 30, porém ainda é possível subdividir a obesidade segundo o risco de morte em função do aumento do IMC: tipo I, como IMC entre 30 e 34,9, que apresenta baixo risco; e tipos II e III, também nomeados de obesidade severa e mórbida,

respectivamente, com IMC > 35, que exibem os mais significativos valores do risco de morte.

Tabela 1 - Classificação do Índice de Massa Corpórea (IMC) segundo critérios da OMS, e risco de morte relacionado a doenças clínicas associadas com o aumento de peso (Risco de comorbidades).

Classificação	IMC	Risco de comorbidades
Abaixo do peso	<18,5	Baixo*
Normal	18,5 - 24,9	Médio
Acima do peso	≥25	
Pré-obeso	25 - 29,9	Baixo
Obeso tipo I	30 - 34,9	Moderado
Obeso tipo II	35 - 39,9	Severo
Obeso tipo III	> 40	Muito severo

* Risco de outros problemas clínicos não relacionados a obesidade.

1.2.2 Razão Cintura Estatura

Além do IMC, outro parâmetro que merece destaque na avaliação dos riscos da obesidade à saúde chama-se razão entre da cintura e estatura (RCE). Nesse caso, a premissa é de que a distribuição da gordura corporal é concentrada principalmente na região abdominal (Figura 1), sendo o ponto de corte em geralmente adotado de 0,50 para classificar adultos normais de obesos. Muitos trabalhos focados principalmente em adolescentes e idosos já comprovaram a eficiência da RCE como um indicador da obesidade central (BACOPOULOU et al., 2015; BAUER et al., 2015; CHIARA et al., 2009; HARDY et al., 2017; HAUN; JOSÉ GONDIM PITANGA; LESSA, 2009; NAWARYCZ et al., 2016; PEREIRA et al., 2011) e na população brasileira a mesma tendência foi observada. Vários trabalhos realizados em diferentes populações do Brasil encontraram correlação significativa entre RCE e obesidade central (CHIARA et al., 2009; CORRÊA et al., 2017; HAUN; JOSÉ GONDIM PITANGA; LESSA, 2009; KELISHADI et al., 2016; PEREIRA et al., 2011).

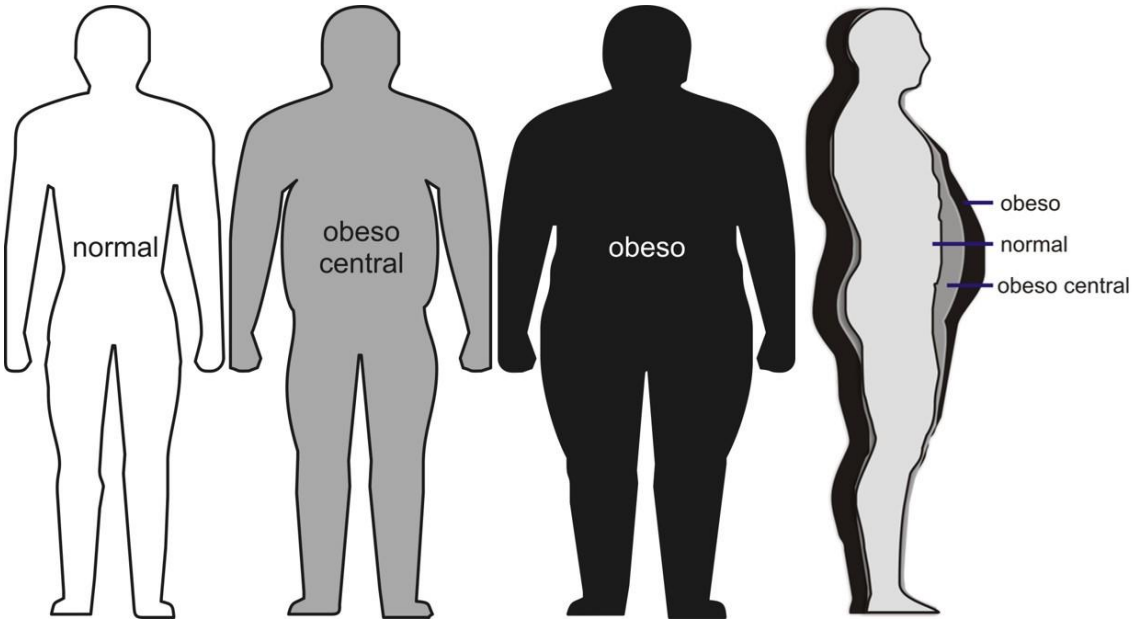

Figura 1 – Esquema de distribuição da gordura corporal diferenciando um indivíduo normal, obeso e obeso central. O indivíduo obeso tem seu valor baseado no IMC, enquanto que o de obesidade central está baseado na relação cintura/estatura.

1.3 Obesidade genética

Considerada multifatorial, a obesidade apresenta tanto fatores genéticos quanto não genéticos. Diferentes mecanismos moleculares, bem como a interação ambiental, comportamental e socioeconômica, tornam o fenótipo heterogêneo (Figura 2), com a severidade da obesidade diretamente proporcional à predisposição genética de cada indivíduo (BOUCHARD et al., 1990; FRANCISCHI et al., 2000; GRUNDY, 1998; HAINER et al., 2000).

No que diz respeito aos aspectos genéticos, trabalhos na literatura com gêmeos monozigóticos corroboram a importância da composição genética para perda ou ganho de peso (ALLISON et al., 1996; BOUCHARD et al., 1990; STUNKARD; FOCH; HRUBEC, 1986). Contudo, estudos mais recentes são discordantes e chamam atenção para a epigenética, que pode possuir forte implicação na manifestação de traços complexos como a obesidade comum, e por isso deve-se ter cautela ao se avaliar somente características genéticas (DALGAARD et al., 2016; FONT-CLOS; ZAPPERI; LA PORTA, 2018; MUNIANDY et al., 2017).

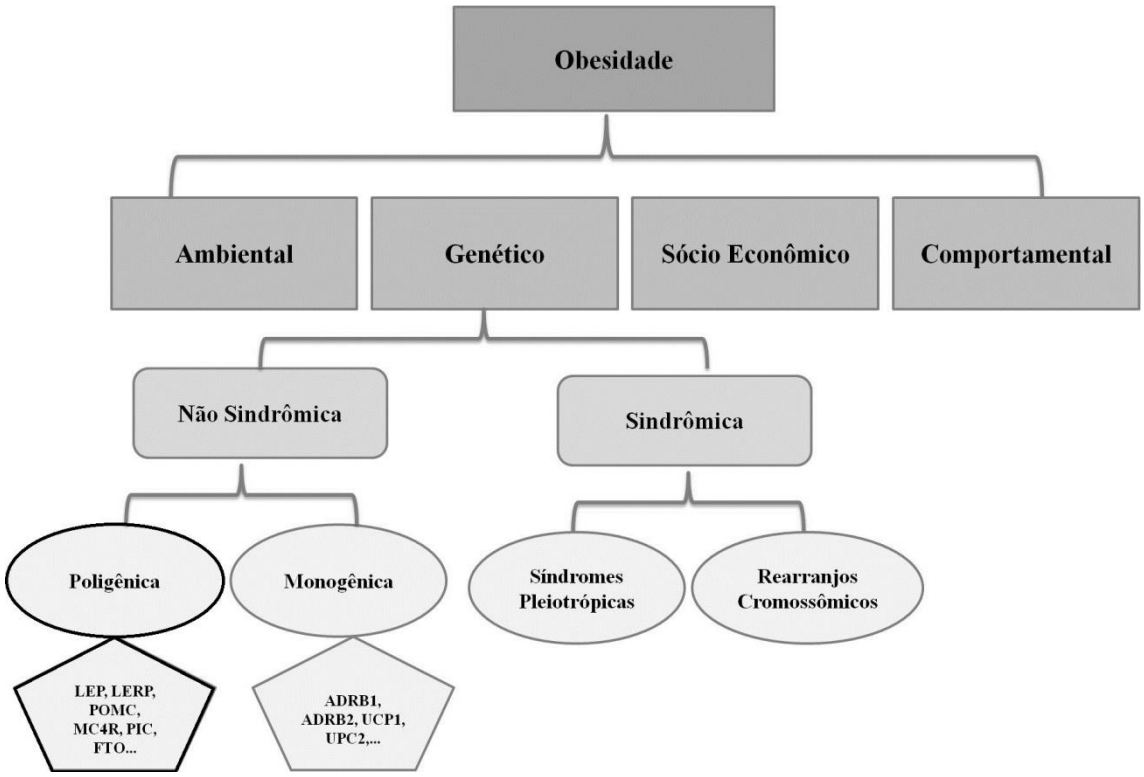

Figura 2 - Fluxograma mostrando os diferentes fatores que podem ocasionar a obesidade. Maior detalhe é dado para o aspecto genético, onde é possível identificar a obesidade poligênica dentro do grupo da obesidade genética não sindrômica.

1.3.1 Obesidade sindrômica

Pode-se agrupar a obesidade genética em: sindrômica e não sindrômica. Dentro das sindrômica, destacam-se eventos de rearranjos cromossômicos e síndromes pleiotrópicas. Esse tipo de obesidade está associada a algumas raras síndromes genéticas, onde a presença de retardo mental é uma característica frequente. Como exemplo, pode-se citar a síndrome de Prader Willi, Alstrom, Bardet-Biedl, Cohen e a lipodistrofia congênita de Beradinelli-Seip (CLÉMENT, 2006; FAROOQI; O'RAHILLY, 2004; HERRERA; KEILDSON; LINDGREN, 2011; ICHIHARA; YAMADA, 2008; SHAWKY; SADIK, 2012; XIA; GRANT, 2013).

1.3.2 Obesidade monogênica

A obesidade monogênica não sindrômica é rara, herdável e ocorre em função de mutações genéticas, que estão relacionados com o armazenamento excessivo de energia, independente das interações que podem haver entre o gene e ambiente. O fenótipo se desenvolve na infância, e pode ser acompanhado por disfunções de: comportamento,

desenvolvimento e endócrina (FAROOQI; O'RAHILLY, 2004). Na literatura existem trabalhos bem consolidados sobre alguns genes que estão diretamente relacioandos com a obesidade monogênica, como por exemplo MC4R, LERP e POMC.

O gene receptor de melanocortina 4 (MC4R), que faz parte da família de receptores de melanocortina, que codifica uma proteína cuja perda de atividade causa obesidade autossômica dominante. Os primeiros estudos da relação do MC4R com obesidade foram realizados por dois diferentes grupos de pesquisadores Vaisse et al. (1998) e Yeo et al. (1998), que encontraram mutações *frameshift* em crianças com obesidade tipo II, e desde então, muitos trabalhos já corroboraram essa descoberta (Dubern et al., 2001; Ma, Tataranni, Bogardus, & Baier, 2004; Reinehr et al., 2009; Shen, Fu, Cheng, Fu, & Ip, 2013; Vaisse, Clement, Guy-Grand, & Froguel, 1998; Yeo et al., 1998).

Clement et al. (1998), por sua vez, estudaram uma família de casamento consanguíneo com nove filhos, dos quais três apresentavam obesidade mórbida precoce. Neles foi encontrada uma mutação homozigótica, que resultava em receptor truncado de leptina. Vários trabalhos já mostraram a participação do gene receptor de leptina (LEPR) na regulação metabólica de gordura, e associado à obesidade (FROGUEL et al., 1998; MAMMES et al., 2001; MARTI et al., 2009; ROMAN et al., 2006).

Mutações no gene POMC, responsável por codificar a proteína proopiomelanocortina, foram relacionadas com obesidade precoce. O trabalho de Krude et al. (1998) associou duas mutações no gene à obesidade, em duas crianças alemãs sem parentesco. Este foi o primeiro caso relacionando defeito genético no gene POMC e obesidade monogênica (Dubern et al., 2008; Krude et al., 1998; Giudice et al., 2001).

1.3.3 Obesidade poligênica

Também conhecida como obesidade comum, a obesidade poligênica exibe um fenótipo que dependerá de fatores ambientais e da predisposição genética do indivíduo. A literatura descreve a existência de sítios específicos de variantes gênicas relevantes, podendo mudar consideravelmente de pessoa para pessoa (Loos & Janssens, 2017; Kumar, & Mahalingam, 2017). É importante ressaltar que a distinção entre obesidade monogênica e poligênica deve ser priorizada, uma vez que elas se originam de fatores de riscos diferentes. Ainda que a obesidade multifatorial seja a mais difícil de predizer, é a

que possui melhor resposta de tratamento (HARDY; SINGLETON, 2009; LOOS; JANSSENS, 2017).

Estudos de associação genômica tornaram-se uma importante ferramenta para a melhor compreensão da obesidade poligênica, uma vez que permitiram a geração de uma enorme quantidade de dados que abrange vastamente o genoma. De acordo com revisões recentes, exitem cerca de 127 genes e mais de 200 variantes relacionadas com a obesidade poligênica, em diferentes populações de diferentes etnias (CHO et al., 2012; CHOQUET; MEYRE, 2011; LOOS; JANSSENS, 2017; SINGH; KUMAR; MAHALINGAM, 2017; WU et al., 2010; XIA; GRANT, 2013).

Assim, modelos genéticos populacionais buscando discriminar obesos de não obesos foram gerados. A combinação de *loci* associados a características morfológicas, especialmente o IMC, receberam uma pontuação de risco, quanto maior a pontuação, maior a suceptibilidade genética de uma pessoa desenvolver obesidade. Contudo, independente da quantidade de *loci* utilizados, os modelos não mostraram aumento da eficiência de discriminação entre obesos e não obesos (Li et al., 2010; Loos & Janssens, 2017; Speliotes et al., 2010).

Loos e Janssens (2017) afirmam que os melhores modelos de capacidade preditiva são os tradicionais. Eles demostraram que fatores como histórico familiar de obesidade ou obesidade infantil, foram mais eficientes em discriminar obesos de não obesos, que modelos baseados somente em variantes identificadas no genoma. Esse padrão também é encontrado em outras doenças poligênicas, como a DMT2 e doenças cardiovasculares (LOOS; JANSSENS, 2017).

Muitos genes já foram descritos tendo um imortante papel na obesidade poligênica, entre eles pode-se destacer o genes FTO, considerado o primeiro a exibir relação com a obesidade comum; a familia GPCR, associados na regulação dos níveis de ocitocinas inflamatórias; a família UCP, relacionados a termogênese; bem como gene SLC6A14, envolvido na regulação do controle do apetite e equilíbrio de energia (Hong, Dimitrov, Pruitt, Shaikh, & Beg, 2014; Oliveira, 2013; Oliveira et al., 2017; Scheid et al., 2014; Scuteri et al., 2007; Vogan, 2014; Wang & Speakman, 2016; Wheeler et al., 2013; Zurbano et al., 2006).

1.4 Marcadores Moleculares

1.4.1 SNP

Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são marcadores genéticos bialélicos e, que podem ser randômicos ou não. Eles compõem a maior classe de marcadores genéticos polimórficos, ocorrendo a cada 300 nucleotídeos em média, o que significa dizer que há cerca de 84,7 milhões de SNPs no genoma humano. Eles se distribuem em blocos, em razão da ocorrência de ligação e fenômenos demográficos, além de serem amplamente distribuídos no genoma, tanto em regiões codificadoras como não codificadoras, tornando-os uma excelente escolha para estudos populacionais associados às mais distintas e complexas características (AL-DAGHRI et al., 2014; AUTON et al., 2015; CHUNG et al., 2009; KWOK; GU, 1999; LOCKE et al., 2015; LOOS, 2012; SALZANO, 2012).

Na literatura, são inúmeros os trabalhos que mostram os SNPs desempenhando um importante papel dentro dos estudos populacionais de traços complexos tais como DMT2, hipertensão, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e obesidade (HARDY; SINGLETON, 2009; HINDORFF et al., 2009; HORIKOSHI et al., 2016; MANOLIO et al., 2009; YANG et al., 2011). Como exemplo, temos Graff et al. (2013) encontraram uma forte relação entre o SNP rs738409 no gene PNPLA3 e o acúmulo de gordura hepática, estudando por genotipagem 2257 indivíduos americanos de origem europeia. O aumento do conteúdo de triglicerídeos intra-hepáticos com ou sem inflamação, conhecida como doença do fígado gordo, está associado à obesidade e à síndrome metabólica (GRAFF et al., 2013). Horikoshi et al (2016) realizaram uma metanálise com objetivo de avaliar a associação do genótipo fetal com o peso ao nascer e sua relação com risco de doenças metabólicas na vida adulta. Eles identificaram 60 *loci* que relacionam o genótipo fetal com o peso ao nascer, além de terem encontrado fortes correlações genéticas inversas entre peso ao nascer e pressão arterial, DMT2 e doenças da artéria coronária (HORIKOSHI et al., 2016). E por fim, um estudo realizado por um consórcio internacional que avaliou uma coorte europeia de 200.000 indivíduos, onde foram identificados 16 novos *loci* relacionados com a pressão arterial. Um escore de risco genético baseado em 29 variantes significativas foi associado com a hipertensão, espessura da parede ventricular esquerda, acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana (INTERNATIONAL CONSORTIUM FOR BLOOD PRESSURE GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES et al., 2011).

No que se refere especificamente a obesidade poligênica, a literatura é bem vasta. Vários trabalhos de associações já correlacionaram diferentes SNPs e características ligadas à obesidade, como regulação da adipogênese, homeostase energética, IMC, entre outras, são descritas em diferentes trabalhos (CELIS-MORALES et al., 2017; CHUNG et al., 2009; FADASON et al., 2017; LEÓN-MIMILA et al., 2013; LI et al., 2014; NICOLETTI et al., 2016, 2017; SHUNGIN et al., 2015; SPIEGELMAN; FLIER, 2001; STRAWBRIDGE et al., 2016; VOGAN, 2014).

Em um trabalho recentemente, Celis-Morales et al. (2017) investigaram a ingestão de gordura e a energia total modificada a associação do perfil genético na obesidade em 48.170 participantes do Reino Unido. Eles encontraram 93 SNPs associados com aumento de IMC e sugerem que a redução de ingestão de gorduras e da energia total apresentam maior influência em indivíduos geneticamente propensos à obesidade (CELIS-MORALES et al., 2017).

Já o grupo de Nicoletti publicaram dois trabalhos interessantes sobre polimorfismos nos genes UCP1 e UCP2. O SNP rs1800592 de UCP1 foi associado à obesidade e distúrbios metabólicos em 150 pacientes obesos do tipo III. Os indivíduos portadores de um alelo mutado G, possuíam menor peso e gordura corporal. Além disso, a existência da homozigose GG indicava menor frequência de DMT2, em comparação com os alelos selvagens (AA+AG) (NICOLETTI et al., 2016). Os mesmos indivíduos foram estudados para os SNPs rs659366 e rs660339 no gene UCP2, os relacionando com a perda de peso e mudanças na composição corporal após cirurgia bariátrica. A presença do alelo mutante, tanto em heterozigose quanto em homozigose para os dois SNPs estava associada com maior perda de peso e de gordura (NICOLETTI et al., 2017).

Enquanto Shungin et al. (2015) utilizando sequenciamento completo do genoma identificaram em 67. 326 indivíduos europeus, 68 *loci* associados à cintura-quadril ajustados para o IMC. Destes, 33 foram considerados novos na literatura e 20 *loci* mostraram significativo dimorfismo sexual, dos quais 19 apresentaram efeito maior em mulheres. Os *loci* foram relacionados com vias da adipogênese, angiogênese, regulação transcricional e resistência à insulina (SHUNGIN et al., 2015).

Assim, pode-se afirmar que estudos populacionais associados às mais distintas e complexas características da obesidade vem proporcionando um melhor entendimento dos mecanismos de atuação da obesidade poligênica. Nesse contexto, é necessário

exclarecer que trabalho será focado somente nos carateres genéticos da obesidade e mais especificamente na obesidade poligênica.

1.4.2 InDels

A ancestralidade individual e populacional obtida por marcadores moleculares é baseada na diferença de frequência de uma ou mais populações fundadoras. Existem diversos marcadores indicativos de ancestralidade (MIAs), cuja natureza molecular e localização genômica determinam a que classe pertencem (MCKEIGUE et al., 2000). Um estudo objetivando determinar a ancestralidade da população do planalto do Equador realizado por Zambrano et al. (2017), exemplifica a eficiência desses marcadores para a caracterização da ancestralidade. Eles analizaram 171 indivíduos não relacionados utilizando 46 InDels autossômicos, onde observaram uma predominância na ancestralidade ameríndia de 63,1%, seguida da europeia e africana com 30,3% e 6,6% respectivamente, em acordo com os antecedentes históricos do Equador (ZAMBRANO et al., 2017).

Existem dois grupos de MIAs: o primeiro é composto por MIAs polimórficos de herança exclusiva materna (DNA mitocondrial - mtDNA) ou paterna (cromossomo Y – NRY) e possuem como principal característica a haploidia não recombinante, o que os caracteriza com excelentes marcadores de linhagens estáveis; o segundo consiste de marcadores autossômicos biparentais, que em função da alta taxa de recombinação, possuem seus haplótipos altamente variados, permitindo a distinção a nível de indivíduo. Fazem parte desse grupo os marcadores moleculares SNPs, InDels (*Insertion-Deletion polymorphisms*) e VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats* incluindo os STRs - *Short Tandem Repeats*) (PENA et al., 2009). Os MIAs também possibilitam sua associação com riscos de doenças na população ou de um certo indivíduo em função de seus fatores genéticos, permitindo uma melhor distinção entre os padrões genéticos ou ambientais de uma determinada doença (MCKEIGUE et al., 2000; MILLS et al., 2011; PENA et al., 2009).

De acordo com o projeto Genoma Humano, foram descobertas milhões de variações ao longo do DNA, das quais 15 milhões são SNPs e 1 milhão são InDels (1 a 50 pb), fazendo dos marcadores InDels o segundo tipo de marcador genético mais comum no genoma humano (Mills et al., 2011). Na literatura, os InDels são amplamente utizados nos mais diferentes estudos, são eficientes na associação a doenças, tais como a fibrose

cística e sindrome do X frágil, assim como na determinação da ancestralidade de diferentes populações, inclusive em populações tri-híbridas como a brasileira, fazendo deles uma execelente escolha em pesquisas relacionadas à ancestralidade (McKeigue et al., 2000; Mullaney, Mills, Pittard, & Devine, 2010; Tsui et al., 1985; Wang, Li, & Hakonarson, 2010).

Bosque-Plata et al. (2004), numa amostra mexicano-americana de 248 indivíduos do Condado de Starr, no Texas, estudaram o gene CAPN10 (associado ao risco de DMT2) utilizando SNPs e InDels. Eles encontraram uma diferença significativa nas frequências de alelos e genótipos entre indivíduos diabéticos e não diabéticos tipo 2, sugerindo que a variação no CAPN10 afeta o risco de DMT2 na população (DEL BOSQUE-PLATA et al., 2004).

1.4.3 Ancestralidade genética brasileira

Sabe-se que o Brasil foi colonizado por diferentes povos - tais como portugueses, holandeses, africanos, japoneses entre outros – que, juntamente com os índios, que em 1500 eram cerca de dois a cinco milhões, contribuíram em diferentes proporções para a atual composição genética da população brasileira. (AZEVEDO, 2008; RIBEIRO, 1995).

Existem dois eventos interessantes que exerceram influência sobre a atual estrutura genética populacional brasileira, que ainda hoje refletem fortemente nosso passado. O primeiro aconteceu logo após a colonização europeia e consiste em uma alta prevalência de filhos oriundos da união entre homens europeus e mulheres com ancestralidade predominantemente africana ou indígena. Esta característica é ainda bem marcante nos dias atuais, sendo a origem cromossômica do Y em brasileiros frequentemente europeia, enquanto que a do mtDNA (cerca de 60%) é frequentemente africana ou ameríndia (ALVES-SILVA et al., 2000; CARVALHO-SILVA et al., 2001; PENA et al., 2000; SALZANO; SANS, 2014; TARAZONA-SANTOS et al., 2016). O segundo evento relevante sobre a mistura racial brasileira se dá pelo fato dela não ser tão aleatória quanto se pensa. Mesmo após cinco séculos de miscigenação, os brasileiros ainda exibem tendência em casar com indivíduos de ancestralidade similar ou de características sociais e sócios econômicas mais semelhantes (TARAZONA-SANTOS et al., 2016).

A partir de artigos publicados sobre a ancestralidade brasileira, utilizando marcadores autossômicos e ligados ao sexo, Salzano e San (2014) estimaram a composição genética

da população brasileira. Dependendo da região analisada, há uma mudança no padrão observado: o sul e o sudeste apresentaram uma influência europeia de até 89%, enquanto que a região com maior contribuição de africanos e ameríndios está no nordeste (até 30%) e norte (até 19%) (SALZANO; SANS, 2014).

No Sudeste, especificamente, os resultados mantêm um padrão, mas dependendo dos marcadores e amostras utilizadas, as proporções genéticas podem variar. Massaro (2009), por exemplo utilizando STRs para determinar a ancestralidade da população de São Paulo, encontrou valores de 49%, 28% e 21% de europeu, africano e ameríndio, respectivamente (MASSARO, 2009). Similarmente, Lebout e Simões (2000) utilizaram marcadores STRs para determinar a ancestralidade de três estados brasileiros (Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco). Para a população do Estado de São Paulo, eles encontraram as seguintes proporções 73% europeu, 14% africano e 13% ameríndio (LEBOUTE; SIMÕES, 2000), enquanto Salzano e Sans (2014) em um artigo de revisão obtiveram uma predominância europeia média de 76,33%, seguido de africana (17%) e ameríndia (6,67%), através de marcadores STRs e MIAs (SALZANO; SANS, 2014).

Tendo em vista a composição tri-híbrida da população ribeirão-pretana, será que SNPs associados a obesidade numa população ameríndia apresentariam a mesma correlação para o desenvolvimento do fenótipo da obesidade em indivíduos de Ribeirão Preto? Sabe-se que novas variantes genéticas baseadas na ancestralidade são os que exibem os melhores resultados de predição da obesidade poligênica (LOOS; JANSSENS, 2017; SINGH; KUMAR; MAHALINGAM, 2017). Essa abordagem permite identificar as variantes raras e de baixa frequência em uma população, sendo estas mais passíveis de serem específicas por ascendência, Além disso, estudos voltados para a caracterização dos padrões gênicos da obesidade em populações tri-híbridas são escassos e podem auxiliar na compreensão dos mecanismos genéticos da obesidade poligênica bem como na busca de alvos terapêuticos e em programas de prevenção contra excesso de peso.

2 HIPÓTESE

Os componentes genéticos associados ao desenvolvimento da obesidade em ameríndios podem ser correlacionados ao fenótipo da obesidade em uma população urbana, sendo identificável por meio de marcadores genéticos específicos, capazes de separar grupos de obesos e não obesos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar um painel de marcadores genéticos a partir do exoma de ameríndio obesos, verificar sua associação em uma coorte urbana e buscar na literatura o papel sobre cada marcador associados com desenvolvimento do fenótipo da obesidade.

3.2 Objetivos Específicos

I. Selecionar um conjunto de polimorfismos, com frequência elevada em indivíduos obesos, que estejam associados a genes de metabolismo de lipídios e características afins;

II. Validação da associação dos polimorfismos com a obesidade em uma coorte urbana de indivíduos obesos e não obesos;

III. Analisar o papel dos alvos na literatura no contexto fisiológico do ganho de peso.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Recrutamento dos participantes

Este estudo consistiu da análise inicial do exoma de oito ameríndios sequenciados durante o projeto de pós-doutorado do Dr. João Farias Guerreiro (dados não publicados). Os ameríndios eram pertencentes a duas tribos , ambas no estado do Pará: A tribo Xikrin do Cateté autodenominados Mebengokré, da família Jê, estão localizados em área banhada pelos rios Itacaiúnas e Cateté no município de Parauapebas, próxima do núcleo urbano de Carajás, com população total de 1.818 indivíduos; e a tribo Asurini do Xingu, autodenominados Waete, pertencente à família Tupi-Guarani, estão situados entre as margens do rio Xingu, Piranhaquara e Igarapé Piaçava, próximo de Igarapé Ipixuna, em Altamira, com população total de 106 indivíduos (BETO; FANY, 2011) (Figura 3).

Os ameríndios selecionados passaram por avaliações prévias antropométricas e nutricionais e apresentavam um processo de transição nutricional avançado, isto é, seus hábitos alimentares eram bem semelhantes aos de populações que residem em centros urbanos, em função da frequente interação com as cidades urbanas próximas às aldeias (Figura 4).

Figura 3 - Localização das tribos Asurini do Xingu e Xikrin do Cateté. Onde foram realizadas as coletas das amostras sanguíneas, pós de avaliações antropométricas e nutricionais dos ameríndios. Esfera em vermelho - Asurini do Xingu, esfera em azul - Xikrin do Cateté. Fonte: Google Maps (https://www.google.com.br/maps). Acessado em 06/11/2017 às 09:55

Figura 4 – Ameríndio representante da tribo Xikrin do Cateté selecionado para o sequenciamento do exoma. Fonte: Guerreiro, JF.

Os ameríndios foram segregados de acordo com seu IMC. o grupo obeso, composto por dois Xikrins e dois Asurinis, e grupo controle, apresentando dois Xikrins e dois Asurinis. O critério de classificação dos grupos seguiu os padrões da OMS, onde para ser considerado controle o ameríndio deveria apresentar o IMC entre 18,5 a 24,9 e para ser considerado obeso o IMC deveria ser ≥ 30. Todos os ameríndios tiveram a confirmação de sua ancestralidade realizada por um conjunto de InDels desenvolvidos por Santos et al (2010) (Tabela 2).

Tabela 2 - Tabela com dados clínicos e de ancestralidade dos ameríndios selecionados para o sequenciamento do exoma.

Grupo	Tribo	Sexo	Id	Glc (mg/dL)	P (Kg)	A (cm)	IMC	Anc EUR	Anc AFR	Anc AME
Obesidade	Xikrin	Fem	18	76	79,7	157	32,33	0,052	0,045	0,903
Obesidade	Asurini	Mas	30	66	92,4	165,5	33,73	0,121	0,01	0,869
Obesidade	Xikrin	Fem	68	139	87,1	160	34,02	0,019	0,006	0,975
Obesidade	Asurini	Mas	25	69	70,8	149	31,89	0,013	0,008	0,979
Controle	Asurini	Mas	31	76,28	60,5	163	22,77	0,002	0,003	0,995
Controle	Asurini	Fem	40	-	61,9	164,9	22,76	0,013	0,033	0,954
Controle	Xikrin	Mas	59	86	63,5	168	22,49	0,019	0,039	0,942
Controle	Xikrin	Fem	32	71,14	54	148,5	24,48	0,081	0,015	0,904

Id – Idade, Glc – Glicose no sangue, P – Peso, A – Altura, IMC – Índice de Massa Corpórea, Anc - ancestralidade, EUR - Européia, AFR - Africana, AME - Ameríndia.

O segundo conjunto de amostras utilizado neste trabalho é originado do projeto “Da saúde perinatal à saúde do adulto jovem: Estudo da coorte nascida entre 1978/79 no hospital de Ribeirão Preto - SP” (BARBIERI et al., 2006) e buscou representar a população urbana brasileira. O projeto teve quatro fases: a primeira fase analisou nas mães e nos recém-nascidos alguns indicadores de saúde perinatal e suas associações com as variáveis sociais e biológicas; a segunda fase aconteceu entre os anos de 1987/89, onde foi analisado o crescimento (peso e altura) das crianças em função das condições sociais e biológicas ao nascer; a terceira fase ocorreu entre 1996/97, envolvendo o estudo das condições de vida e saúde da coorte aos 18 anos de idade, incluindo o crescimento; e por fim, a quarta fase avaliou a importância relativa dos eventos do período pré-natal ao início da vida adulta para o crescimento físico, bem como a determinação do perfil de risco em doenças crônicas não transmissíveis, com ênfase em asma, alergia e problemas cardiovasculares.

Assim, os indivíduos da coorte de Ribeirão Preto utilizados neste trabalho são originados do quarto momento do estudo transversal realizado por Barbieri et al. (2006). Foram selecionados 86 homens e 94 mulheres, que compuseram um total de 180 indivíduos, compondo um grupo misto de 91 obesos e 89 controles. O critério de segregação foi o mesmo utilizados nos ameríndios, o valor do IMC. O grupo controle apresentou IMC com valores variando de 18,9 a 24,9 e grupo obeso exibiu valor de IMC entre 30,0 e 47,5. Indivíduos que apresentavam outros tipos de problemas de saúde, a exemplo, DMT2 e hipertensão, não foram selecionados para este trabalho.

A literatura também descreve outra possibilidade de classificar indivíduos obesos, conhecida como obesidade central, que é baseada na relação da circunferência da cintura e altura em relação ao sexo (94 cm homem, 60 mulheres). Adicionalmente, medidas de altura, cintura, e sexo possibilitaram a análise da obesidade central da coorte de Ribeirão Preto (Apêndice A).

4.2 Considerações Éticas

O projeto do Dr. João Farias Guerreiro, responsável pelas coletas das amostras ameríndias foi aprovado e autorizado pelo Comitê de Ética (CAAE 20654313.6.0000.5172), bem como, o projeto de Barbieri et al. (2006) com os indivíduos da coorte de Ribeirão Preto também obtiveram aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCPR Nº7606/99).

Em função da necessidade da criação de um biorrepositório para este projeto, ainda que o mesmo não tenha realizado coletas de amostras sanguíneas, mas apenas a utilização de um banco de DNA já existente, houve a submissão e aprovação pelo Comitê de Ética (CAAE 74509817.4.0000.5440) (Anexo A).

4.3 Extração de DNA

As coletas e extração do DNA genômico realizadas pelo Dr. João Farias Guerreio das amostras ameríndias, foram a partir de 300 ml de sangue tratado com EDTA (duas alíquotas de cada indivíduo), por meio do *kit- NeoIsoColumn* (Um Lambda Inc., San Diego, CA, USA.), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico da coorte de Ribeirão Preto foi extraído de 100 µl de sangue e utilizou o kit *QIAGEN FlexiGene DNA Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) seguindo as devidas instruções do fabricante. A quantificação de todas as amostras de DNA em ng/µl foi realizada no aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

4.4 Preparo da biblioteca genômica

Para o sequenciamento do exoma ameríndio, realizado pelo Dr. João Farias Guerreiro, foram obtidos previamente oito bibliotecas *paired-end*, preparadas e enriquecidas com posterior clusterização (*cluster generation*). No enriquecimento do exoma, as bibliotecas de DNA genômico foram preparadas utilizando o *kit Nextera Exome Enrichment* (Ilumina Inc. San Diego, CA, USA).

A fragmentação ocorreu com o DNA na concentração de 50 ng/µl, quantificado pelo método fluorimétrico (Qubit). Em seguida, houve a captura e enriquecimento do exoma com um conjunto de sondas de 95 pb, capaz de cobrir de forma geral e abrangente as sequencias exônicas, o que correspondeu a 62 Mb, entre os quais encontravam-se 20.794 genes. Houve então a hibridização das sondas com esferas de estreptavidina, responsáveis por sequestrar as sondas que continham as regiões de interesse. Regiões de ligação não específicas foram excluídas e uma nova hibridização da biblioteca foi realizada com o intuito de aumentar o enriquecimento.

Os *clusters* foram formados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de cada fragmento da biblioteca genômica que se incorporou à superfície da *flow cell*, onde estavam contidos os oligonucleotídeos. Essa amplificação deu origem a grupos

de fragmentos ligados à *flow cell*, utilizando o *TruSeq PE Cluster Generation Kit* v5 (Illumina Inc.San Diego, CA, USA). Em seguida, ocorreu a linearização, onde houve a retirada dos adaptadores, garantindo que a hibridização e o sequenciamento tenham ocorrido somente em uma das fitas de cada *cluster*. Posteriormente, hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos *clusters* linearizados foram bloqueadas, para evitar a adição de substratos de fluoróforos a outros segmentos que não fossem o *primer* de sequenciamento. Por fim, ocorreu a desnaturação, garantindo moldes de fita simples para o sequenciamento.

4.5 Sequenciamento do exoma e mapeamento

O exoma ameríndio foi sequenciado utilizando o *TruSeq SBS kit* v5 (Illumina Inc.), *single-read* (2x76 ciclos) no equipamento *Ilumina Genome Analyzer IIx* (*GAIIx*), baseado na tecnologia Solexa (*Sequencing-by-Synthesis* - SBS), permitindo assim a leitura massiva e paralela (simultânea) das sequências nucleotídicas de milhões de fragmentos de DNA. A tecnologia SBS baseia-se na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal de fluorescência. Por terminação, entende-se a clivagem do nucleotídeo marcado já detectado que possibilita a adição do próximo nucleotídeo. Este processo acontece repetidas vezes, dentro da *flow cell*, o que permite a leitura base a base e ao mesmo tempo a eliminação de possíveis erros em regiões homopoliméricas.

4.6 Análises de bioinformática

A corrida *paired-end* produziu *reads* de 110 pb (2x55pb). Onde atingimos para cada amostra uma profundidade média de 100 x, capaz de identificar novas variantes em baixas frequências.

Os adaptadores foram removidos com o *Scythe software* e a qualidade das *reads* geradas foram avaliadas com o *FastQC software*. Os dois arquivos do sequenciamento *paired-end* foram analisados separadamente. A partir daí, utilizou-se as *reads* que apresentaram *Q-score* maior que 30 (*Phred* ≥ Q 30). As bases que apresentaram *Phred scores* menores que 30 foram retiradas com o *Sickle software*.

Após a filtragem das *reads*, a ferramenta Bowtie2 foi utilizada para o alinhamento contra o genoma humano de referência (GrCh37/hg19). No arquivo alinhado (BAM) foram ordenadas as *reads* com o *Samtools software*. As duplicatas de PCR foram

identificadas e retiradas como o auxílio do *picard software* e as chamada de variantes e de genótipos foram feitas pelo método de contagem direta pelo *Samtools/BCFtools software*. Somente então, um conjunto de SNPs relacionados com a obesidade foi selecionado, para posterior validação nos ameríndios e genotipagem na coorte de Ribeirão Preto.

4.7 Validação

A validação dos dados do exoma ocorreram mediante a realização de PCR em tempo real *(Real-Time PCR – qPCR*) com sondas *TaqMan*®. As sondas foram sintetizadas a partir da pré-análise do exoma ameríndio. A de patogenicidade dos SNPs foram estimadas utilizando quatro ferramentas online: SIFT (*Sorting Tolerant From Intolerant*); PoliPhe-2 (*Polymorphism Phenotyping*), M-CAP (*Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*) e SNAP (*Screening for Non-Acceptable Polymorphisms*).

As sondas exibiram um genótipo selvagem e um mutante, sendo assim, possível identificar nos ameríndios quem era homozigoto e heterozigoto para os dois genótipos. O DNA genômico foi quantificado na concentração de 10 ng/µL, e uma reação de PCR para todos os ameríndios para validar os SNPs encontrados por sequenciamento. Cada reação teve um volume final de 10,0 µL e foi composta por 1X de *Master Mix* da *Taqman probe* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1X de sonda *Taqman*™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) específica para o ensaio, 20 ng de DNA e água até completar o volume final. O programa de termociclagem foi o mesmo para todos os genes, sendo: 1’ a 60°C, 10’ a 95°C e 40 ciclos de 15’’ a 95°C e 1’ a 60°C, e 1’ a 60ºC, com análise das corridas no programa do equipamento *Biosystems 7500 Real-Time PCR System.*

4.8 Genotipagem da população de Ribeirão Preto

A genotipagem da coorte de Ribeirão Preto para o conjunto de SNPs selecionados a partir do exoma ameríndio foi realizada por PCR em tempo real (Real-Time PCR – qPCR), utilizando *Taqman Universal PCR Master Mix* e sondas *Taqman*™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fornecedor.

Todos os experimentos ocorreram em placas de 96 poços apropriadas para a genotipagem no *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e foram analisados no programa do equipamento v 2.0.6™. Cada

reação foi composta por 1X de *Master Mix* da *Taqman probe* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1X de sonda *Taqman*™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) específica para o ensaio, 20 ng de DNA e água até completar o volume final de 10,0 µL. O programa de termociclagem foi o mesmo para todos as sondas, sendo: 1' a 60°C, 10' a 95°C e 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1' a 60°C, e 1' a 60ºC. A genotipagem foi determinada com base nos valores de Ct (*cycle threshold*), este valor refere-se ao ciclo em que a emissão de fluorescência do produto amplificado atinge o limiar (*threshold*) na fase exponencial. Como nos ameríndios, as amostras genotipadas na coorte de Ribeirão Preto apresentaram genótipo selvagem e mutante para cada SNP, onde foi possível distinguir com base nos valores de Ct quem eram os indivíduos homozigotos ou heterozigotos para os alelos selvagens e mutantes.

4.9 Ancestralidade

Alguns representantes da coorte de Ribeirão Preto tiveram sua ancestralidade definidas através de um conjunto de 15 marcadores InDels bialélicos, escolhidos a partir do painel desenvolvido por Santos et al. (2010) (Tabela 3, Apêndice B). Os marcadores selecionados foram baseados nas diferenças de frequências alélicas (>45%) entre populações Africanas, Europeias e Ameríndias, e na Curva de *melting* dos *amplicons*, para otimizar a genotipagem por *High resolution Melting* (HRM).

A técnica de HRM baseia-se na análise pós-PCR, onde é possível realizar a identificação das variações genéticas nas sequências de DNA, como por exemplo inserções e deleções de pares de base (KAMEL; KROC; ŚWIĘCICKI, 2015). Inicialmente, a fita de DNA originada do produto da reação de PCR é dissociada, então corantes saturantes fluorescentes se ligam a cada fita, possibilitando a detecção pelo aparelho. A reação de HRM para todos os InDels apresentou um total de 40 ciclos compostos de: desnaturação das moléculas de DNA, intercalação do corante e amplificação. A análise foi baseada na composição, comprimento, quantidade de GCs e complementaridade entre as duas fitas de DNA de cada indivíduo.

A reação de HRM foi realizado em placas de 96 poços (N8010560, *Applied Biosystems*) apropriadas para o aparelho *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) onde aconteceram as análises de InDels utilizando o *High Resolution Melt software* v 3.0.1. Para cada poço da placa foi utilizado

um mix que continha 5X de *MeltDoctor*^{tm} (*Applied Biosystems*), 0,18 nM de *primer* (*forward* e *reverse*) e água *MiliQ*. As reações continham um volume final de 20 µl, onde em cada poço, foram adicionados 18 µl do mix citado anteriormente e 20 ng do DNA da amostra a ser analisada. O programa utilizado para o HRM apresentou os seguintes estágios: 1' a 60°C, 10' a 95°C, 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1' XºC, e 1' a 60ºC. Em função da necessidade específica que cada InDel necessitou na fase de anelamento, a temperatura variou de 56 a 61°C dentro do conjunto de marcadores de ancestralidade utilizados neste trabalho (Tabela 3).

Os indivíduos representantes das populações europeia, africana e ameríndia utilizados neste trabalho foram os mesmos utilizados por Santos et al (2010). Um arquivo com os respectivos alelos para o conjunto dos 15 InDels selecionados foi cedido, sendo eles a base de segregação das análises de ancestralidade para os indivíduos selecionados na coorte de Ribeirão.

4.10 Sequenciamento Sanger

Todos os indivíduos que apresentaram curvas de *melting* diferentes dos controles foram sequenciados no sequenciador automático 3500 XL *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). A reação de sequenciamento foi realizada com 2 µl do produto de PCR dos InDels, 1 ul *primer* (3,2 pM), 2ul de *Big Dye Terminator* v 3.1 *cycle*, 2 µl de 5X buffer (*Applied biosystems*) e água *MiliQ* para completar o volume final de 10 µl. A reação de sequenciamento ocorreu inicialmente à temperatura de 95ºC por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 51°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A análise das sequências ocorreram no *Geneious software* v 10.2.3 (KEARSE et al., 2012), que consistiu no alinhamento de cada indivíduo, que foi possibilitou verificação da inserção ou deleção na região de acordo como a descrição de Santos et al. (2010).

Tabela 3 - Conjunto de marcadores InDels informativos de ancestralidade desenvolvidos por Santos (2010) e selecionados para o desenvolvimento deste trabalho.

ID	Chr	T	ºC	Alelos	Frequência alélica		
				Indel 1/ Indel 2	AFR	EUR	AME
MID93	22	3	61	146-149	0,206	0,772	0
MID99	22	6	58	132-138	0,786	0,439	0,99
MID619	7	3	60	198-201	0,817	0,269	0,94
MID682	9	3	60	173-176	0,431	0,904	0,624
MID856	5	26	56	256-282	0,437	0,849	0,254
MID1176	5	3	60	149-152	0,913	0,309	0,242
MID1357	14	4	59	95-99	0,116	0,716	1
MID1726	1	13	56	243-256	0,167	0,672	,612
MID2011	2	5	60	192-197	0,197	0,734	0,817
MID196	6	3	60	112-115	0,594	0,494	0,035
MID273	17	4	59	137-141	0,191	0,672	0,998
MID476	9	3	61	167-170	0	0,328	0,854
MID778	16	3	60	197-200	0,771	0,787	0,335
MID1603	5	4	57	234-238	0,088	0,391	0,979
MID1952	15	4	57	96-100	0,163	0,291	0,845

ID - Identificação dos InDels; Chr - localização cromossômica; T - Tamanho da inserção/deleção; ºC – Temperatura em Celsius; Frequência alélica populacional: AFR - Africana, EUR - Europeia, AME - Ameríndia.

4.11 **Análises dos dados**

A patogenicidade de todos os SNPs foi predita usando as plataformas online SIFT, PolyPhen-2, M-CAP e SNAP (ADZHUBEI et al., 2010; BROMBERG; ROST, 2007; JAGADEESH et al., 2016; KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009). O desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs foi realizado no *Genepop software* v 4.2 e visualizado no *Haploview software* v 4.2 (BARRETT et al., 2005; RAYMOND; ROUSSET, 1995). Utilizando o R *software* (R CORE TEAM, 2017), foi gerado um *oncoPrint* das amostras ameríndias, exibindo para todos os SNPs o tipo de mutação, efeito da mutação, patogenicidade e a classificação dos ameríndios em relação ao IMC.

O banco de dados públicos do *Ensembl* (http://www.ensembl.org/index.html) permitiu que fossem comparadas as frequências alélicas da população de Ribeirão Preto com a população mundial presente no banco. Utilizamos o R *software* (R CORE TEAM, 2017) para realizar a Análise de Componentes Principais (PCA) na coorte de Ribeirão Preto, com o intuito de verificar a sensibilidade do conjunto de SNPs selecionados neste trabalho em separar obesos e controles. Para encontrar os SNPs que mais contribuíam para o aumento do IMC, foi realizado o cálculo de regressão logística condicionada para frente no Biostat *software*, buscando avaliar quais SNPs melhor contribuíam para a diversidade genética da coorte de Ribeirão Preto (AYRES et al., 2007). Além disso, foram realizados testes de associação na plataforma online SNPstats (https://www.snpstats.net/start.htm) para os SNPs selecionados e a coorte de Ribeirão Preto, adotando como resposta fenotípica o IMC e Obesidade Central (OC). Os valores

de significância para os dados obtidos nessa plataforma foram determinados pelo p-value (≥ 0,5) e odds ratio (95% IC - Intervalo de Confiança). Somente foram considerados os valores que apresentavam significância estatística em ambos os testes (SOLE et al., 2006). Com o *Structure software* determinamos a ancestralidade do indivíduos selecionados na coorte de Ribeirão Preto, verificando assim sua característica tri-híbrida (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ancestralidade

Os InDels, marcadores de ancestralidade, utilizados neste trabalho mostraram-se eficientes na detecção dos componentes genéticos ameríndios, europeus e africanos para os indivíduos da coorte de Ribeirão Preto que tiveram sua ancestralidade inferida, com base na frequência do conjunto de InDels aqui selecionados (Tabela 4). Assim, pode-se afirmar para os indivíduos selecionados da coorte de Ribeirão Preto que tiveram sua ancestralidade inferida, há predominantemente ancestralidade europeia, seguida de ameríndia e africana, nos valores de 87%, 9% e 4%, respectivamente (Figura 5; Figura 6; Apêndice C).

Tabela 4 - Frequência da ancestralidade de cada população utilizando 15 InDels desenvolvidos por Santos et al (2010).

População	AME	EUR	AFR
AFR	0,011	0,03	0,959
EUR	0,017	0,961	0,023
AME	0,983	0,009	0,008
RP	0,09	0,866	0,044

AME - Ameríndio, EUR - Europeu, AFR - Africano, RP - Ribeirão Preto

Resque et al. (2010), utilizando InDels ligados ao cromossomo X na população brasileira, estimou para a região sudoeste 38% e 35% de ancestralidade europeia e africana respectivamente, e uma menor contribuição ameríndia (28%). Em outro trabalho publicado pelo mesmo grupo em 2016, caracterizou-se a ancestralidade da população brasileira utilizando marcadores SNP ligados ao cromossomo Y, encontrando 88% de ancestralidade europeia, 8,7% de africana e 3,3 % ameríndia, com a região sudeste, apresentando o mesmo padrão para ambos os trabalhos (Resque et al., 2016; Resque et al., 2010).

Santos et al. (2010) realizaram um estudo de ancestralidade utilizando 48 InDels na genotipagem da população do sul do Brasil, e da região amazônica brasileira representada, por Belém e uma comunidade afrodescendente, tendo como base 189 indivídos de origem africana, 161 europeus (principalmente portugueses) e 243 ameríndios (reigão amazônica basileira). Os resultados encontrados por eles foram concordantes para a comunidade afrodescente, cuja predominância na ancestralidade africana variou de 66% a 71%. A população do sul do Brasil exibiu uma maior contribuição europeia, de 71% a 95% e a população de Belém foi a que revelou maior

miscigenação, variando a ancestralidade afrincana entre 5% a 47%, a europeia de 26% a 86%, e amerindia de 9% a 68% (SANTOS et al., 2010).

O padrão observado de ancestralidade pode mudar dependendo do tipo de marcador selecionado para o estudo. Dessa forma, o padrão encontrado para os 15 InDels utilizados neste trabalho está dentro do esperado para a população de Ribeirão Preto, uma vez que corrobora com a história da população, que sofreu uma forte influência europeia no início de sua colonização, seguida da africana, devido aos escravos trazidos para trabalhar na lavoura de café e da ameríndia (RAFAEL; SANTOS, 2006).

A inversão de posição referente aos ameríndios e africanos na composição genética da coorte de Ribeirão Preto encontradas neste trabalho, pode ser justificada pelo maior poder de acurácia do conjunto de InDels (cinco), que eram de maior frequência alélica na população de origem ameríndia, em relação aos InDels (cinco) representantes da população africana. Dessa forma, seria necessário a adição de mais marcadores africanos para ter maior eficiência, muito embora os valores não tenham sido muito discrepantes.

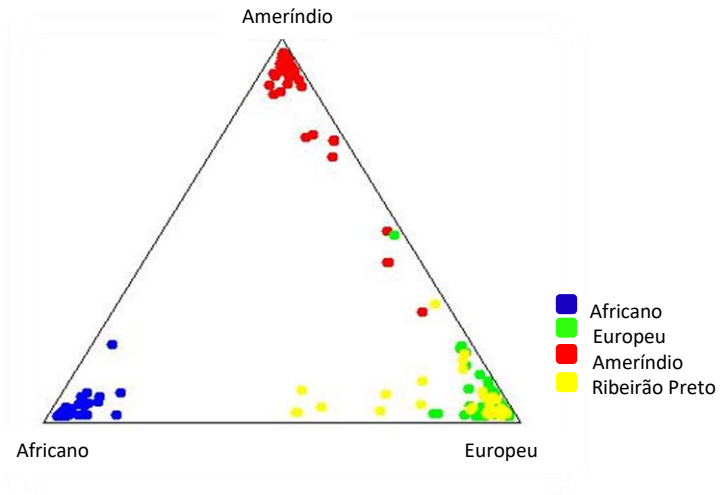

Figura 5 – Agrupamento dos indivíduos da coorte de Ribeirão Preto de acordo com sua ancestralidade para os 15 marcadores InDels descritos por Santos et al. (2010).

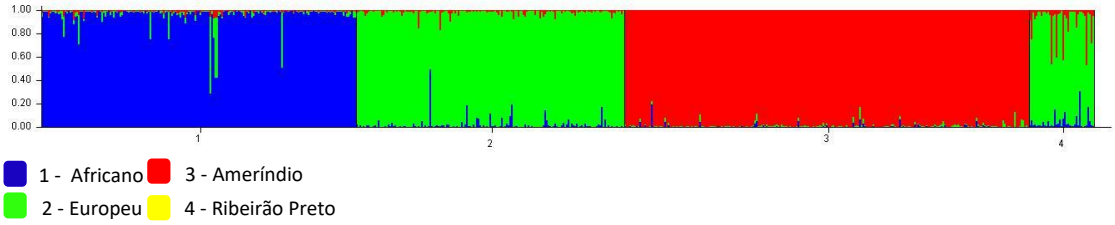

Figura 6 – Composição genética ancestral da coorte de Ribeirão Preto, obtida a partir de 15 InDels desenvolvidos por Santos (2010). Nota-se a predominância da composição genética europeia (verde) na coorte de Ribeirão Preto, seguido de ameríndia (vermelha) e africana (azul) respectivamente.

5.2 Caracterização dos SNPs

Foram selecionados para este trabalho 17 SNPs associados com a obesidade, isto é, aumento do IMC, originados a partir do sequenciamento do exoma de oito ameríndios, realizado pelo Dr. João Farias Guerreiro (dados não publicados). Todos os SNPs apresentaram mutações não sinônimas, com rs3732378 e rs2277552 exibindo valores de predição considerados patogênicos, onde a mudança da base nitrogenada altera o aminoácido e pode afetar a função da proteína. Os SNPs foram validados nos ameríndios, utilizando sondas específicas para cada região, confirmando assim todas as mutações encontradas por sequenciamento (Tabela 5; Figura 7).

Tabela 5 - Características moleculares dos SNPs associados com a obesidade selecionados a partir do sequenciamento do exoma ameríndio (Guerreiro - dados não publicados) e sua relação com a patogenicidade.

ID	Gene	Chr	MNS	BM	SIFT	Poly Phen-2	M-CAP	SNAP
rs1824152	CPAMD8	19	His593Arg	A>G	----	----	----	----
rs3745335	CPAMD8	19	Asp586Glu	C>A	---	----	----	----
rs3732378	CX3CR1	3	Thr280Met	C>T	Sim	Sim	Sim	Sim
rs8133052	CBR3-AS1	3	Cys4Tyr	G>A	----	----	----	----
rs34562867	IGFLR1	19	Trp189Arg	T>C	----	----	----	----
rs1702003	ACOT11	1	Gly202Asp	G>A	----	----	----	----
rs2227278	ZBTB32	19	Arg174Ser	A>C	----	----	----	----
rs2277552	NOX5	15	Arg548His	G>A	Sim	Sim	Sim	Sim
rs3731900	FAM134A	2	Pro419Gln	C>A	----	----	----	----
rs2297792	UBQLN4	1	Ile475Met	C>T	----	----	----	----
rs117372288	KIR3DL3	19	Val168Ile	G>A	----	----	----	----
rs744224	IQGAP3	1	Arg663Cys	C>T	----	----	----	----
rs3743093	SPESP1	15	Gly191Glu	G>A	----	----	----	----
rs6887	CCDC159	19	Cys278Ser	G>C	----	----	----	----
rs2287345	ERLEC1	2	Val318Leu	G>C	----	----	----	----
rs1043160	CNPPD1	2	Ile262Thr	T>C	----	----	----	----
rs231591	MLL4	19	Asp2364Gly	A>G	----	----	----	----

ID - Identificação do SNP, Chr - Localização cromossômica, MNS - Mutação não sinônima (com indicação do aminoácido alterado), BM - Base Mutada, Preditor de patogenicidade - SIFT, Poly Phen-2, M-CAP, SNAP, Sim - Patogênico.

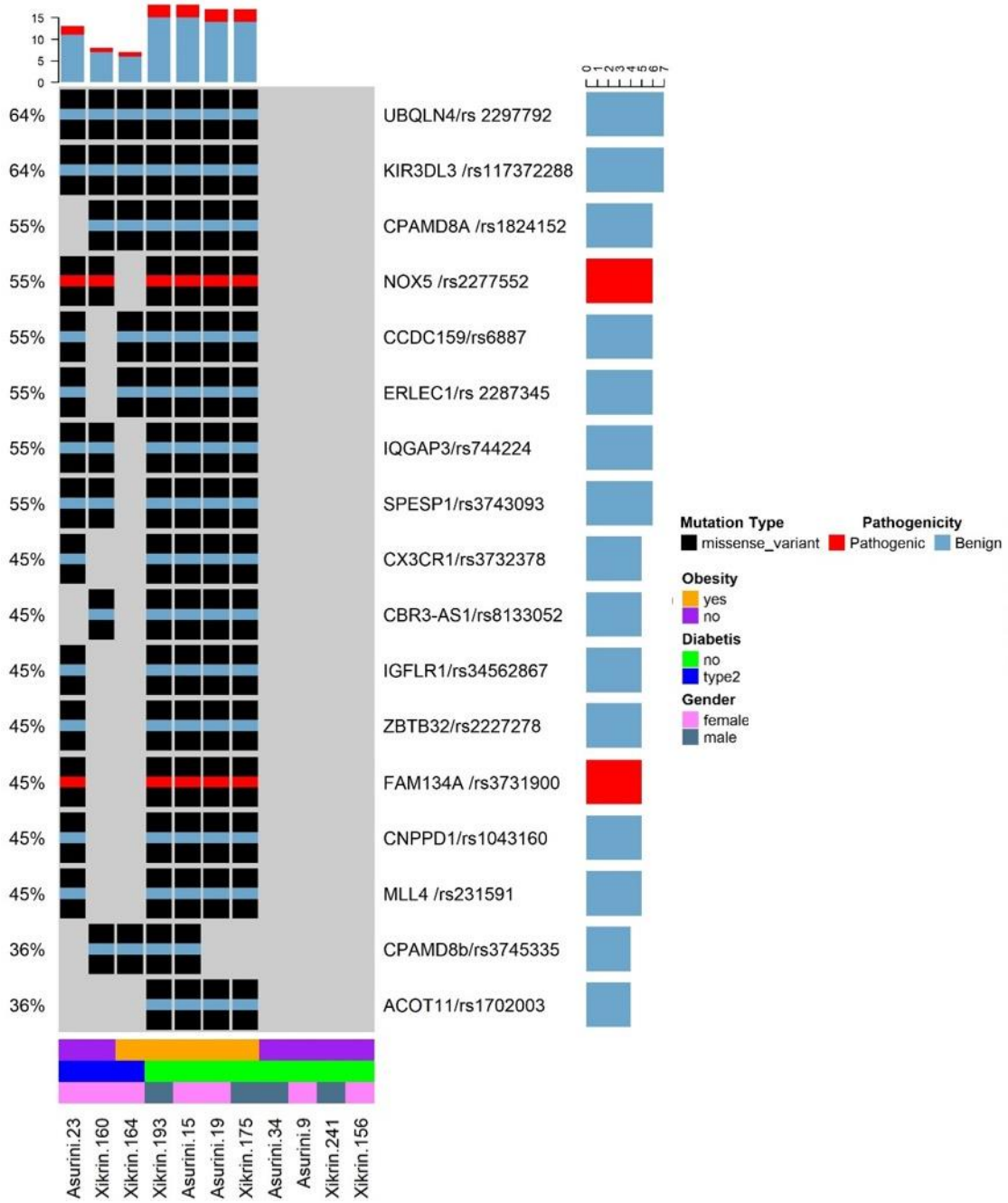

Figura 7 - Onconprint contendo as informações clínicas e mutacionais dos 17 SNPs selecionadas a partir do exoma indígena e relacionados à obesidade. Os SNPs foram identificados de acordo com os seus respectivos genes; tipo de mutação: patogênica (vermelho) ou não patogênica (azul); quais mutações cada indivíduo ameríndio apresentou; gênero: homem (azul escuro) e mulher (rosa); e classificação quanto ao fenótipo: Obesidade (laranja), DMT2 (azul) e normal (verde/roxo). Os indivíduos que apresentavam DMT2 e obesidade/DMT2 foram descartados das análises posteriores.

Uma pesquisa abrangente na literatura foi realizada, buscando informações relacionadas com obesidade nos genes onde os SNPs estão localizados. ACOT11, SPESP1, CX3CR1 e NOX5 foram associados diretamente à obesidade. Sendo este último também relacionado com hipertensão arterial (ADAMS et al., 2001; COMUZZIE et al., 2012; LEE et al., 2007; PANDEY et al., 2012; SIROIS-GAGNON et al., 2010).

Adams et al. (2001) analisaram a expressão de mRNAs no tecido adiposo marrom de murinos, onde encontraram altos níveis de expressão do gene BAT, ortólogo do ACOT11. Os resultados foram associados com aumento de gordura corporal e obesidade induzida por dieta, que são potencializados com o déficit da sua atividade gênica potencializa essas características (ADAMS et al., 2001).

Lee et al. (2007) demonstraram que baixos níveis de expressão do gene SPESP1 em ossos de ratos aumentou a bioatividade de osteocalcina, que levava ao aumento da taxa proliferativa das células β no pâncreas, o gasto de energia celular, a sensibilidade à insulina, o aumento da adiponectina e a diminuição da obesidade (Lee et al., 2007)

De acordo como a literatura, o gene CX3CR1 está relacionado com a sinalização de leucócitos e sua migração para locais inflamatórios. Além disso, ele está associado a diversas doenças inflamatórias, tais como hipertensão, artrite reumatoide e asma. CX3CR1 também apresenta polimorfismos associados com proteção ao ganho de peso (DASTANI et al., 2012; IMAI et al., 1997; MCDERMOTT et al., 2003; SIROIS-GAGNON et al., 2010; TIMOFEEVA et al., 2006; TREMBLAY et al., 2006; VOLIN et al., 2001).

Comuzzie et al. (2012) através do sequenciamento do exoma de crianças hispânicas, cujas famílias eram obesas, encontraram variantes genéticas que influenciam a obesidade infantil. Entre as novas variantes estavam seis SNPs localizados em NOX5 apresentando forte relação com o percentual de gordura corporal e leptina (PANDEY et al., 2012). De forma alternativa, Pandey et al. (2012) estudaram funcionalmente o NOX5 e suas variantes originadas de *splice*. Eles encontram uma forte interação do gene com a produção de espécies reativas de oxigênio, que em alta concentração foram associadas a doenças cardiovasculares como a hipertensão (PANDEY et al., 2012).

A obesidade também pode apresentar uma correlação muito próxima com outros fenótipos, tais como DMT2 e hipertensão. Dessa forma os genes IQGP3, CPAMD8 e ERLEC1 foram associados de forma indiretamente, uma vez que IQGP3 já foi descrito

relacionado com DMT2, enquanto que CPAMD8 e ERLEC1 com hipertensão e aumento de peso, respectivamente (Tabela 6).

O gene IQGAP3 é membro da família IQGAP, sendo relacionado, de acordo com a literatura, com a proliferação celular e longevidade. Klochendler et al. (2016) utilizando camundongos transgênicos, associaram o gene IQGAP3 à proliferação de células β do pâncreas, local onde é produzida a insulina, o que de forma indireta corrobora com os resultados aqui encontrados, uma vez que resistência à insulina pode levar ao ganho de peso (CASTILLO-HERNANDEZ et al., 2017; FLACHSBART et al., 2010; KLOCHENDLER et al., 2016).

Sabe-se também que a obesidade também pode estar ligada a outros fatores como doenças coronárias e pressão alta (JOKINEN, 2015; RE, 2009) e nesse contexto, Muehlschlegel et al. (2012) estudaram o gene F2RL3 e sua associação com lesão miocárdica. Eles identificaram o SNP rs773857, localizado na região 3' UTR do gene F2RL3 sobreposto ao éxon do gene CPAMD8. Nesse estudo foi demonstrado que indivíduos homozigotos para esse SNP apresentavam aumento na contagem de plaquetas, relacionando-o com a pressão sanguínea, porém não houve a determinação de qual gene era de fato o responsável pelo fenótipo (MUEHLSCHLEGEL et al., 2012).

Em 2016, Nebendalh et al. demostraram que a alimentação pode afetar epigeneticamente a regulação gênica em ninhadas de porcos. Dois grupos, um com baixo peso e outro com peso normal foram submetidos a três semanas de restrição alimentar, com subsequente normalização da alimentação. A diferença no metabolismo entre os grupos mostrou-se acentuada, além da grandes diferenças nos níveis de acetilação da histona 3 na lisina 9 (H3K9ac) em genes tais como GALNT2 e ERLEC1, que resultou no ganho de peso para o grupo que inicialmente foi exposto a restrição alimentar (NEBENDAHL et al., 2016).

Tabela 6 - Genes selecionados a partir do conjunto de SNPs que possuem artigos publicados na literatura associando-os com obesidade e fenótipos correlacionados.

Gene	Sinônimos	Fenótipos	Artigos
CX3CR1	V28, CCRL1, GPR13, CMKDR1, GPRV28, CMKBRL1	Obesidade	(Sirois-Gagnon et al. 2010)
ACOT11	BFIT, THEA, THEM1, STARD14	Obesidade	(Adams et al. 2001)
NOX5	NADPH Oxidase 5	Obesidade Hipertensão	(Comuzzie et al. 2012) (Pandey et al., 2012)
SPESP1	ESP, SP-ESP	Obesidade	(Lee et al. 2007)
ERLEC1	C2orf30, CIM, CL24936, CL25084, HEL117, XTP3-B, XTP3TPB	Ganho de peso	(Nebendahl et al. 2016)
IQGAP3	-	DMT2	(Xu et al. 2016)
CPAMD8	VIP, K-CAP	Pressão sanguínea	(Muehlschlegel et al. 2012)

Uma busca mais refinada na literatura foi realizada, com intuito de verificar se já existiam informações específicas para os 17 SNPs aqui selecionados, os correlacionando com a obesidade. Somente rs3732378 e rs1702003 já haviam sidos descritos especificamente para o fenótipo da obesidade, onde rs8133052 foi associado a DMT2 (Tabela 7).

Shah et al. (2011) verificaram a ação da fractalquina (CX3CL1) e seu receptor (CX3CR1) no papel da inflamação do tecido adiposo e da DMT2. O SNP rs3732378 localizado no gene CX3CR1, foi associado tanto a traços adiposos e metabólicos, bem com a DMT2 nos pacientes estudados. Braga (2014), entretanto, não viu associação direta do SNP com a obesidade, mas encontrou associação indireta do gene CX3CR1 (BRAGA, 2014; SHAH et al., 2011).

Entre os dados obtidos por Gregory et al. (2006) após sequenciar o final do cromossomo 1, para o gene ACOT11 o rs1702003 junto de rs2304306 e rs2304305 foram relacionados com a enzima tioesterase. Em camundongos esta enzima é expressa no tecido adiposo, sendo relacionada com obesidade por seus autores (GREGORY et al., 2006)

Chang et al. (2012) avaliaram 61 SNPs para a DMT2. Eles encontraram o polimorfismo no gene CBR3-AS1 (rs8133052), fortemente associado ao risco de DMT2 e resistência à insulina na população chinesa. Também inferiram que esse polimorfismo possivelmente media a modulação da adipogênese (CHANG et al., 2012).

Tabela 7- Dados da literatura associados à obesidade e fenótipos correlacionados, para o conjunto de SNPs selecionados neste trabalho.

Gene	ID	Fenótipo	Artigo
CX3CR1	rs3732378	Obesidade	Shah et al., 2011
		Obesidade	Braga, 2014
CBR3-AS1	rs8133052	DMT2	Chang et al., 2012
ACOT11	rs1702003	Obesidade	Gregory et al., 2006

ID = Identificação do SNP.

5.3 Genotipagem

A genotipagem da coorte de Ribeirão Preto (RP) utilizou os 17 SNPs selecionados após o sequenciamento do exoma ameríndio. As frequências alélicas mutantes de cada SNP foram comparadas com as frequências das populações disponíveis no banco de dados *Ensembl* (Tabela 8). As diferenças nos valores das frequências alélicas variaram de acordo com a população comparada. Por exemplo, quando se comparava as frequências alélicas observadas na coorte de Ribeirão Preto com a da população americana, somente quatro SNPs (rs1824152, rs744224, rs1043160 e rs231591) não apresentavam valores semelhantes. Da mesma forma que comparando a coorte de Ribeirão Preto e a população mundial, cinco SNPs (rs8133052, rs1702003, rs1702003, rs744224 e rs1043160) exibiam grandes diferenças em seus valores. Vale ressaltar que não foi possível comparar os valores de rs117372288, uma vez que não havia informações das frequências alélicas no *Ensembl*.

Tabela 8 - Frequência alélica mutante em porcentagem para todos os SNPs selecionados neste estudo na coorte de Ribeirão Preto e do banco de dados *Ensembl.*

ID	RP	AMR	AFR	LA	EUR	SA	Total
rs1824152	59%	40%	92%	56%	38%	41%	57%
rs3745335	29%	30%	50%	28%	29%	31%	35%
rs3732378	11%	16%	1%	3%	17%	11%	9%
rs8133052	50%	49%	25%	43%	45%	29%	37%
rs34562867	11%	10%	9%	9%	12%	12%	10%
rs1702003	91%	88%	46%	82%	96%	74%	74%
rs2227278	89%	90%	91%	91%	88%	88%	90%
rs2277552	7%	7%	14	18%	1%	1%	9%
rs3731900	49%	40%	24%	24%	64%	57%	41%
rs2297792	44%	45%	62%	86%	40%	45%	57%
rs117372288	55%	-	-	-	-	-	-
rs744224	72%	36%	30%	57%	26%	57%	41%
rs3743093	46%	54%	36%	54%	41%	54%	47%
rs6887	63%	63%	55%	72%	55%	70%	62%
rs2287345	5%	13%	9%	17%	7%	10%	11%
rs1043160	48%	59%	73%	77%	38%	42%	59%
rs231591	44%	57%	15%	50%	52%	29%	38%

ID = Identificação do SNP; RP = Ribeirão Preto; AMR = Americana; AFR = Africana; LA = Leste asiático; EUR = Europeu; SA = Sul asiático.

Em seguida os SNPs foram submetidos a análise de Desequilibro de Ligação (DL), utilizando o Teste Exato de Fisher. O DL tem como objetivo verificar se há associação significativa entre dois alelos de *loci* diferentes - quanto menor é a probabilidade, menos independente os alelos se encontram e maior é o DL (GUPTA; RUSTGI; KULWAL, 2005; SLATKIN, 1994; ZAPATA; VISEDO, 1995). Quatro SNPs: rs1824152, rs3745335, rs2227278 e rs34562867 apresentaram DL (Figura 8, Apêndice D, Apêndice E). Os resultados eram esperados, uma vez que o rs1824152 e o rs3745335 (D = 0,1662) estão localizados no mesmo gene CPAMD8, enquanto que os SNPs rs2227278 e rs34562867 (D = 0,1051), ainda que estejam localizados em genes diferentes (ZBTB32 e IGFLR1 respectivamente) encontram-se próximos no cromossomo 19.

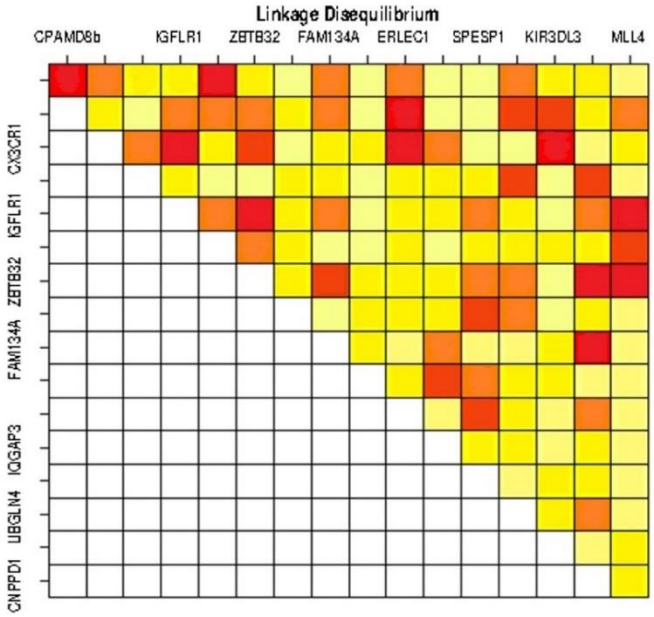

Figura 8 - Análise do desequilíbrio de ligação entre os SNPs. Utilizando o p-valor (teste exato de Fisher) associado ao D para determinar se os SNPs apresentam-se em desequilíbrio. Vermelho – altamente significativo, marrom – significativo, amarelo e bege – sem significância.

Em seguida, para verificar o quão sensível é o conjunto de SNPs selecionados neste trabalho, isto é, se são capazes de agrupar os obesos e os controles separadamente, foi realizado uma análise de componentes principais (PCA). Este método reduz a massa de dados com a menor perda possível de informações, combinando todas as variáveis originais independentes entre si e retendo o máximo de informações, em termos de variação total contida nos dados (VARELLA, 2008).

A PCA gerada a partir dos SNPs na coorte de Ribeirão Preto mostrou que o conjunto de marcadores genéticos selecionados não foi capaz de separar o grupo dos obesos e controles (Figura 9).

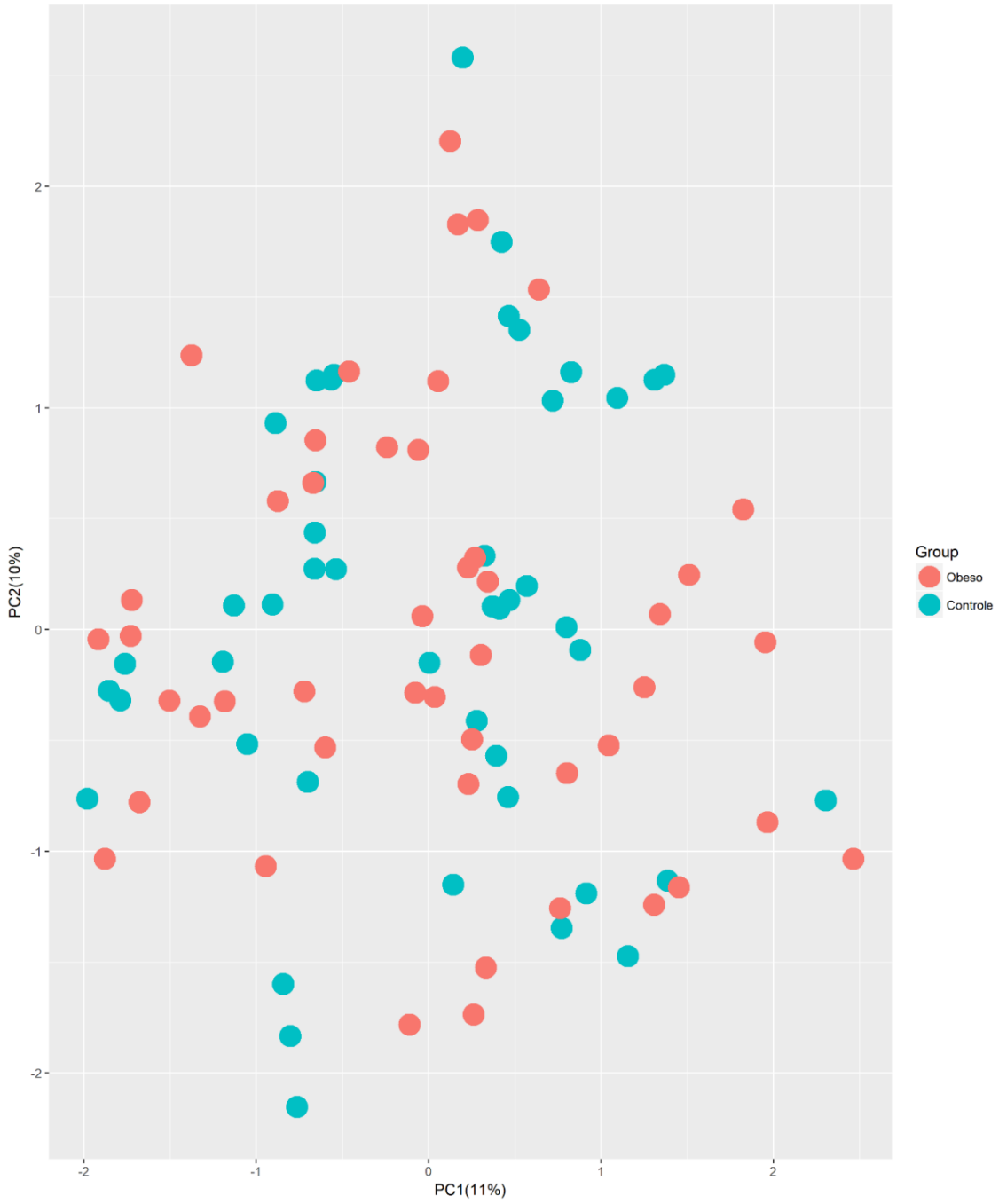

Figura 9 - PCA utilizando o conjunto de 17 SNPs na coorte de Ribeirão Preto. Note-se que o grupo controle (azul) e o grupo de obesos (vermelho) estão bem misturados não havendo, portanto, segregação.

Com o intuito de avaliar quais SNPs eram os mais informativos e adequados para explicar a maior parte da diversidade genética na coorte foi realizada uma análise de regressão logística condicionada para trás que permite verificar quais SNPs poderiam estar mais relacionados com o fenótipo da obesidade na coorte de Ribeirão Preto. Foram adotados o Modelo Dominante (MD) e o Modelo Recessivo (MR), com a distinção do grupo de obeso e controle dentro de cada modelo. Para o MD, indivíduos considerados mais propícios à obesidade deveriam apresentar o alelo mutado em homozigose ou herozigose. No MR, apenas os indivíduos que possuíam o alelo mutado em homozigose, apresentariam maior probabilidade de manifestar o fenótipo da obesidade.

Quando o MD foi assumido para a coorte de Ribeirão Preto, os SNPs que explica 11,93% da diversidade genética relacionada com a obesidade foram: rs1824152, rs6887, rs2277552, rs2227278, rs3745335, rs231591 e rs34562867 ($p<0,05$). Para o MR houve uma baixa variação genética associada ao fenótipo da obesidade, onde o p não foi significativo (Apêndice F e Apêndice G).

Uma nova PCA foi gerada, somente com os SNPs que apresentaram p-valor significativo ($p<0,05$). Ainda que uma sutil mudança na agregação dos grupos tenha sido notada, esta não foi suficiente para que houvesse a separação entres os grupos obeso e controle (Figura 10).

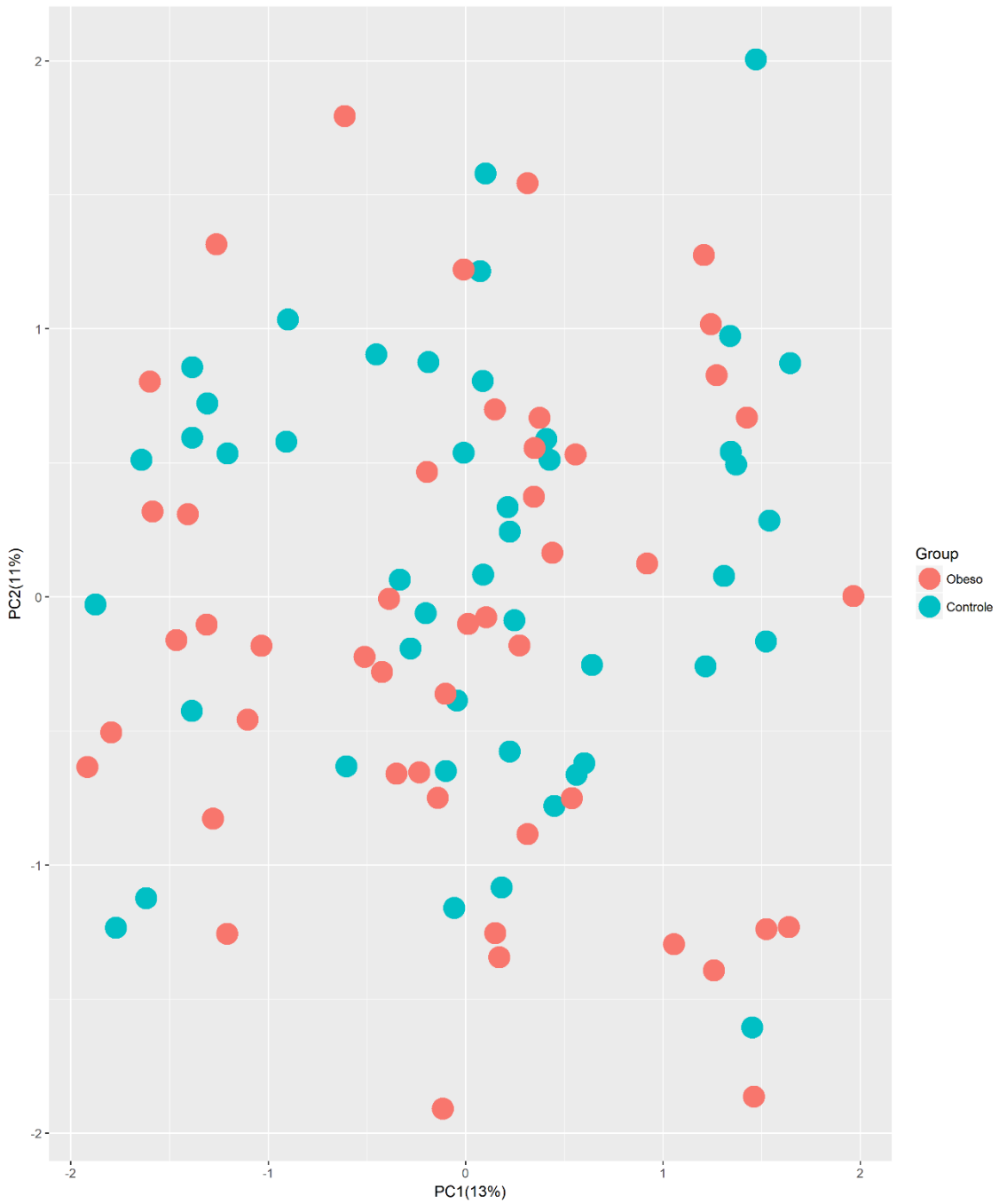

Figura 10 - Segunda PCA utilizando o conjunto de SNPs que apresentaram p-valor significativo na análise de regressão logística condicionada para frente. Note que o grupo controle (azul) e o grupo de obesos (vermelho) apresentaram um padrão de segregação diferente da primeira PCA, contudo não houve separação bem

A literatura relata que a obesidade poligênica pode variar de indivíduo para indivíduo, em detrimento da quantidade de genes ligados a obesidade que cada um herdou dos pais. Aliado a isso, deve-se levar em conta o tipo de interação que cada gene exerce no organismo, isto é, de que forma ele vai contribuir geneticamente para o fenótipo da obesidade, pois cada gene apresenta diferentes interações para o ganho de peso, podendo variar entre fraca, moderada e forte (BENEDICT et al., 2014; CHUENTA et al., 2014; DASTANI et al., 2012; LOOS, 2012; LOOS; JANSSENS, 2017; STENDER et al., 2017; STRAWBRIDGE et al., 2016; WU et al., 2010). Dessa forma, a não segregação entre os grupos de obeso e controle, mesmo quando somente os SNPs com p significativo na regressão logística foram selecionados é justificada pela fraca interação que devem possuir com o fenótipo da obesidade.

Outro tipo de análise pertinente a este trabalho é a identificação de variantes gênicas significativamente diferentes entre grupos caso e controle para uma determinada característica. Este tipo de estratégia possibilita a detecção de efeitos do polimorfismo gênico, discretos ou moderados, no desenvolvimento do fenótipo tal como a obesidade poligênica (REDDON et al., 2016; STENDER et al., 2017). Assim, foram realizados testes de associação para a obesidade nos 17 SNPs, onde novamente adotou-se o MD e o MR. Além disso, foram obtidas outras informações antropométricas da coorte de Ribeirão Preto além do IMC: sexo, altura, peso, cintura e razão entre cintura e estatura (RCE). Tais informações serviram para reclassificar a coorte de Ribeirão Preto em controle e obeso central (OC), de forma não exclusivamente baseada no IMC, mas levando em consideração o sexo, a relação circunferência da cintura e estatura (Apêndice 1).

O teste de associação não foi significativo na coorte de Ribeirão Preto quando o fenótipo relacionado era somente o aumento do IMC, que caracterizava o indivíduo como obeso, independente do modelo adotado (MD ou MR) (Tabela 9; Figura 11). Contudo, quando foram avaliados os SNPs e o fenótipo da obesidade central, o rs231591 para o MD e rs1824152 para o MR foram significativos, ambos denotando caráter de proteção para a coorte de Ribeirão Preto na presença do alelo mutante (Tabela 10; Figura 12).

Tabela 9 - Valores encontrados para o teste de associação na coorte de Ribeirão Preto utilizando os SNPs selecionados a partir do exoma ameríndio e o IMC.

ID	IMC MD				IMC MR			
	OR	95% I.C. Inferior	95% I.C. Superior	p	OR	95% I.C Inferior	95% I.C Superior	Sig.
rs1824152	0,99	0,45	2,19	0,98	0,53	0,27	1,06	0,07
rs3745335	1,11	0,52	2,38	0,79	0,62	0,17	2,26	0,46
rs3732378	0,48	0,19	1,18	0,1	2,33	0,21	26,54	0,48
rs8133052	1,35	0,58	3,15	0,49	1,29	0,53	3,19	0,57
rs34562867	1,50	0,62	3,65	0,37	NA	0,00	NA	0,26
rs1702003	0,61	0,22	1,71	0,34	NA	0,00	NA	0,21
rs2227278	1,32	0,55	3,18	0,53	NA	0,00	NA	0,26
rs2277552	1,66	0,49	5,61	0,41	NA	0,00	NA	NA
rs3731900	0,89	0,37	2,16	0,8	0,89	0,36	2,22	0,81
rs6887	0,71	0,39	1,31	0,27	0,73	0,27	1,97	0,53
rs2287345	0,40	0,13	1,23	0,096	NA	0,00	NA	0,27
rs744224	0,67	0,31	1,45	0,3	0,68	0,15	3,01	0,61
rs3743093	1,08	0,46	2,55	0,87	1,58	0,57	4,39	0,38
rs2297792	0,68	0,28	1,63	0,39	0,56	0,22	1,42	0,22
rs117372288	0,80	0,34	1,92	0,63	1,21	0,44	3,35	0,71
rs1043160	1,56	0,63	3,86	0,33	1,07	0,44	2,64	0,88
rs231591	1,03	0,42	2,50	0,95	1,48	0,49	3,69	0,4

ID = Identificação do SNP, MD = Modelo Dominante, MR = Modelo Recessivo, IMC – Índice de Massa Corpórea, Odds Ratio, $p \geq 0,05$.

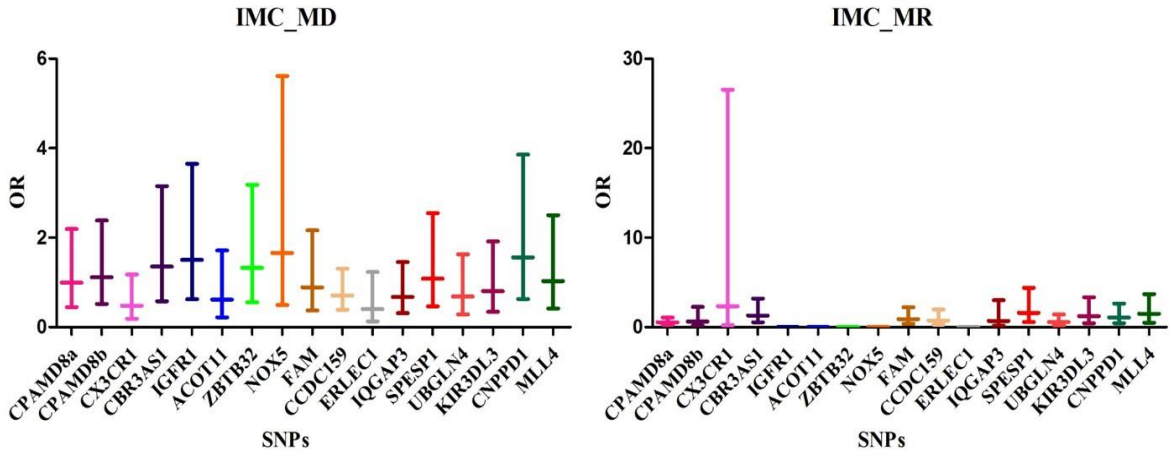

Figura 11 – Disposição gráfica do resultado do teste de associação e aumento de IMC na coorte de Ribeirão Preto com os SNPs selecionados a partir do exoma ameríndio. MD – Modelo Dominante, MR – Modelo Recessivo.

Tabela 10 - Valores encontrados para o teste de associação na coorte de Ribeirão Preto utilizando os SNPs selecionados a partir do exoma ameríndio e obesidade central.

ID	OC MD				OC MR			
	OR	95% I.C. Inferior	95% I.C. Superior	P	OR	95% I.C. Inferior	95% I.C. Superior	P
rs1824152	1,07	0,47	2,44	0,87	0,37	0,19	0,75	0,0056
rs3745335	1,37	0,62	3,03	0,43	1,00	0,27	3,67	1
rs3732378	0,97	0,39	2,39	0,94	1,15	0,10	13,13	0,91
rs8133052	0,99	0,41	2,39	0,99	0,98	0,38	2,49	0,96
rs34562867	1,13	0,45	2,86	0,79	NA	0,00	NA	0,16
rs1702003	0,55	0,20	1,50	0,24	NA	0,00	NA	0,35
rs2227278	0,95	0,38	2,36	0,92	NA	0,00	NA	0,15
rs2277552	1,86	0,47	7,34	0,36				
rs3731900	0,63	0,25	1,63	0,33	0,69	0,27	1,72	0,43
rs6887	0,79	0,34	1,80	0,57	0,85	0,31	2,29	0,74
rs2287345	0,70	0,25	1,97	0,51	NA	0,00	NA	0,16
rs744224	0,46	0,21	1,04	0,06	0,57	0,14	2,44	0,45
rs3743093	1,25	0,43	3,64	0,61	1,25	0,43	3,64	0,69
rs2297792	0,75	0,30	1,88	0,54	0,67	0,27	1,69	0,4
rs117372288	0,86	0,35	2,13	0,75	1,29	0,44	3,79	0,63
rs1043160	1,34	0,54	3,30	0,53	0,85	0,34	2,14	0,74
rs231591	0,27	0,11	0,65	0,0013	0,99	0,44	2,23	0,99

ID - Identificação do SNP, MD - Modelo Dominante, MR - Modelo Recessivo, OC - Obesos Central, Odds Ratio, p ≥ 0,05,

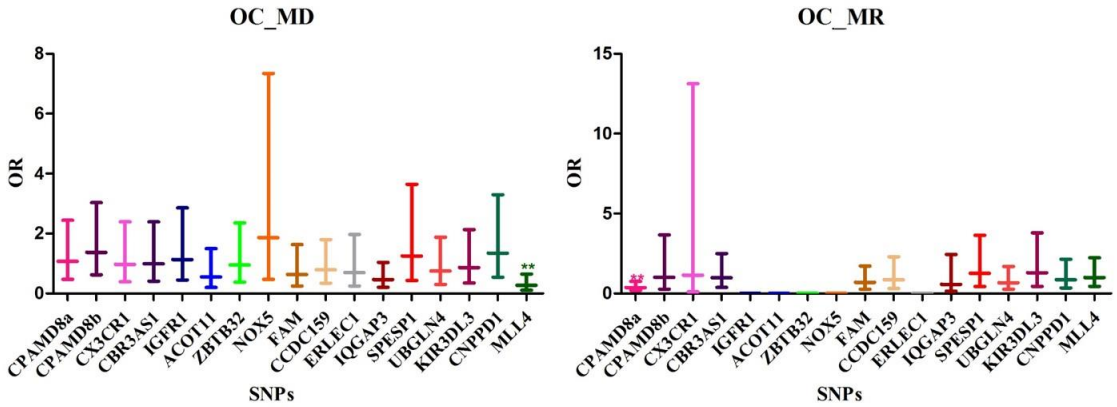

Figura 12 - Disposição gráfica do resultado do teste de associação e obesidade central na coorte de Ribeirão Preto com os SNPs selecionados a partir do exoma ameríndio. MD – Modelo Dominante, MR – Modelo Recessivo,

Uma análise mais refinada envolvendo os SNPs e a coorte de Ribeirão Preto foi realizada. Nos indivíduos que foram classificados como obesos ou com obesidade central, foi realizada outra análise levando em consideração o sexo de cada um, que permitiu visualizar separadamente dentro de cada grupo (caso controle) a influência dos SNPs para o fenótipo em relação ao sexo. Os SNPs rs1824152, rs3732378, rs231591 e rs744224 apresentaram significância estatística dependendo do tipo de fenótipo envolvido, modelo adotado (MD ou MR) e sexo (Figura 13).

IMC/Sexo

Gene	SNP	BM	OR (p)	Modelo	Fenótipo
-	-	-	-	-	-

Feminino

Gene	SNP	BM	OR	Modelo	Fenótipo
CPAMD8	rs1824152	T>C	0.28	Recessivo	Proteção
CX3CR1	rs3732378	C>T	0.24	Dominante	Proteção
MLL4	rs231591	G>A	0.34	Dominante	Proteção

Masculino

Gene	SNP	BM	OR	Modelo	Fenótipo
CPAMD8	rs1824152	T>C	0.26	Dominante	Proteção
MLL4	rs231591	G>A	0.32	Dominante	Proteção
MLL4	rs231591	G>A	0.51	Recessivo	Proteção

OC/Sexo

Gene	SNP	BM	OR (p)	Modelo	Fenótipo
CPAMD8	rs1824152	T>C	0.38 (0.0069)	Recessivo	Proteção
MLL4	rs231591	G>A	0.28 (0.0018)	Dominante	Proteção

Feminino

Gene	SNP	Base mutada	OR	Modelo	Fenótipo
CPAMD8	rs1824152	T>C	0.15	Recessivo	Proteção
IQGAP3	rs744224	G>A	0.18	Dominante	Proteção

Figura 13 - Teste de associação para o IMC e OC na coorte de Ribeirão Preto levando em consideração o fenótipo e o sexo para cada fenótipo observado. BM – Base Mutada, OR – Odd Ratio, p - p-value < 0,05.

Neste trabalho, o rs1824152 exibiu associação significativa com o aumento do IMC somente sob influência do sexo e para obesidade central independente do sexo. O gene CPAMD8 onde rs1824152 está inserido é membro da família de proteínas de inibidor de protease I39 (alfa-2-macroglobulina), importantes na imunidade inata e adquirida, associação com a secreção de insulina pancreática, aumento de plaquetas, hiperatividade, além de como marcadores biológicos para DMT2 e obesidade (Lambeir et al,, 2001; Z,-F, Li, Wu, & Engvall, 2004; Salonen et al,, 2007), Lambeir et al, (2001) descreveram que o polipeptídio produzido por CPAMD8 está envolvido na secreção de insulina pancreática, apoiando assim, o caráter de proteção associado neste trabalho ao SNP rs1824152, sendo que até o presente momento este é o primeiro trabalho que faz tal descrição.

Outro SNP que apresentou significância estatística foi rs231591, exibindo caráter de proteção contra a obesidade quando associado ao sexo e à obesidade central, Ele faz parte do gene MLL4, também conhecido como KMT2B (*Lysine Methyltransferase 2B*), que é expresso ubiquamente em tecidos adultos, e está associado as doenças, dentre elas a distonia (Y, Li et al,, 2016; Meyer et al,, 2017). Em camundongos, ele já foi associado com a adipogênese e a via PPARγ, bem como a fatores de transcrição que regulam a função das células β pancreáticas, os conectando diretamente com a DMT1 e DMT2 (J, Lee et al,, 2008; Scoville et al,, 2015). Ainda não existem relatos de associação de rs231591 ao fenótipo da obesidade. Neste trabalho sugerimos o aspecto de proteção para os indivíduos que possuem esse SNP, em consonância com o aspecto biológico que o gene apresenta, uma vez que a via PPARγ é uma das mais importantes da adipogênese.

As análises mais refinadas também mostraram que rs3732378 e rs744224, nos genes CX3CR1 e IQGAP3 respectivamente, apresentaram significância estatística somente quando a influência do sexo foi observada separadamente dentro de cada grupo caso-controle. O caráter de proteção para o fenótipo da obesidade foi associado a quem possuía o alelo mutante rs3732378, bem como o mutante de rs744224 para o fenótipo da obesidade central.

Enquanto que neste trabalho o rs3732378 foi associado ao caráter protetivo para obesidade para o sexo feminino, Shah et al, (2011), estudando o fenótipo da obesidade na população canadense de origem francesa encontrou associação com a obesidade para este SNP (SHAH et al., 2011). Divergindo dos dados encontrados neste trabalho, Braga (2011), por outro lado, não encontrou a susceptibilidade relacionada para os pacientes obesos analisando o mesmo SNP. Embora ele não tenha levado em consideração o sexo, pode-se sugerir que seu trabalho corrobora de forma indireta com os nossos dados, ainda que não haja a confirmação de caráter protetivo na publicação. Já o rs744224, que exibiu proteção para o fenótipo da obesidade central também para o sexo feminino, não existe até o momento artigo na literatura que o associe com a obesidade. Porém por estar localizado no gene IQGAP3, que já foi relacionado em camundongo com a proliferação das células β pancreáticas (KLOCHENDLER et al., 2016), a associação com o caráter de proteção encontrado aqui pode estar ligado diretamente com esse aspecto biológico do gene.

5.4 Considerações Finais

Comprovamos o caráter tri-híbrido dos indivíduos selecionados para o teste de ancestralidade na coorte de Ribeirão Preto, utilizando marcadores de ancestralidade InDels desenvolvidos por Santos et al, (2010). Ressaltamos que estudos ligados à obesidade em população com predominância de dois ou mais componentes ancestrais são escassos na literatura, o que torna nossos dados ainda mais interessantes.

Foram analisados a interação de 17 SNPs associados com a obesidade, selecionados a partir do exoma ameríndio, na coorte de Ribeirão Preto. Todos os SNPs apresentaram mutações não sinônimas, dois SNPs (rs3732378 e rs2277552) mostraram valores de predição considerados patogênicos. Uma busca na literatura revelou que somente três SNPs (rs3732378, rs8133052 e rs1702003) haviam sido relacionados ou correlacionados com a obesidade (BRAGA, 2014; CHANG et al., 2012; GREGORY et al., 2006; SHAH et al., 2011).

O conjunto de SNPs selecionados não apresentou sensibilidade suficiente para separar grupos de obesos e controles. Quando foi realizado o teste de associação adotando o MD e MR, não foi observada associação significativa com a predisposição para o fenótipo da obesidade (IMC). Entretanto, foi encontrada significância estatística para o caráter de proteção em dois SNPs (rs231591 para o MD e rs1824152 para o MR) quando o fenótipo associado era a obesidade central (RCE). Outros SNPs (rs1824152, rs3732378, rs231591 e rs744224) apresentaram significância estatística somente quando o sexo influenciava no fenótipo observado, dependendo do modelo adotado.

Por fim, os SNPs rs1824152, rs231591 e rs744224, aqui associado com caráter de proteção, até o momento não tinham seu envolvimento com a obesidade descrito na literatura. Todavia, os resultados aqui apresentados podem ser justificados em função dos aspectos biológicos que os genes onde eles estão localizados apresentam: associação com a via adipogênica PPARγ (CPAMD8, MLL4), proliferação e regulação das células β pancreáticas (IQGAP3, MLL4). Assim, apresentamos como principal resultado o caráter de proteção associados a quatro rs1824152, rs3732378, rs231591 e rs744224, destes três (rs1824152, rs231591 e rs744224) ainda não haviam sido SNPs relacionados diretamente com a obesidade.

6 CONCLUSÕES

I. Os indivíduos selecionados para o teste de ancestralidade na coorte de Ribeirão Preto mostraram a eficiência dos 15 InDels utilizando neste trabalho, onde o componente genético predominante foi o de origem europeia, seguido de ameríndio e africano (87%, 9% e 4% respectivamente);

II. O conjunto de 17 SNPs associados com a obesidade, obtidos a partir do exoma ameríndio, apresentaram mutações sinônimas com rs3731900 e rs2277552 exibindo valores de patogenicidade;

III. Os SNPs selecionados neste trabalho, a partir do exoma de ameríndios obesos, não foi sensível em separar obesos e normais na coorte de Ribeirão Preto;

IV. Os SNPs não apresentaram associação significativa com o aumento de IMC. Porém, rs1824152 e rs231591 foram associados ao caráter de proteção contra a obesidade central com e sem influência do sexo;

V. Outros dois SNPs, rs3732378 e rs744224, mostraram caráter de proteção contra a obesidade e obesidade central respectivamente, dependendo do fenótipo e sexo associado;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. H. et al. BFIT, a unique acyl-CoA thioesterase induced in thermogenic brown adipose tissue: cloning, organization of the human gene and assessment of a potential link to obesity. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 135–142, 15 nov. 2001.

ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, abr. 2010.

AL-DAGHRI, N. M. et al. Association between type 2 diabetes mellitus-related SNP variants and obesity traits in a Saudi population. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 3, p. 1731–40, mar. 2014.

ALLISON, D. B. et al. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 20, n. 6, p. 501–6, jun. 1996.

ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **American journal of human genetics**, v. 67, n. 2, p. 444–61, ago. 2000.

AUTON, A. et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 30 set. 2015.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/pt-br/publicacoes/publicacoes/2007/livros/bioestat-50/>. Acesso em: 23 ago. 2017.

AZEVEDO, M. M. Diagnóstico da população indígena no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 4, p. 19–22, 2008.

BACOPOULOU, F. et al. Waist circumference, waist-to-hip ratio and waist-to-height ratio reference percentiles for abdominal obesity among Greek adolescents. **BMC Pediatrics**, v. 15, n. 1, p. 50, 4 dez. 2015.

BARBIERI, M. A. et al. Health in early adulthood: the contribution of the 1978/79 Ribeirão Preto birth cohort. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 39, n. 8, p. 1041–55, ago. 2006.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 15 jan. 2005.

BAUER, K. W. et al. Cardio-metabolic risk screening among adolescents: understanding the utility of body mass index, waist circumference and waist to height ratio. **Pediatric Obesity**, v. 10, n. 5, p. 329–337, 1 out. 2015.

BELL, C. G.; WALLEY, A. J.; FROGUEL, P. The genetics of human obesity. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 3, p. 221–34, mar. 2005.

BENEDICT, C. et al. Fat mass and obesity-associated gene (FTO) is linked to higher plasma levels of the hunger hormone ghrelin and lower serum levels of the satiety hormone leptin in older adults. **Diabetes**, v. 63, n. 11, p. 3955–9, nov. 2014.

BETO, R.; FANY, R. **Povos indígenas no Brasil : 2006/2010**. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2011.

BOUCHARD, C. et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. **The**

New England journal of medicine, v. 322, n. 21, p. 1477–82, 24 maio 1990.

BRAGA, A. A. **Polimorfismos dos genes CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação à obesidade**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 21 maio 2014.

BRAY, G. A.; KIM, K. K.; WILDING, J. P. H. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 7, p. 715–723, 1 jul. 2017.

BRESSLER, J. et al. Risk of Type 2 Diabetes and Obesity Is Differentially Associated with Variation in FTO in Whites and African-Americans in the ARIC Study. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10521, 20 maio 2010.

BROMBERG, Y.; ROST, B. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 11, p. 3823–35, 2007.

BROWNELL, K. D.; WALSH, B. T. **Eating disorders and obesity : a comprehensive handbook**. Third ed. [s.l.] The Guilford Press, 2018.

CALLO, G. et al. Excesso de peso/obesidade no ciclo da vida e composição corporal na idade adulta: coorte de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 1982. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 4, 2016.

CARVALHO-SILVA, D. R. et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **American journal of human genetics**, v. 68, n. 1, p. 281–6, jan. 2001.

CASTILLO-HERNANDEZ, J. et al. A obesidade é um determinante da resistência à insulina mais importante do que os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 320–329, jul. 2017.

CELIS-MORALES, C. A. et al. Dietary fat and total energy intake modifies the association of genetic profile risk score on obesity: evidence from 48 170 UK Biobank participants. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 12, p. 1761–1768, 15 dez. 2017.

CHANG, Y.-C. et al. Genetic variation in the carbonyl reductase 3 gene confers risk of type 2 diabetes and insulin resistance: a potential regulator of adipogenesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 7, p. 847–858, 15 jul. 2012.

CHIARA, V. L. et al. Correlação e concordância entre indicadores de obesidade central e índice de massa corporal em adolescentes. **Rev Bras Epidemiol**, v. 12, n. 3, p. 368–77, 2009.

CHO, Y. S. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. **Nature genetics**, v. 44, n. 1, p. 67–72, jan. 2012.

CHOQUET, H.; MEYRE, D. Genetics of Obesity: What have we Learned? **Current genomics**, v. 12, n. 3, p. 169–79, maio 2011.

CHUENTA, W. et al. Common variations in the FTO gene and obesity in Thais: A family-based study. **Gene**, v. 558, n. 1, p. 75–81, 24 dez. 2014.

CHUNG, W. K. et al. Analysis of 30 Genes (355 SNPS) Related to Energy Homeostasis for Association with Adiposity in European-American and Yup'ik Eskimo Populations. **Human Heredity**, v. 67, n. 3, p. 193–205, jan. 2009.

CLÉMENT, K. Genetics of human obesity. **Comptes rendus biologies**, v. 329, n. 8, p. 608-22–5, ago. 2006.

COMUZZIE, A. G. et al. Novel genetic loci identified for the pathophysiology of childhood obesity in the Hispanic population. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51954, 14 dez. 2012.

CORRÊA, M. M. et al. Razão cintura-estatura como marcador antropométrico de excesso de peso em idosos brasileiros. **Reports in public health**, v. 33, n. 5, p. 1–14, 2017.

DALGAARD, K. et al. Trim28 Haploinsufficiency Triggers Bi-stable Epigenetic Obesity. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 353–364, 28 jan. 2016.

DASTANI, Z. et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. **PLoS genetics**, v. 8, n. 3, p. e1002607, 2012.

DEL BOSQUE-PLATA, L. et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. **Molecular genetics and metabolism**, v. 81, n. 2, p. 122–6, fev. 2004.

DUARTE, S. F. P. et al. p.Q223R leptin receptor polymorphism associated with obesity in Brazilian multiethnic subjects. **American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council**, v. 18, n. 4, p. 448–53, 2006.

DUBERN, B. et al. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and α-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. **The Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 2, p. 204–209, ago. 2001.

DUBERN, B. et al. Mutational analysis of the pro-opiomelanocortin gene in French obese children led to the identification of a novel deleterious heterozygous mutation located in the alpha-melanocyte stimulating hormone domain. **Pediatric research**, v. 63, n. 2, p. 211–6, fev. 2008.

DURBIN, R. M. et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061–1073, 28 out. 2010.

FADASON, T. et al. Physical Interactions and Expression Quantitative Traits Loci Identify Regulatory Connections for Obesity and Type 2 Diabetes Associated SNPs. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 150, 13 out. 2017.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Monogenic human obesity syndromes. **Recent progress in hormone research**, v. 59, p. 409–24, jan. 2004.

FLACHSBART, F. et al. Investigation of genetic susceptibility factors for human longevity – A targeted nonsynonymous SNP study. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 694, n. 1, p. 13–19, 2010.

FONT-CLOS, F.; ZAPPERI, S.; LA PORTA, C. A. M. Gene expression signature of obesity in monozygotic twins. **Physiological Measurement**, v. 39, n. 4, p. 44008, 26 abr. 2018.

FRANCISCHI, R. P. P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 1, p. 17–28, abr. 2000.

FROGUEL, P. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 398–401, 26 mar. 1998.

FUTUYMA, D. **Biologia Evolutiva**. 3ª ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2009.

GRAFF, M. et al. PNPLA3 gene-by-visceral adipose tissue volume interaction and the pathogenesis of fatty liver disease: the NHLBI family heart study. **International journal of obesity (2005)**, v. 37, n. 3, p. 432–8, mar. 2013.

GREGORY, S. G. et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 315–321, 18 maio 2006.

GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3 Suppl, p. 563S–72S, mar. 1998.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. **Plant molecular biology**, v. 57, n. 4, p. 461–85, mar. 2005.

HAINER, V. et al. Intrapair resemblance in very low calorie diet-induced weight loss in female obese identical twins. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. 8, p. 1051–1057, 6 set. 2000.

HARDY, J.; SINGLETON, A. Genomewide Association Studies and Human Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 17, p. 1759–1768, 23 abr. 2009.

HARDY, L. L. et al. 30-year trends in overweight, obesity and waist-to-height ratio by socioeconomic status in Australian children, 1985 to 2015. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 1, p. 76–82, 16 jan. 2017.

HAUN, R.; JOSÉ GONDIM PITANGA, F.; LESSA, I. Razão Cintura/estatura Comparado a outros indicadores antropométricos de obesidade como preditor de risco coronário elevado. **Artigo Original Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 6, p. 705–11, 2009.

HERRERA, B. M.; KEILDSON, S.; LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas**, v. 69, n. 1, p. 41–9, maio 2011.

HESTER, J. M. et al. Implication of European-derived adiposity loci in African Americans. **International journal of obesity (2005)**, v. 36, n. 3, p. 465–73, 12 mar. 2012.

HINDORFF, L. A. et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 23, p. 9362–7, 9 jun. 2009.

HONG, S. et al. Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: role of beta adrenergic receptors. **Brain, behavior, and immunity**, v. 39, p. 113–20, jul. 2014.

HORIKOSHI, M. et al. Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 248–252, 28 set. 2016.

ICHIHARA, S.; YAMADA, Y. Genetic factors for human obesity. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 7–8, p. 1086–98, abr. 2008.

IMAI, T. et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 521–30, 14 nov. 1997.

INTERNATIONAL CONSORTIUM FOR BLOOD PRESSURE GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES, G. B. et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 103–9, 11 set. 2011.

JAGADEESH, K. A. et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. **Nature Genetics**, v. 48, n. 12, p. 1581–1586, 24 out. 2016.

JANKOVIĆ, D. et al. Prevalence of Endocrine Disorders in Morbidly Obese Patients and the Effects of Bariatric Surgery on Endocrine and Metabolic Parameters. **Obesity Surgery**, v. 22, n. 1, p. 62–69, 4 jan. 2012.

JOKINEN, E. Obesity and cardiovascular disease. **Minerva pediatrica**, v. 67, n. 1, p. 25–32, fev. 2015.

KAMEL, K. A.; KROC, M.; ŚWIĘCICKI, W. Application of the High Resolution Melting analysis for genetic mapping of Sequence Tagged Site markers in narrow-leafed lupin (Lupinus angustifolius L.). **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, p. 533–540, 28 jul. 2015.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 15 jun. 2012.

KELISHADI, R. et al. Association of eating frequency with anthropometric indices and blood pressure in children and adolescents: the CASPIAN-IV Study. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 2, p. 156–167, 1 mar. 2016.

KLIMENTIDIS, Y. C.; MILLER, G. F.; SHRIVER, M. D. The relationship between European genetic admixture and body composition among Hispanics and Native Americans. **American Journal of Human Biology**, v. 21, n. 3, p. 377–382, 1 maio 2009.

KLOCHENDLER, A. et al. The Genetic Program of Pancreatic β-Cell Replication In Vivo. **Diabetes**, v. 65, n. 7, p. 2081–93, 1 jul. 2016.

KNOWLER, W. C. et al. Obesity in the Pima Indians: its magnitude and relationship with diabetes. **The American journal of clinical nutrition**, v. 53, n. 6 Suppl, p. 1543S–1551S, jun. 1991.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635–43, 6 abr. 2000.

KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature genetics**, v. 19, n. 2, p. 155–7, 1 jun. 1998.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073–81, jan. 2009.

KUNDU, A. et al. Analysis of non-synonymous single-nucleotide polymorphisms and population variability of PLD2 gene associated with hypertension. **International Journal of Bioinformatics Research and Applications**, v. 9, n. 3, p. 227, 2013.

KWOK, P.-Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? **Molecular Medicine Today**, v. 5, n. 12, p. 538–543, dez. 1999.

LAMBEIR, A.-M. et al. Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. **FEBS Letters**, v. 507, n. 3, p. 327–330, 2 nov. 2001.

LEBOUTE, A. P. M.; SIMÕES, A. L. **Polimorfismos genéticos em três amostras da**

população urbana brasileira. [s.l: s.n.].

LEE, J. et al. Targeted inactivation of MLL3 histone H3–Lys-4 methyltransferase activity in the mouse reveals vital roles for MLL3 in adipogenesis. **PNAS**, v. 105, n. 49, p. 19229 –19234, 2008.

LEE, N. et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456–469, 10 ago. 2007.

LEIBA, A. et al. Obesity and related risk of myeloproliferative neoplasms among Israeli adolescents. **Obesity**, v. 25, n. 7, p. 1187–1190, 1 jul. 2017.

LEÓN-MIMILA, P. et al. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in mexican children and adults. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70640, jan. 2013.

LI, H. et al. Variants in the Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene Are Not Associated With Obesity in a Chinese Han Population. **Diabetes**, v. 57, n. 1, p. 264–268, 1 jan. 2008.

LI, P. et al. Genetic association analysis of 30 genes related to obesity in a European American population. **International journal of obesity (2005)**, v. 38, n. 5, p. 724–9, maio 2014.

LI, S. et al. Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 1, p. 184–90, 1 jan. 2010.

LI, Y. et al. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. **Nature**, v. 530, n. 7591, p. 447–52, 25 fev. 2016.

LI, Z.-F.; WU, X.; ENGVALL, E. Identification and characterization of CPAMD8, a novel member of the complement 3/α2-macroglobulin family with a C-terminal Kazal domain. **Genomics**, v. 83, n. 6, p. 1083–1093, 1 jun. 2004.

LOCKE, A. E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 197–206, 12 fev. 2015.

LOOS, R. J. F. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 26, n. 2, p. 211–26, 4 abr. 2012.

LOOS, R. J. F.; JANSSENS, A. C. J. W. Predicting Polygenic Obesity Using Genetic Information. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 535–543, 7 mar. 2017.

MA, L. et al. Melanocortin 4 receptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians. **Diabetes**, v. 53, n. 10, p. 2696–9, out. 2004.

MÄGI, R. et al. Contribution of 32 GWAS-identified common variants to severe obesity in European adults referred for bariatric surgery. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70735, 2013.

MALTA, D. C. et al. Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. suppl 1, p. 267–276, 2014.

MAMMES, O. et al. LEPR gene polymorphisms: associations with overweight, fat mass and response to diet in women. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n. 5, p. 398–404, 1 maio 2001.

MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 747–753, 8 out. 2009.

MAO, X. et al. REPORT A Genomewide Admixture Mapping Panel for Hispanic/Latino Populations. **The American Journal of Human Genetics Am. J. Hum. Genet**, v. 8080, p. 1171–1178, 2007.

MARTI, A. et al. Association between leptin receptor (LEPR) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants and obesity: a case-control study. **Nutritional neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 183–8, 2 ago. 2009.

MASSARO, J. D. **Dinâmica de polimorfismos genéticos ligados ao gene da hemofilia A (F8) na população brasileira**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

MATTEVI, V. S. et al. Association of the low-density lipoprotein receptor gene with obesity in Native American populations. **Human genetics**, v. 106, n. 5, p. 546–52, maio 2000.

MCDERMOTT, D. H. et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 8, p. 1241–1250, 15 abr. 2003.

MCKEIGUE, P. M. et al. Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach : application to African-American populations. **Ann. Hum. Genet**, v. 64, p. 171–186, 2000.

MEYER, E. et al. Mutations in the histone methyltransferase gene KMT2B cause complex early-onset dystonia. **Nature Genetics**, v. 49, n. 2, p. 223–237, 19 fev. 2017.

MILLS, R. E. et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. **Nature**, v. 470, n. 7332, p. 59–65, 3 fev. 2011.

MIRAGLIA DEL GIUDICE, E. et al. Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Italian obese children: report of three new mutations. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 25, n. 1, p. 61–7, jan. 2001.

MONTEIRO, C. A. et al. Shifting obesity trends in Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 4, p. 342–346, 1 abr. 2000.

MUEHLSCHLEGEL, J. D. et al. Polymorphism in the protease-activated receptor-4 gene region associates with platelet activation and perioperative myocardial injury. **American journal of hematology**, v. 87, n. 2, p. 161–6, fev. 2012.

MULLANEY, J. M. et al. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R2, p. R131–R136, 15 out. 2010.

MUNIANDY, M. et al. Gene expression profile of subcutaneous adipose tissue in BMI-discordant monozygotic twin pairs unravels molecular and clinical changes associated with sub-types of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 8, p. 1176–1184, 23 ago. 2017.

NASSIR, R. et al. Relationship between adiposity and admixture in African-American and Hispanic-American women. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 2, p. 304–313, 12 fev. 2012.

NAWARYCZ, T. et al. Waist-to-height ratio as a measure of abdominal obesity in southern Chinese and European children and adolescents. **International Journal of**

Obesity, v. 40, n. 7, p. 1109–1118, 27 jul. 2016.

NEBENDAHL, C. et al. Early postnatal feed restriction reduces liver connective tissue levels and affects H3K9 acetylation state of regulated genes associated with protein metabolism in low birth weight pigs. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 29, p. 41–55, mar. 2016.

NICOLETTI, C. F. et al. UCP1 -3826 A>G polymorphism affects weight, fat mass, and risk of type 2 diabetes mellitus in grade III obese patients. **Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 83–87, 2016.

NICOLETTI, C. F. et al. The Ala55Val and -866G>A polymorphisms of the UCP2 gene could be biomarkers for weight loss in patients who had Roux-en-Y gastric bypass. **Nutrition**, v. 33, p. 326–330, 2017.

OECD| OBESITY UPDATE. Did you know? 2017.

OLIVEIRA, B. Análise da expressão de genes relacionados ao gasto energético de indivíduos obesos grau III antes e após cirurgia bariátrica. 2013.

OLIVEIRA, B. et al. UCP2 and PLIN1 Expression Affects the Resting Metabolic Rate and Weight Loss on Obese Patients. **Obesity Surgery**, v. 27, n. 2, p. 343–348, 4 fev. 2017.

OLIVEIRA, G. et al. Prevalence of Obesity and Overweight in an Indigenous Population in Central Brazil: A Population-Based Cross-Sectional Study. **Obesity facts**, v. 8, n. 5, p. 302–10, 2015.

PANDEY, D. et al. Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 302, n. 10, p. H1919-28, 15 maio 2012.

PENA, S. D. . et al. Retrato molecular do Brasil. **Ciências Hoje**, v. 27, n. 159, p. 16–25, 2000.

PENA, S. D. J. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 870–876, out. 2009.

PEREIRA, P. F. et al. Circunferência da cintura e relação cintura/estatura: úteis para identificar riscos metabólicos em adolescente do sexo feminino? **Rev Paul Pediatr**, v. 29, n. 3, p. 372–7, 2011.

PRAKASH, J. et al. Association of FTO rs9939609 SNP with Obesity and Obesity-Associated Phenotypes in a North Indian Population. **Oman medical journal**, v. 31, n. 2, p. 99–106, mar. 2016.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

R CORE TEAM. **R: The R Project for Statistical Computing**. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 23 ago. 2017.

RAFAEL, J.; SANTOS, D. Imigração e Ascenção Social em Ribeirão Preto entre o final do século XIX e meados do XX. 2006.

RAVUSSIN, E.; BOUCHARD, C. Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 410, n. 2–3, p. 131–145, dez. 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software

for Exact Tests and Ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248–249, 1 maio 1995.

RE, R. N. Obesity-related hypertension. **The Ochsner journal**, v. 9, n. 3, p. 133–6, 2009.

REDDON, H. et al. Physical activity and genetic predisposition to obesity in a multiethnic longitudinal study. **Scientific reports**, v. 6, p. 18672, jan. 2016.

REINEHR, T. et al. Lifestyle Intervention in Obese Children With Variations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. **Obesity**, v. 17, n. 2, p. 382–389, 1 fev. 2009.

RESQUE, R. et al. Male Lineages in Brazil: Intercontinental Admixture and Stratification of the European Background. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0152573, 5 abr. 2016.

RESQUE, R. L. et al. Estimates of interethnic admixture in the Brazilian population using a panel of 24 X-linked insertion/deletion markers. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 6, p. 849–852, 1 nov. 2010.

RIBEIRO, D. **O Povo Brasileiro: A Formação e o sentido do Brasil**. Disponível em: <http://www.usp.br/cje/anexos/pierre/ribeiro_darcy_povo_brasileiro_formacao_e_o_sentido_do_brasil.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016.

ROMAN, D. L. et al. Leptin Receptor Lys656Asn Polymorphism Is Associated with Decreased Leptin Response and Weight Loss Secondary to a Lifestyle Modification in Obese Patients. **Archives of Medical Research**, v. 37, n. 7, p. 854–859, out. 2006.

SAJUTHI, S. P. et al. Mapping adipose and muscle tissue expression quantitative trait loci in African Americans to identify genes for type 2 diabetes and obesity. **Human genetics**, 19 maio 2016.

SALIBA, L. F. et al. Obesity-related gene ADRB2, ADRB3 and GHRL polymorphisms and the response to a weight loss diet intervention in adult women. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, 2014.

SALONEN, J. T. et al. **Novel genes and markers in type 2 diabetes and obesity**, 9 maio 2007. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/WO2007128884A1/en>. Acesso em: 3 maio. 2018

SALZANO, F. M. **Genômica e evolução: moléculas, organismos e sociedades - Francisco M. Salzano - Google Livros**. São Paulo: Oficina de Textos, 2012.

SALZANO, F. M.; HUTZ, M. H. Genética, genômica e populações nativas brasileiras: história e biomedicina. **Revista de Estudos e Pesquisas (FUNAI)**, v. 2, n. 1, p. 175–197, 2005.

SALZANO, F.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 suppl 1, p. 151–170, 2014.

SANTOS, N. P. C. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. 184–190, fev. 2010.

SCHEID, J. L. et al. FTO polymorphisms moderate the association of food reinforcement with energy intake. **Physiology & behavior**, v. 132, p. 51–6, 10 jun. 2014.

SCOTT, W. R. et al. Investigation of Genetic Variation Underlying Central Obesity amongst South Asians. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155478, jan. 2016.

SCOVILLE, D. W. et al. MLL3 and MLL4 Methyltransferases Bind to the MAFA and

MAFB Transcription Factors to Regulate Islet β-Cell Function. **Diabetes**, v. 64, n. 11, p. 3772–83, nov. 2015.

SCUTERI, A. et al. Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 7, p. e115, 2007.

SHAH, R. et al. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1512–8, maio 2011.

SHAWKY, R. M.; SADIK, D. I. Genetics of obesity. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 13, n. 1, p. 11–17, fev. 2012.

SHEN, Y. et al. Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 2, p. 464–72, 9 jan. 2013.

SHUNGIN, D. et al. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 187–196, 11 fev. 2015.

SINGH, R. K.; KUMAR, P.; MAHALINGAM, K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 2, p. 87–108, fev. 2017.

SIROIS-GAGNON, D. et al. Association of Common Polymorphisms in the Fractalkine Receptor (CX3CR1) With Obesity. **Obesity**, v. 19, n. 1, p. 222–227, 3 jun. 2010.

SLATKIN, M. Linkage disequilibrium in growing and stable populations. **Genetics**, v. 137, n. 1, p. 331–6, maio 1994.

SOLE, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v. 22, n. 15, p. 1928–1929, 1 ago. 2006.

SPELIOTES, E. K. et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. **Nature genetics**, v. 42, n. 11, p. 937–48, nov. 2010.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the Regulation of Energy Balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531–543, fev. 2001.

STENDER, S. et al. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. **Nature genetics**, v. 49, n. 6, p. 842–847, 24 jun. 2017.

STRAWBRIDGE, R. J. et al. Effects of Genetic Loci Associated with Central Obesity on Adipocyte Lipolysis. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153990, jan. 2016.

STRYJECKI, C.; ALYASS, A.; MEYRE, D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 1, p. 62–80, 1 jan. 2018.

STUNKARD, A. J.; FOCH, T. T.; HRUBEC, Z. A Twin Study of Human Obesity. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 1, p. 51, 4 jul. 1986.

TARAZONA-SANTOS, E. et al. BRASIL E A IDIOSSINCRASIA DA MISCIGENAÇÃO. **Revista da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 22, n. 1.2, 9 set. 2016.

TEMPLETON, A. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva - Loja e Livraria da Editora Cubo**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética - SBG, 2011.

TIMOFEEVA, A. V. et al. Altered Gene Expression Pattern in Peripheral Blood Leukocytes from Patients with Arterial Hypertension. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1091, n. 1, p. 319–335, dez. 2006.

TRAURIG, M. T. et al. Evidence for a role of LPGAT1 in influencing BMI and percent body fat in Native Americans. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 21, n. 1, p. 193–202, jan. 2013.

TREMBLAY, K. et al. Association study between the CX3CR1 gene and asthma. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 8, p. 632–639, 2 dez. 2006.

TSUI, L. et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. **Science**, v. 230, n. 4729, p. 1054–1057, 29 nov. 1985.

VAISSE, C. et al. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant formof obesity. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 113–114, 1 out. 1998.

VARELLA, C. A. A. PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CPGA-CS Análise de Componentes Principais Conteúdo. 2008.

VIERA, J. et al. Phospholipases D1 and D2 Suppress Appetite and Protect against Overweight. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157607, 14 jun. 2016.

VOGAN, K. RPGRIP1L, FTO and obesity. **Nature Genetics**, v. 46, n. 6, p. 532–532, 28 maio 2014.

VOISIN, S. et al. Many obesity-associated SNPs strongly associate with DNA methylation changes at proximal promoters and enhancers. **Genome medicine**, v. 7, n. 1, 2015.

VOLIN, M. V. et al. Fractalkine: A Novel Angiogenic Chemokine in Rheumatoid Arthritis. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 4, p. 1521–1530, out. 2001.

WANG, G.; SPEAKMAN, J. R. Analysis of Positive Selection at Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Body Mass Index Does Not Support the ???Thrifty Gene??? Hypothesis. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 4, 2016.

WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 16, p. e164, set. 2010.

WANG, L. et al. Mixture SNPs effect on phenotype in genome-wide association studies. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 3, 3 fev. 2015.

WHEELER, E. et al. Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity. **Nature genetics**, v. 45, n. 5, p. 513–7, maio 2013.

WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic. **WHO**, 2015.

WHO | Obesity and overweight. **WHO**, 2017.

WU, L. et al. Associations of six single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes with BMI and risk of obesity in Chinese children. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3085–9, 1 dez. 2010.

XIA, Q.; GRANT, S. F. A. The genetics of human obesity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, p. 178–90, abr. 2013.

YANG, J. et al. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. **American journal of human genetics**, v. 88, n. 1, p. 76–82, 7 jan. 2011.

YEO, G. S. H. et al. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inheritedhuman obesity. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 111–112, 1 out. 1998.

ZAMBRANO, A. K. et al. Ancestry characterization of Ecuador's Highland mestizo population using autosomal AIM-INDELs. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 0, n. 0, set. 2017.

ZAPATA, C.; VISEDO, G. Gametic disequilibrium and physical distance. **American journal of human genetics**, v. 57, n. 1, p. 190–3, jul. 1995.

ZURBANO, R. et al. Influence of the -866G/A polymorphism of the UCP2 gene on an obese pediatric population. **Nutricion hospitalaria**, v. 21, n. 1, p. 52–6, 2006.

APÊNDICE

Apêndice A – Informações extras sobre a coorte de Ribeirão Preto cedidas pelo Drª Heloisa Bettiol.

ID	C_IMC	C_OC	Sexo	A(cm)	PA(Kg)	IMC	C (cm)	RCE
0038	Caso	Caso	F	158,5	86,6	34,4	102	0,64
0051	Controle	Controle	M	172,5	61,5	20,6	76	0,44
0087	Caso	Caso	M	179,5	108,1	33,5	110	0,61
0133	Controle	Controle	F	160	48,4	18,9	62	0,39
0175	Caso	Controle	F	163,5	82,7	30,9	94,5	0,58
0308	Controle	Controle	F	170,5	68	23,3	75	0,44
0348	Controle	Controle	F	162,5	56,4	21,3	68	0,42
0362	Controle	Controle	M	162	53,7	20,4	82	0,51
0390	Caso	Controle	M	181,5	102,3	31	103	0,57
0474	Caso	Controle	F	168,5	92,1	32,4	92	0,55
0527	Caso	Controle	F	164,5	83,9	31	87	0,53
0703	Controle	Controle	F	156,5	52	21,2	70,5	0,45
1028	Controle	Controle	M	181	70,6	21,5	82	0,45
1033	Caso	Controle	M	171,5	91,3	31	100,5	0,59
1135	Caso	Caso	M	177,5	103,7	32,9	110,5	0,62
1145	Caso	Caso	M	170	91,2	31,5	104	0,61
1181	Caso	Caso	F	163	93,5	35,2	98	0,60
1182	Caso	Caso	F	152,5	72	30,9	96	0,63
1248	Caso	Caso	M	170,5	107,8	37	105	0,62
1263	Controle	Controle	F	158	52,8	21,1	75,5	0,48
1306	Controle	Controle	M	175,5	63,6	20,6	77	0,44
1308	Controle	Controle	M	176,5	71,9	23	80	0,45
1345	Controle	Controle	M	182,5	73,4	22	80	0,44
1531	Caso	Controle	F	155,5	78	32,2	91	0,59
1543	Controle	Controle	M	175,5	58,9	19,1	73	0,42
1551	Controle	Controle	M	170,5	70,9	24,3	82	0,48
1554	Controle	Controle	M	175,5	68,1	22,1	79,5	0,45
1885	Caso	Controle	M	175,5	93,2	30,2	103,5	0,59
1886	Caso	Caso	M	175	128,8	42	119	0,68
1890	Caso	Controle	F	166	94,3	34,2	93	0,56
1911	Controle	Controle	M	177,5	62,3	19,7	78	0,44
1929	Caso	Controle	M	173,5	95	31,5	98	0,56
1983	Caso	Caso	F	158	87	34,8	97	0,61
2012	Caso	Caso	M	177	113,9	36,3	112	0,63
2025	Controle	Controle	M	171,5	70,7	24	85	0,50
2026	Caso	Caso	F	160,5	110	42,7	123,5	0,77
2076	Controle	Controle	F	178,5	73,7	23,1	78	0,44
00443	Controle	Controle	M	170	69,4	24,0	81,0	0,48
00761	Caso	Caso	M	172	97,7	33,0	110,0	0,64
00868	Controle	Controle	F	163	64,5	24,3	82,0	0,50
00942	Controle	Controle	F	167	61,4	22,0	79,0	0,47
01342	Caso	Caso	F	160	86,9	33,9	101,0	0,63
01382	Caso	Caso	M	169,5	106,8	37,2	109,0	0,64
01523	Controle	Controle	F	173	71,4	23,9	79,0	0,46
01535	Controle	Controle	M	178,5	76,8	24,1	92,5	0,52
01822	Controle	Controle	M	165	51,9	19,1	71,0	0,43
20003	Caso	Controle	F	170	100,7	34,8	101,0	0,59
20197	Caso	Controle	M	188,5	109,7	30,9	107,0	0,57
20358	Caso	Controle	M	174,5	93,8	30,8	100,0	0,57
20374	Controle	Controle	M	185	78,8	23,0	88,0	0,48
20511	Controle	Controle	F	156	56,4	23,2	76,0	0,49
20541	Caso	Caso	F	160,5	104,4	40,5	106,0	0,66
20571	Controle	Controle	F	165	64,0	23,5	83,0	0,50
20588	Controle	Controle	M	181,5	80,2	24,3	84,5	0,47
20674	Controle	Controle	F	160	58,8	23,0	71,0	0,44

20795	Caso	Caso	F	164,5	97,7	36,1	107,0	0,65
20815	Controle	Controle	M	164	67,1	24,9	88,0	0,54
21075	Caso	Caso	M	160	89,4	34,9	107,0	0,67
21249	Controle	Controle	M	183	64,3	19,2	78,0	0,43
21401	Caso	Caso	F	161	120,3	46,4	135,0	0,84
21539	Controle	Controle	M	166	67,8	24,6	82,0	0,49
21585	Caso	Caso	M	172,5	128,1	43,0	123,0	0,71
21591	Caso	Controle	F	167,5	94,3	33,6	99,5	0,59
21842	Caso	Controle	F	168,5	95,9	33,8	99,0	0,59
21874	Caso	Caso	M	177	116,7	37,2	121,0	0,68
21914	Controle	Controle	F	171	60,9	20,8	75,0	0,44
22039	Controle	Controle	F	181	72,7	22,2	91,0	0,50
22199	Caso	Caso	M	185	131,5	38,4	115,0	0,62
22285	Caso	Controle	F	150	72,1	32,0	89,0	0,59
22368	Caso	Controle	M	163,30	81,2	30,4	95,0	0,58
22381	Controle	Controle	M	166	60,6	22,0	80,0	0,48
22390	Caso	Caso	F	167	105,2	37,7	101,0	0,60
22448	Caso	Caso	F	168,5	94,1	33,1	102,0	0,61
30101	Controle	Controle	F	159	57,9	22,9	78,0	0,49
30500	Controle	Controle	F	159	57,0	22,5	76,0	0,48
30551	Caso	Caso	F	162,5	94,7	35,9	105,0	0,65
30621	Controle	Controle	F	157	61,3	24,9	81,0	0,52
30665	Caso	Caso	F	163	86,0	32,4	106,0	0,65
31093	Controle	Controle	F	173	58,7	19,6	71,0	0,41
31220	Controle	Controle	M	177	76,4	24,4	82,0	0,46
31236	Caso	Caso	F	167	96,0	34,4	100,0	0,60
31272	Controle	Controle	F	158	50,9	20,4	68,0	0,43
31492	Caso	Caso	M	176	122,2	39,4	118,0	0,67
31541	Caso	Controle	M	176	97,2	31,4	99,5	0,57
31899	Controle	Controle	F	162,5	57,2	21,7	75,0	0,46
40060	Controle	Controle	M	187	86,8	24,8	93,0	0,50
40207	Caso	Caso	M	169	98,3	34,4	109,5	0,65
40237	Caso	Caso	M	176	108,9	35,2	116,0	0,66
40303	Controle	Controle	F	161	61,0	23,5	79,0	0,49
40358	Caso	Caso	F	170	90,5	31,3	109,0	0,64
40396	Caso	Caso	M	174,5	99,3	32,6	107,0	0,61
40397	Controle	Controle	F	166	59,8	21,7	84,0	0,51
40413	Controle	Controle	M	168,5	65,3	23,0	80,0	0,47
40851	Controle	Controle	F	168	65,9	23,3	73,5	0,44
40939	Caso	Caso	M	179	127,6	39,8	120,0	0,67
40978	Caso	Controle	M	185,5	109,9	31,9	108,5	0,58
60213	Controle	Controle	M	170	72,0	24,9	86,5	0,51
60313	Caso	Caso	M	172	107,2	36,2	118,0	0,69
60387	Caso	Caso	F	151	82,0	36,0	116,0	0,77
60538	Controle	Controle	F	172	69,3	23,4	78,0	0,45
60676	Controle	Controle	F	157	55,3	22,4	78,0	0,50
60692	Caso	Caso	F	167,5	130,3	46,4	120,0	0,72
60755	Caso	Caso	M	170	91,1	31,5	102,0	0,60
70083	Caso	Caso	F	170,5	110,4	38,0	106,0	0,62
70095	Caso	Caso	F	172	103,5	35,0	112,0	0,65
90029	Controle	Controle	F	159,5	60,4	23,7	87,0	0,55
90112	Caso	Caso	M	177,5	111,9	35,5	112,0	0,63
90120	Controle	Controle	F	164	66,5	24,7	81,0	0,49
228	Controle	Controle	M	179	77,5	24,2	92,0	0,51
265	Controle	Controle	F	152,5	53,2	22,9	72,0	0,47
412	Caso	Controle	F	160,5	72,4	28,1	94,0	0,59
549	Controle	Controle	F	164	56,5	21,0	80,0	0,49
728	Controle	Controle	M	163,5	64,7	24,2	95,0	0,58
1039	Caso	Caso	F	162,5	100,7	38,1	115,0	0,71
1484	Controle	Controle	F	168	62,9	22,3	72,0	0,43

1562	Caso	Caso	M	188,5	139,9	39,4	131,0	0,69
1767	Controle	Controle	M	181	77,5	23,7	90,0	0,50
20123	Controle	Controle	F	167	58,8	21,1	67,0	0,40
20135	Caso	Caso	F	159	120,1	47,5	129,0	0,81
20259	Controle	Controle	M	173	71,1	23,8	91,0	0,53
20383	Controle	Controle	M	159	53,0	21,0	77,5	0,49
20393	Caso	Caso	F	150,5	73,2	32,3	91,0	0,60
20405	Caso	Caso	F	154	89,0	37,5	92,0	0,60
20424	Caso	Caso	F	167	104,1	37,3	106,0	0,63
20529	Controle	Controle	M	169	55,1	19,3	70,0	0,41
20929	Caso	Controle	M	175,5	94,1	30,6	94,1	0,54
21156	Controle	Controle	M	172,5	70,4	23,7	85,0	0,49
21165	Caso	Caso	F	152	88,1	38,1	124,0	0,82
21546	Controle	Controle	F	168	66,7	23,6	80,0	0,48
21597	Controle	Controle	M	175	76,0	24,8	85,5	0,49
21703	Caso	Controle	M	182	102,1	30,8	106,0	0,58
21875	Controle	Controle	M	176	60,2	19,4	76,0	0,43
21888	Caso	Caso	F	157	92,4	37,5	106,0	0,68
22030	Caso	Controle	M	177	97,5	31,1	105,0	0,59
22045	Caso	Caso	M	167	103,1	37,0	114,0	0,68
22202	Caso	Caso	F	163	100,3	37,8	111,0	0,68
22596	Caso	Caso	F	181,5	123,4	37,5	110,5	0,61
22674	Controle	Controle	F	158,5	48,1	19,1	63,0	0,40
30023	Controle	Controle	F	150	55,4	24,6	79,0	0,53
30087	Controle	Controle	M	179,5	64,1	19,9	77,0	0,43
30258	Caso	Controle	M	171	93,5	32,0	101,0	0,59
30283	Controle	Controle	M	174	72,8	24,0	85,0	0,49
30857	Caso	Caso	M	174	119,8	39,6	128,0	0,74
30951	Controle	Controle	F	159	54,8	21,7	72,5	0,46
30976	Controle	Controle	F	165	63,3	23,3	71,0	0,43
31333	Caso	Caso	M	174	100,4	33,2	108,0	0,62
31592	Controle	Controle	F	162	61,7	23,5	75,0	0,46
31610	Controle	Controle	F	162	64,2	24,5	82,0	0,51
31616	Caso	Controle	F	163	79,6	30,0	94,0	0,58
32086	Controle	Controle	F	167	54,6	19,6	77,0	0,46
40255	Controle	Controle	M	182,5	72,4	21,7	86,0	0,47
40321	Caso	Caso	F	163,5	94,6	35,4	105,0	0,64
40462	Caso	Caso	M	177,5	115,1	36,5	121,0	0,68
40773	Controle	Controle	F	166,5	62,4	22,5	80,0	0,48
40527	Caso	Caso	M	185	121,9	35,6	119,0	0,64
40599	Caso	Controle	M	177,5	102,7	32,6	103,0	0,58
40722	Caso	Controle	F	167	108,6	38,9	99,0	0,59
40791	Controle	Controle	F	153	51,8	22,1	73,0	0,48
40994	Controle	Controle	F	163	63,5	23,9	73,0	0,45
50061	Controle	Controle	M	179	77,2	24,1	85,0	0,47
50089	Caso	Caso	M	170	99,5	34,4	105,0	0,62
50203	Controle	Controle	F	159	52,8	20,9	70,0	0,44
60022	Caso	Caso	M	168	96,0	34,0	108,0	0,64
60200	Controle	Controle	F	163	58,7	22,1	80,0	0,49
60264	Controle	Controle	F	158,5	60,7	24,2	76,0	0,48
60279	Controle	Controle	F	166,5	67,6	24,4	76,0	0,46
60283	Caso	Caso	M	175	108,3	35,4	116,5	0,67
60349	Caso	Caso	M	175,5	104,9	34,1	112,0	0,64
60392	Controle	Controle	F	162,5	61,2	23,2	73,0	0,45
60437	Caso	Caso	M	165	91,8	33,7	100,0	0,61
60531	Caso	Controle	F	166	87,9	31,9	94,0	0,57
60639	Controle	Controle	F	170	62,6	21,7	76,0	0,45
70043	Caso	Controle	M	187	112,7	32,2	110,0	0,59
90040	Controle	Controle	F	170,5	64,8	22,3	76,0	0,45
90077	Controle	Controle	M	178	75,6	23,9	82,0	0,46

90088	Controle	Controle	F	170	63,9	22,1	82,0	0,48
90101	Controle	Controle	F	155,5	57,0	23,6	84,0	0,54
90126	Caso	Controle	F	160	80,3	31,4	89,0	0,56
90133	Caso	Controle	M	185	108,9	31,8	108,0	0,58
90144	Caso	Caso	M	182	106,3	32,1	110,0	0,60

ID - Identificação, C_O - Classificação de Obeso, C_OC - Classificação de Obesidade Central, S - Sexo, A - Altura, PA - Peso Adulto, IMC - Índice de Massa Corpórea, C - Cintura, RCA - Razão entre Cintura e Altura

Apêndice B – Sequência do conjunto de InDels informativos de ancestralidade, posição cromossômica e sequencia dos *amplicons* (Santos 2010).

ID	Sequência dos Primer (5' --> 3')	Chr (Mbp) GRCh37/hg19	Sequência dos Amplicons
MID99R	AATGGCAAAGATACAGGTCTGG	chr22:25750786+25750917	AATGGCAAAGATACAGGTCTGGatgggccagggccatgccaacgagagccaaccctgacccctgcctcgggcctgagctgccccaaacgagacgggttcaacacccaggagcCTCAACTTCACCTGCACCTTG
MID99F	CAAGGTGCAGGTGAAGTTGAG		
MID93R	CACAGCTTTTTCTCCAGTGTTG	chr22:42048172+42048321	CACAGCTTTTTCTCCAGTGTTGgaaattaaagaggatgtgaaccttgccgttgtgtttatttgtgcagtctagaccctatcttcttttgtgctatggctcatgaacaccccagatttgactcgattGGTTTTCATTAGTAACTGGGGTCA
MID93F	TGACCCCAGTTACTAATGAAAACC		
MID778R	TTTACCTGCTGTGGACTTGATG	chr16:83809883-83810082	GTGACAGGCTTTATAGGCCAACaaaaagacaccttaattattagctggaatgataaaaactcagtggttatctaatgttagccagtggtcttcactaatagtgacagaagtctaattaataaaaactgggaaaataaattcggtgtaaagaatgagtttggcatgaaaaatttcaaaaCATCAAGTCCACAGCAGGTAAA
MID778F	GTGACAGGCTTTATAGGCCAAC		
MID682R	CAAAGCACTTCATGGAATTAAGG	chr9:97499037+97499218	CAAAGCACTTCATGGAATTAAGGtccttttgcatctgctctcctcataccttatttcaactgtggtactcaaaatctgggcccaccactctgcagtggggacagtgactgaacttgcatgtgactaggattatgaagggtttagaaactgtgtcatgtgAGAGTTGGCTGAAAGAATGGAG
MID682F	CTCCATTCTTTCAGCCAACTCT		
MID619R	GAGAGGTAGAGGGAGTTTGGG	chr7:28168665-28168805	GAGAGGTAGAGGGAGTTTGGGgggtattcacagagggtcttcttgtatgactaagaaagacccctctgtccaatgctagggagctcctgctgtttaggatggagacctgacagctggccaTGAAGGGTCAAGGAAAAGAGTC
MID619F	GACTCTTTTCCTTGACCCTTCA		
MID476F	CATTGATGTCTATTTGCCTTTGAG	chr9:19713566+19713735	CATTGATGTCTATTTGCCTTTGAGcaaaagacctttgataatgagaagaagtcctgatgaaaggcctgcattttccttcatagttataaattgaaaatgtgtttccaagaggtttttattagcattactgagtgtaagcctatcaatTCAGTAACTCCAGCCCTAGGAA
MID476R	TTCCTAGGGCTGGAGTTACTGA		
MID273R	AAAGGAAATCACGTCTAAGTGACC	chr17:5485197+5485334	GGTGTGATCAATTCCAACTGCtgaaatagaaaaagagcttcttaaagcaaatcaagaaacaaaatttcatcatttacaacaaagaattagtaggtctagcaatttccaactctcGGTCACTTAGACGTGATTTCCTTT
MID273F	GGTGTGATCAATTCCAACTGC		
MID2011R	TTACTTACGCTTCGGGTTCATT	chr2:108784815-108785004	

MID2011F	TGAGTAGGCCAATAAGAACATCC		TGAGTAGGCCAATAAGAACATCCtcttttctttagcaatttgcctaacatttgatacaagccattt ccaaatacgtttttggtgtgtatcaaacttgagaaactaggagctctggaaattatgcagcagtttgaatttactgcc tttaaattgtcttccttactttagAATGAACCCGAAGCGTAAGTAA
MID196R	AAAGCTTCAGTGAATTCCAAGG	chr6:99341833-99341950	AACCAAGTTCTAGCCATATGGAACtattttaagctttgatttttgttatcatttttaatttgatggt cagagaagatagtctctgtgatattgattCCTTGGAATTCACTGAAGCTTT
MID196F	AACCAAGTTCTAGCCATATGGAAC		
MID1952R	AGTAAACAAACGGCTGCAAGA	chr15:62877638-62877739	TTTGCTCCCACAGCATTAGTCatgaccacccccactctcccagcaccttgtcctcgcctccatg aaggacagatcacattcTCTTGCAGCCGTTTGTTTACT
MID1952F	TTTGCTCCCACAGCATTAGTC		
MID1603R	GTGCAAATAAAACGCAACAGAA	chr5:71532478+71532712	AAAAGACTGGAGGTTCCTTTTGAtagctttaggtttataaacactttacttagctaatttctctttgtaaggagctgttagtctgagtagtaaaaactagtgaaagcaatgattttgtttgtttgtgggcagagctcttaatatc ctcatagacttttacattaaaattcagttgcattaaatttatactaagtataaacaagttaaaatataTTCTGTTG CGTTTTATTTGCAC
MID1603F	AAAAGACTGGAGGTTCCTTTTGA		
MID1357R	GTTCCAGCAAACAGAACACAAG	chr14:79655322+79655417	TTATACCTGCAAAGTGGGCATTtgacagagtaggggacagtcggagagcttatcgatacat acttattgctctcCTTGTGTTCTGTTTGCTGGAAC
MID1357F	TTATACCTGCAAAGTGGGCATT		
MID1176R	AAACTCCCAGTCCAAGGTGATA	chr5:56230868-56231018	GCTTACCTAGCAGGGTTGTTGTgaggatctaaaataataacatataaaaagcacctgttagca atgcctgatattcaataagtattttcccattttggctgcagctgttattattattgctgttgttatTATCACCTTG GACTGGGAGTTT
MID1176F	GCTTACCTAGCAGGGTTGTTGT		
MID1726R	TTTGTACTACGGCACATTAAGAGG	chr1:39431221+39431461	GTCCAAATGCACCACAATCTTagtttgacataattaactctcttagcattagatggaagagggg gaaggaattactatcaaatatgcaaaccaaaatagcagagctatctaaaatagaaccttctcagtaaacacaggtg tcatatttcccttgatctttttccttcctactttctggaaaaaaatcatttgttcttttgtgtagctggatacacaCCTC TTAATGTGCCGTAGTACAAA
MID1726F	GTCCAAATGCACCACAATCTT		
MID856F	TTAATTCTTGAGGGCAGAGGAG	chr5:65989012-65989296	TTAATTCTTGAGGGCAGAGGAGgaaagtaacatacgaaagagaagtaaatgagtaacagt atccaaagactgattctcctttacagaataacacaaggaaataatccaaaaggaagaaagcctagcctgatcaga actgaattgatcaacatgggaactgctcattagaatttcaggtatgtgataaggaagagccactttataaatcagaa gtaacactgtagacataagaatcttctaatcacaacgaagaagaaagtgtcGACCCAGAAAATGAG CACAATA
MID856R	TATTGTGCTCATTTTCTGGGTC		

ID - Identificação dos InDels; Chr - localização cromossômica

Apêndice C - Análise de ancestralidade no programa *Structure*,

Parâmetros da corrida:

- 15 loci

- 3 Populações

- 500000 Burn-in period

- 500000 Repetições

- Valor médio de Fst para as populações:

Africana = 0,6059

Europeia = 0,0910

Ameríndia = 0,4030

Frequência da ancestralidade de cada indivíduo para os indivíduos representantes da população Europeia, Africana, Ameríndia e coorte de Ribeirão Preto utilizando 15 InDels desenvolvidos por Santos et al (2010). ID = Identificação do indivíduo, AD = Ausência de dados, POP = População, AMR = Ameríndio, EUR = Europeia, AFR = Africana.

ID	AD	POP	AMR	EUR	AFR
AFR1	(0)	1	0,027	0,026	0,947
AFR3	(0)	1	0,003	0,011	0,986
AFR4	(0)	1	0,007	0,005	0,989
AFR5	(0)	1	0,002	0,007	0,991
AFR6	(0)	1	0,052	0,008	0,940
AFR7	(0)	1	0,009	0,013	0,978
AFR8	(0)	1	0,003	0,005	0,991
AFR9	(0)	1	0,002	0,010	0,988
AFR10	(0)	1	0,006	0,017	0,977
AFR11	(0)	1	0,008	0,010	0,982
AFR12	(0)	1	0,010	0,021	0,968
AFR14	(0)	1	0,006	0,016	0,979
AFR15	(0)	1	0,005	0,072	0,924
AFR16	(0)	1	0,051	0,176	0,773
AFR17	(0)	1	0,004	0,007	0,989
AFR19	(0)	1	0,010	0,013	0,977
AFR20	(0)	1	0,002	0,002	0,996
AFR21	(0)	1	0,003	0,012	0,985
AFR22	(0)	1	0,002	0,008	0,990
AFR23	(0)	1	0,080	0,035	0,885
AFR24	(0)	1	0,019	0,036	0,945
AFR25	(0)	1	0,010	0,039	0,952
AFR26	(0)	1	0,037	0,252	0,710
AFR27	(0)	1	0,005	0,005	0,990
AFR28	(0)	1	0,003	0,007	0,989
AFR30	(0)	1	0,076	0,014	0,910
AFR31	(0)	1	0,006	0,006	0,988
AFR32	(6)	1	0,004	0,006	0,990
AFR33	(0)	1	0,004	0,009	0,987
AFR35	(0)	1	0,004	0,007	0,988

AFR36	(0)	1	0,013	0,008	0,979
AFR37	(0)	1	0,003	0,005	0,991
AFR38	(0)	1	0,006	0,011	0,983
AFR41	(0)	1	0,046	0,012	0,942
AFR42	(0)	1	0,004	0,003	0,993
AFR43	(0)	1	0,003	0,005	0,992
AFR44	(0)	1	0,008	0,088	0,904
AFR45	(0)	1	0,004	0,015	0,981
AFR46	(0)	1	0,005	0,050	0,945
AFR47	(0)	1	0,005	0,004	0,991
AFR48	(0)	1	0,003	0,004	0,993
AFR49	(0)	1	0,011	0,026	0,963
AFR50	(0)	1	0,005	0,008	0,988
AFR51	(0)	1	0,005	0,053	0,942
AFR52	(0)	1	0,004	0,005	0,991
AFR53	(0)	1	0,008	0,007	0,985
AFR54	(0)	1	0,009	0,005	0,986
AFR55	(0)	1	0,020	0,036	0,944
AFR56	(0)	1	0,014	0,026	0,960
AFR57	(0)	1	0,002	0,004	0,994
AFR58	(0)	1	0,003	0,003	0,994
AFR59	(0)	1	0,004	0,005	0,991
AFR60	(0)	1	0,005	0,012	0,983
AFR61	(0)	1	0,005	0,008	0,987
AFR62	(0)	1	0,005	0,006	0,989
AFR63	(0)	1	0,008	0,013	0,979
AFR64	(0)	1	0,006	0,008	0,986
AFR65	(0)	1	0,003	0,005	0,993
AFR67	(0)	1	0,007	0,005	0,989
AFR68	(0)	1	0,008	0,007	0,986
AFR69	(0)	1	0,004	0,010	0,986
AFR70	(0)	1	0,002	0,021	0,977
AFR71	(0)	1	0,003	0,003	0,994
AFR72	(0)	1	0,013	0,015	0,972
AFR73	(0)	1	0,005	0,007	0,988
AFR74	(0)	1	0,012	0,233	0,754
AFR75	(0)	1	0,005	0,006	0,989
AFR76	(0)	1	0,011	0,009	0,980
AFR77	(0)	1	0,003	0,005	0,992
AFR78	(0)	1	0,003	0,008	0,989
AFR79	(0)	1	0,002	0,003	0,995
AFR80	(0)	1	0,004	0,018	0,978
AFR81	(0)	1	0,005	0,016	0,979
AFR82	(0)	1	0,024	0,043	0,934
AFR83	(0)	1	0,004	0,017	0,979
AFR84	(0)	1	0,005	0,007	0,988
AFR85	(0)	1	0,013	0,230	0,758
AFR86	(0)	1	0,005	0,006	0,990
AFR87	(0)	1	0,027	0,021	0,951
AFR88	(0)	1	0,010	0,018	0,972
AFR90	(0)	1	0,004	0,007	0,989
AFR91	(0)	1	0,026	0,015	0,959
AFR92	(0)	1	0,024	0,010	0,966
AFR93	(0)	1	0,008	0,053	0,939
AFR94	(0)	1	0,009	0,006	0,985
AFR95	(0)	1	0,008	0,028	0,964

AFR96	(0)	1	0,063	0,048	0,889
AFR97	(0)	1	0,020	0,012	0,968
AFR98	(0)	1	0,003	0,007	0,990
AFR99	(0)	1	0,005	0,029	0,965
AFR101	(0)	1	0,005	0,006	0,989
AFR102	(0)	1	0,004	0,005	0,991
AFR104	(0)	1	0,037	0,051	0,912
AFR105	(0)	1	0,003	0,004	0,993
AFR106	(0)	1	0,002	0,004	0,994
AFR107	(0)	1	0,020	0,016	0,964
AFR108	(0)	1	0,004	0,007	0,988
AFR109	(0)	1	0,004	0,005	0,991
AFR110	(0)	1	0,005	0,005	0,991
AFR111	(0)	1	0,004	0,008	0,988
AFR112	(0)	1	0,003	0,008	0,989
AFR113	(0)	1	0,051	0,660	0,289
AFR114	(0)	1	0,007	0,025	0,968
AFR116	(6)	1	0,068	0,165	0,767
AFR118	(6)	1	0,061	0,515	0,424
AFR121	(6)	1	0,058	0,520	0,422
AFR122	(6)	1	0,011	0,033	0,956
AFR123	(20)	1	0,019	0,011	0,970
AFR126	(6)	1	0,053	0,014	0,933
AFR128	(0)	1	0,007	0,005	0,988
AFR131	(0)	1	0,003	0,003	0,994
AFR132	(0)	1	0,002	0,003	0,995
AFR133	(0)	1	0,010	0,032	0,958
AFR134	(0)	1	0,007	0,008	0,985
AFR136	(0)	1	0,004	0,005	0,990
AFR137	(0)	1	0,011	0,026	0,963
AFR138	(0)	1	0,002	0,005	0,992
AFR139	(0)	1	0,005	0,006	0,989
AFR140	(0)	1	0,002	0,004	0,994
AFR142	(0)	1	0,006	0,006	0,989
AFR143	(0)	1	0,005	0,010	0,984
AFR144	(0)	1	0,006	0,044	0,950
AFR145	(0)	1	0,051	0,009	0,940
AFR146	(0)	1	0,003	0,005	0,992
AFR147	(0)	1	0,010	0,015	0,975
AFR148	(0)	1	0,003	0,003	0,993
AFR149	(0)	1	0,005	0,054	0,941
AFR150	(0)	1	0,028	0,015	0,957
AFR152	(0)	1	0,006	0,006	0,988
AFR153	(0)	1	0,006	0,005	0,989
AFR154	(0)	1	0,006	0,021	0,973
AFR155	(0)	1	0,002	0,005	0,992
AFR156	(0)	1	0,005	0,015	0,980
AFR157	(33)	1	0,023	0,007	0,969
AFR158	(0)	1	0,005	0,036	0,959
AFR160	(0)	1	0,005	0,004	0,991
AFR161	(0)	1	0,003	0,005	0,992
AFR162	(0)	1	0,004	0,016	0,980
AFR163	(0)	1	0,005	0,004	0,991
AFR164	(0)	1	0,010	0,004	0,986
AFR165	(0)	1	0,006	0,007	0,987
AFR166	(0)	1	0,007	0,011	0,983

AFR168	(0)	1	0,003	0,003	0,994
AFR169	(0)	1	0,004	0,010	0,986
AFR170	(0)	1	0,017	0,473	0,510
AFR171	(0)	1	0,009	0,007	0,984
AFR172	(0)	1	0,003	0,003	0,994
AFR173	(0)	1	0,008	0,006	0,986
AFR174	(0)	1	0,005	0,006	0,989
AFR175	(0)	1	0,003	0,004	0,993
AFR176	(0)	1	0,003	0,004	0,993
AFR177	(0)	1	0,018	0,008	0,975
AFR178	(0)	1	0,003	0,004	0,992
AFR180	(0)	1	0,003	0,005	0,992
AFR181	(0)	1	0,013	0,005	0,983
AFR182	(0)	1	0,004	0,005	0,992
AFR183	(0)	1	0,004	0,010	0,986
AFR185	(0)	1	0,010	0,025	0,965
AFR186	(0)	1	0,002	0,004	0,995
AFR187	(0)	1	0,003	0,020	0,976
AFR188	(0)	1	0,013	0,025	0,962
AFR189	(0)	1	0,003	0,005	0,992
AFR190	(0)	1	0,002	0,006	0,992
AFR191	(0)	1	0,004	0,003	0,993
AFR192	(0)	1	0,005	0,004	0,991
AFR193	(33)	1	0,006	0,006	0,988
AFR194	(33)	1	0,014	0,008	0,979
AFR196	(33)	1	0,004	0,007	0,989
AFR197	(33)	1	0,005	0,003	0,992
AFR198	(33)	1	0,005	0,003	0,993
AFR199	(33)	1	0,004	0,006	0,990
AFR200	(33)	1	0,010	0,011	0,979
AFR201	(0)	1	0,005	0,009	0,986
AFR202	(0)	1	0,010	0,008	0,982
AFR203	(0)	1	0,006	0,005	0,989
AFR204	(0)	1	0,008	0,013	0,980
AFR205	(0)	1	0,017	0,020	0,963
AFR206	(0)	1	0,002	0,009	0,989
AFR207	(0)	1	0,004	0,006	0,990
AFR208	(0)	1	0,004	0,004	0,991
AFR209	(0)	1	0,004	0,009	0,988
AFR210	(0)	1	0,013	0,037	0,949
AFR211	(0)	1	0,006	0,008	0,987
AFR212	(0)	1	0,022	0,031	0,947
AFR213	(0)	1	0,003	0,050	0,947
AFR214	(0)	1	0,011	0,019	0,970
AFR215	(0)	1	0,003	0,002	0,995
AFR216	(0)	1	0,007	0,055	0,937
AFR218	(0)	1	0,011	0,050	0,940
EUR1	(0)	2	0,015	0,962	0,023
EUR2	(0)	2	0,009	0,988	0,003
EUR3	(0)	2	0,005	0,977	0,018
EUR5	(0)	2	0,003	0,991	0,006
EUR6	(0)	2	0,014	0,976	0,010
EUR7	(0)	2	0,045	0,949	0,006
EUR8	(0)	2	0,024	0,955	0,021
EUR9	(0)	2	0,008	0,972	0,020
EUR10	(0)	2	0,006	0,988	0,005

EUR11	(0)	2	0,007	0,987	0,006
EUR12	(0)	2	0,012	0,978	0,010
EUR13	(0)	2	0,006	0,979	0,015
EUR14	(0)	2	0,006	0,989	0,006
EUR15	(0)	2	0,005	0,931	0,064
EUR16	(0)	2	0,004	0,989	0,007
EUR17	(0)	2	0,056	0,938	0,007
EUR18	(0)	2	0,042	0,951	0,007
EUR19	(0)	2	0,004	0,987	0,009
EUR20	(0)	2	0,021	0,974	0,004
EUR22	(0)	2	0,003	0,975	0,022
EUR23	(0)	2	0,006	0,985	0,009
EUR24	(0)	2	0,006	0,957	0,037
EUR25	(0)	2	0,017	0,972	0,011
EUR26	(0)	2	0,004	0,980	0,017
EUR27	(0)	2	0,009	0,984	0,006
EUR28	(0)	2	0,007	0,988	0,005
EUR29	(0)	2	0,010	0,982	0,009
EUR30	(0)	2	0,044	0,951	0,004
EUR31	(0)	2	0,015	0,972	0,014
EUR32	(0)	2	0,005	0,987	0,009
EUR33	(0)	2	0,008	0,985	0,007
EUR34	(0)	2	0,008	0,987	0,005
EUR35	(0)	2	0,012	0,984	0,004
EUR36	(0)	2	0,012	0,984	0,005
EUR38	(0)	2	0,023	0,944	0,033
EUR39	(0)	2	0,002	0,986	0,012
EUR40	(0)	2	0,006	0,990	0,005
EUR41	(0)	2	0,157	0,831	0,013
EUR43	(0)	2	0,012	0,983	0,005
EUR44	(0)	2	0,007	0,939	0,054
EUR45	(0)	2	0,007	0,987	0,007
EUR46	(0)	2	0,006	0,973	0,021
EUR47	(0)	2	0,023	0,972	0,005
EUR48	(0)	2	0,019	0,972	0,009
EUR49	(33)	2	0,010	0,493	0,497
EUR50	(0)	2	0,012	0,975	0,013
EUR51	(0)	2	0,006	0,990	0,004
EUR52	(0)	2	0,025	0,964	0,012
EUR53	(0)	2	0,005	0,977	0,018
EUR54	(0)	2	0,006	0,986	0,008
EUR55	(0)	2	0,167	0,824	0,009
EUR57	(0)	2	0,016	0,966	0,017
EUR58	(0)	2	0,012	0,970	0,018
EUR59	(0)	2	0,006	0,988	0,006
EUR60	(0)	2	0,003	0,972	0,025
EUR61	(0)	2	0,022	0,954	0,024
EUR62	(0)	2	0,100	0,893	0,007
EUR63	(0)	2	0,027	0,966	0,008
EUR64	(0)	2	0,002	0,990	0,008
EUR66	(0)	2	0,026	0,969	0,005
EUR67	(0)	2	0,007	0,985	0,007
EUR68	(0)	2	0,044	0,951	0,005
EUR69	(0)	2	0,004	0,993	0,003
EUR70	(0)	2	0,005	0,949	0,046
EUR71	(0)	2	0,005	0,990	0,004

EUR72	(0)	2	0,005	0,969	0,026
EUR73	(0)	2	0,018	0,793	0,189
EUR74	(0)	2	0,014	0,974	0,012
EUR75	(0)	2	0,009	0,982	0,009
EUR76	(0)	2	0,005	0,990	0,005
EUR77	(0)	2	0,009	0,967	0,025
EUR78	(0)	2	0,006	0,989	0,005
EUR79	(0)	2	0,011	0,907	0,083
EUR80	(0)	2	0,007	0,917	0,076
EUR81	(0)	2	0,009	0,971	0,020
EUR82	(0)	2	0,004	0,989	0,008
EUR83	(0)	2	0,007	0,978	0,015
EUR84	(0)	2	0,006	0,989	0,005
EUR86	(33)	2	0,021	0,967	0,013
EUR87	(0)	2	0,012	0,985	0,002
EUR88	(0)	2	0,011	0,871	0,118
EUR89	(0)	2	0,010	0,982	0,007
EUR90	(0)	2	0,009	0,983	0,008
EUR91	(0)	2	0,004	0,981	0,015
EUR92	(0)	2	0,018	0,978	0,004
EUR93	(0)	2	0,037	0,957	0,006
EUR94	(33)	2	0,007	0,984	0,009
EUR95	(33)	2	0,056	0,865	0,079
EUR96	(0)	2	0,007	0,990	0,003
EUR97	(0)	2	0,005	0,982	0,014
EUR98	(0)	2	0,008	0,962	0,030
EUR99	(0)	2	0,008	0,974	0,018
EUR100	(0)	2	0,003	0,899	0,098
EUR101	(0)	2	0,010	0,793	0,197
EUR102	(0)	2	0,078	0,919	0,003
EUR103	(0)	2	0,006	0,983	0,011
EUR104	(0)	2	0,005	0,983	0,012
EUR105	(0)	2	0,056	0,940	0,005
EUR106	(0)	2	0,004	0,989	0,007
EUR107	(0)	2	0,007	0,990	0,003
EUR109	(0)	2	0,042	0,953	0,005
EUR110	(0)	2	0,053	0,919	0,028
EUR111	(0)	2	0,011	0,984	0,005
EUR112	(0)	2	0,003	0,981	0,015
EUR113	(0)	2	0,004	0,990	0,006
EUR114	(0)	2	0,004	0,984	0,012
EUR115	(0)	2	0,004	0,991	0,005
EUR116	(0)	2	0,036	0,957	0,006
EUR117	(0)	2	0,005	0,989	0,006
EUR118	(0)	2	0,004	0,990	0,006
EUR119	(0)	2	0,067	0,929	0,004
EUR120	(0)	2	0,009	0,987	0,004
EUR121	(0)	2	0,057	0,927	0,016
EUR122	(0)	2	0,029	0,828	0,143
EUR123	(0)	2	0,008	0,928	0,065
EUR125	(0)	2	0,005	0,976	0,019
EUR126	(0)	2	0,014	0,973	0,013
EUR127	(0)	2	0,006	0,987	0,007
EUR128	(0)	2	0,014	0,977	0,009
EUR129	(0)	2	0,074	0,894	0,031
EUR130	(0)	2	0,005	0,987	0,008

EUR131	(0)	2	0,005	0,988	0,008
EUR132	(0)	2	0,006	0,990	0,004
EUR134	(0)	2	0,026	0,956	0,017
EUR135	(0)	2	0,006	0,952	0,042
EUR136	(0)	2	0,011	0,983	0,006
EUR137	(0)	2	0,005	0,973	0,022
EUR138	(0)	2	0,006	0,925	0,069
EUR139	(0)	2	0,009	0,987	0,004
EUR140	(0)	2	0,025	0,946	0,030
EUR141	(0)	2	0,015	0,970	0,015
EUR142	(33)	2	0,046	0,944	0,010
EUR143	(0)	2	0,004	0,963	0,032
EUR144	(0)	2	0,019	0,977	0,005
EUR145	(33)	2	0,011	0,978	0,011
EUR147	(0)	2	0,006	0,975	0,019
EUR148	(0)	2	0,012	0,984	0,004
EUR149	(0)	2	0,019	0,947	0,033
EUR151	(0)	2	0,003	0,989	0,009
EUR152	(0)	2	0,009	0,980	0,012
EUR154	(0)	2	0,012	0,980	0,008
EUR155	(0)	2	0,016	0,980	0,004
EUR156	(0)	2	0,006	0,988	0,006
EUR157	(0)	2	0,013	0,981	0,006
EUR158	(0)	2	0,007	0,985	0,008
EUR159	(0)	2	0,004	0,972	0,024
EUR160	(0)	2	0,015	0,969	0,016
EUR161	(0)	2	0,012	0,810	0,178
EUR162	(0)	2	0,005	0,989	0,006
EUR163	(0)	2	0,007	0,923	0,070
EUR164	(0)	2	0,007	0,988	0,005
EUR165	(0)	2	0,011	0,970	0,019
EUR167	(0)	2	0,019	0,976	0,005
EUR168	(33)	2	0,069	0,919	0,012
EUR169	(0)	2	0,016	0,977	0,008
EUR170	(0)	2	0,025	0,969	0,006
EUR171	(0)	2	0,004	0,983	0,012
EUR172	(0)	2	0,009	0,984	0,007
EUR173	(0)	2	0,004	0,992	0,004
EUR174	(0)	2	0,032	0,957	0,011
EUR175	(0)	2	0,005	0,992	0,003
IND1	(0)	3	0,978	0,008	0,014
IND2	(0)	3	0,993	0,003	0,005
IND3	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND4	(0)	3	0,983	0,009	0,008
IND5	(0)	3	0,992	0,003	0,005
IND6	(0)	3	0,984	0,010	0,006
IND7	(0)	3	0,989	0,007	0,004
IND8	(0)	3	0,986	0,006	0,008
IND9	(0)	3	0,990	0,006	0,004
IND10	(0)	3	0,924	0,030	0,046
IND11	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND12	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND13	(0)	3	0,978	0,005	0,016
IND14	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND15	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND16	(0)	3	0,992	0,004	0,004

IND17	(0)	3	0,778	0,024	0,198
IND18	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND19	(0)	3	0,992	0,006	0,003
IND20	(0)	3	0,989	0,004	0,006
IND21	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND22	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND23	(0)	3	0,991	0,004	0,005
IND24	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND25	(0)	3	0,919	0,035	0,046
IND26	(0)	3	0,994	0,003	0,002
IND27	(0)	3	0,963	0,019	0,018
IND28	(0)	3	0,994	0,003	0,002
IND29	(0)	3	0,993	0,003	0,004
IND30	(0)	3	0,990	0,005	0,005
IND31	(0)	3	0,994	0,004	0,003
IND32	(0)	3	0,991	0,004	0,005
IND33	(0)	3	0,994	0,004	0,002
IND34	(0)	3	0,992	0,005	0,003
IND35	(0)	3	0,989	0,007	0,004
IND36	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND37	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND38	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND39	(0)	3	0,988	0,006	0,006
IND40	(0)	3	0,994	0,003	0,002
IND41	(0)	3	0,992	0,004	0,003
IND42	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND43	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND44	(13)	3	0,992	0,005	0,003
IND45	(20)	3	0,993	0,003	0,004
IND46	(0)	3	0,886	0,070	0,043
IND47	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND48	(0)	3	0,992	0,006	0,003
IND49	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND50	(0)	3	0,994	0,004	0,003
IND51	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND53	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND54	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND55	(0)	3	0,991	0,004	0,006
IND56	(0)	3	0,991	0,004	0,005
IND57	(6)	3	0,994	0,004	0,003
IND58	(0)	3	0,988	0,004	0,008
IND59	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND60	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND61	(0)	3	0,994	0,004	0,002
IND62	(6)	3	0,991	0,004	0,005
IND63	(0)	3	0,991	0,004	0,005
IND64	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND65	(0)	3	0,992	0,004	0,003
IND66	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND67	(0)	3	0,990	0,005	0,005
IND68	(0)	3	0,993	0,003	0,004
IND69	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND70	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND71	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND72	(0)	3	0,987	0,003	0,010
IND73	(0)	3	0,993	0,004	0,003

IND74	(0)	3	0,994	0,003	0,002
IND75	(0)	3	0,992	0,004	0,003
IND76	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND77	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND78	(0)	3	0,987	0,008	0,005
IND80	(0)	3	0,982	0,007	0,012
IND81	(0)	3	0,936	0,029	0,035
IND82	(0)	3	0,879	0,066	0,054
IND83	(0)	3	0,988	0,006	0,006
IND84	(0)	3	0,990	0,003	0,007
IND85	(0)	3	0,981	0,012	0,007
IND86	(0)	3	0,975	0,010	0,015
IND88	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND89	(0)	3	0,974	0,012	0,014
IND90	(0)	3	0,988	0,005	0,007
IND91	(0)	3	0,989	0,004	0,007
IND92	(6)	3	0,986	0,007	0,007
IND94	(0)	3	0,988	0,006	0,006
IND96	(6)	3	0,985	0,009	0,006
IND97	(0)	3	0,976	0,014	0,010
IND98	(0)	3	0,985	0,011	0,004
IND99	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND100	(0)	3	0,978	0,019	0,003
IND101	(0)	3	0,990	0,006	0,004
IND102	(0)	3	0,991	0,003	0,005
IND103	(0)	3	0,989	0,005	0,005
IND104	(0)	3	0,994	0,004	0,002
IND105	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND106	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND107	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND108	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND109	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND110	(0)	3	0,918	0,031	0,051
IND111	(0)	3	0,992	0,004	0,005
IND112	(0)	3	0,991	0,004	0,005
IND113	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND114	(0)	3	0,982	0,012	0,006
IND115	(0)	3	0,990	0,004	0,006
IND116	(0)	3	0,988	0,007	0,005
IND117	(0)	3	0,994	0,004	0,002
IND118	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND119	(6)	3	0,990	0,007	0,003
IND120	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND121	(0)	3	0,992	0,005	0,004
IND122	(0)	3	0,992	0,005	0,003
IND123	(6)	3	0,981	0,012	0,007
IND124	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND125	(0)	3	0,963	0,024	0,012
IND126	(0)	3	0,992	0,005	0,003
IND127	(0)	3	0,965	0,020	0,014
IND128	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND129	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND130	(0)	3	0,992	0,005	0,003
IND131	(0)	3	0,983	0,013	0,005
IND132	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND133	(0)	3	0,993	0,004	0,003

IND134	(0)	3	0,988	0,006	0,006
IND135	(0)	3	0,990	0,006	0,004
IND136	(0)	3	0,990	0,005	0,005
IND137	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND138	(0)	3	0,993	0,005	0,002
IND139	(0)	3	0,979	0,014	0,007
IND140	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND141	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND142	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND143	(0)	3	0,911	0,049	0,040
IND144	(0)	3	0,988	0,008	0,004
IND145	(0)	3	0,984	0,012	0,004
IND146	(0)	3	0,988	0,006	0,006
IND147	(0)	3	0,826	0,105	0,068
IND148	(0)	3	0,983	0,012	0,005
IND149	(0)	3	0,924	0,044	0,032
IND150	(0)	3	0,980	0,010	0,010
IND151	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND152	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND153	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND154	(0)	3	0,995	0,003	0,003
IND155	(0)	3	0,978	0,009	0,013
IND156	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND157	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND158	(0)	3	0,996	0,002	0,002
IND159	(0)	3	0,993	0,003	0,003
IND160	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND161	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND162	(0)	3	0,992	0,003	0,004
IND163	(0)	3	0,992	0,003	0,005
IND164	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND165	(0)	3	0,993	0,005	0,003
IND166	(0)	3	0,977	0,011	0,011
IND167	(0)	3	0,975	0,014	0,011
IND168	(0)	3	0,990	0,005	0,005
IND169	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND170	(0)	3	0,993	0,004	0,004
IND171	(0)	3	0,900	0,034	0,066
IND172	(6)	3	0,989	0,004	0,007
IND173	(0)	3	0,979	0,009	0,012
IND174	(0)	3	0,991	0,004	0,006
IND176	(0)	3	0,995	0,002	0,003
IND177	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND178	(0)	3	0,986	0,007	0,007
IND179	(0)	3	0,993	0,003	0,004
IND180	(0)	3	0,993	0,003	0,003
IND182	(0)	3	0,957	0,020	0,022
IND183	(0)	3	0,995	0,002	0,003
IND184	(0)	3	0,965	0,008	0,027
IND185	(0)	3	0,981	0,007	0,012
IND186	(0)	3	0,990	0,005	0,005
IND187	(0)	3	0,990	0,004	0,005
IND188	(0)	3	0,995	0,003	0,003
IND189	(0)	3	0,983	0,005	0,012
IND190	(0)	3	0,994	0,004	0,002
IND191	(0)	3	0,993	0,003	0,004

IND192	(0)	3	0,989	0,005	0,006
IND193	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND194	(0)	3	0,978	0,013	0,009
IND195	(0)	3	0,988	0,006	0,006
IND196	(0)	3	0,987	0,009	0,004
IND199	(0)	3	0,980	0,015	0,005
IND200	(0)	3	0,978	0,013	0,009
IND201	(0)	3	0,948	0,046	0,006
IND202	(0)	3	0,974	0,010	0,016
IND203	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND204	(0)	3	0,994	0,003	0,003
IND205	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND206	(0)	3	0,992	0,004	0,004
IND207	(6)	3	0,985	0,009	0,006
IND208	(0)	3	0,978	0,017	0,005
IND209	(0)	3	0,984	0,013	0,003
IND210	(6)	3	0,977	0,018	0,005
IND211	(6)	3	0,990	0,007	0,003
IND212	(0)	3	0,991	0,005	0,004
IND213	(0)	3	0,994	0,004	0,003
IND214	(0)	3	0,966	0,010	0,024
IND215	(0)	3	0,974	0,011	0,015
IND216	(0)	3	0,988	0,005	0,008
IND217	(0)	3	0,994	0,003	0,002
IND218	(0)	3	0,992	0,005	0,003
IND219	(0)	3	0,993	0,004	0,003
IND220	(0)	3	0,994	0,004	0,003
IND221	(0)	3	0,918	0,026	0,057
IND222	(0)	3	0,974	0,015	0,011
IND223	(0)	3	0,988	0,008	0,003
IND224	(0)	3	0,986	0,010	0,004
IND226	(0)	3	0,962	0,022	0,016
IND227	(0)	3	0,979	0,009	0,012
IND228	(0)	3	0,988	0,008	0,004
IND229	(0)	3	0,979	0,009	0,012
IND230	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND231	(0)	3	0,988	0,006	0,005
IND232	(0)	3	0,989	0,005	0,006
IND233	(0)	3	0,987	0,008	0,004
IND234	(6)	3	0,990	0,006	0,004
IND235	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND236	(0)	3	0,996	0,002	0,002
IND237	(0)	3	0,995	0,002	0,002
IND240	(0)	3	0,941	0,052	0,007
IND241	(0)	3	0,971	0,023	0,007
IND242	(0)	3	0,994	0,003	0,002
IND243	(0)	3	0,992	0,006	0,002
IND244	(0)	3	0,991	0,007	0,003
IND245	(0)	3	0,994	0,004	0,003
IND246	(0)	3	0,994	0,004	0,003
IND248	(0)	3	0,867	0,127	0,006
IND249	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND250	(0)	3	0,995	0,003	0,002
IND251	(0)	3	0,992	0,006	0,002
IND252	(0)	3	0,930	0,065	0,005
IND253	(0)	3	0,941	0,052	0,007

IND254	(0)	3	0,996	0,002	0,002
IND255	(0)	3	0,985	0,011	0,004
IND256	(0)	3	0,995	0,003	0,002
38	(0)	4	0,081	0,899	0,020
51	(0)	4	0,243	0,693	0,064
87	(6)	4	0,020	0,961	0,019
133	(6)	4	0,075	0,900	0,025
176	(6)	4	0,048	0,940	0,012
308	(6)	4	0,009	0,971	0,020
362	(6)	4	0,009	0,975	0,016
384	(0)	4	0,045	0,947	0,008
390	(6)	4	0,009	0,942	0,050
474	(0)	4	0,010	0,974	0,016
527	(6)	4	0,025	0,966	0,009
703	(6)	4	0,013	0,932	0,055
1028	(0)	4	0,039	0,952	0,009
1033	(0)	4	0,462	0,523	0,015
1135	(6)	4	0,043	0,948	0,009
1145	(0)	4	0,030	0,815	0,155
1181	(0)	4	0,405	0,567	0,028
1182	(6)	4	0,030	0,935	0,035
1248	(6)	4	0,027	0,902	0,071
1268	(6)	4	0,006	0,983	0,011
1306	(0)	4	0,424	0,502	0,075
1308	(0)	4	0,039	0,828	0,134
1345	(0)	4	0,071	0,901	0,028
1482	(6)	4	0,182	0,783	0,035
1531	(0)	4	0,010	0,969	0,022
1543	(6)	4	0,013	0,973	0,014
1855	(0)	4	0,009	0,982	0,010
1871	(0)	4	0,012	0,963	0,025
1885	(0)	4	0,148	0,754	0,099
1886	(6)	4	0,030	0,953	0,017
1890	(13)	4	0,014	0,677	0,309
1911	(6)	4	0,013	0,978	0,009
1929	(6)	4	0,022	0,974	0,003
1983	(0)	4	0,048	0,939	0,013
2012	(0)	4	0,467	0,518	0,015
2025	(0)	4	0,017	0,809	0,173
2026	(0)	4	0,033	0,910	0,057
2039	(6)	4	0,279	0,703	0,018
2076	(6)	4	0,046	0,942	0,012

Apêndice D – Valor da análise de desequilíbrio de ligação para cada SNP e suas possíveis combinações (D estatístico).

	CPAMD8A	CPAMD8b	CX3CR1	CBR3,AS1	IGFLR1	ACOT11	ZBTB32	NOX5	FAM134A	CCDC159	ERLEC1	IQGAP3	SPESP1	UBGLN4	KIR3DL3	CNPPD1	MLL4
CPAMD8A	,	0,1662	-0,0248	-0,0125	0,0182	0,0302	0,0153	-6e-04	0,0332	0,0048	-0,0177	0,0067	0,0089	0,0367	-0,0248	0,0134	0,0064
CPAMD8b	,	,	-0,0163	-0,0099	0,0203	0,0183	0,0181	0,011	0,0292	-0,0073	-0,0263	-0,0077	0,0081	0,0387	-0,0374	0,0148	0,0293
CX3CR1	,	,	,	0,0216	0,0254	-0,0085	0,0186	0,0029	-0,0096	-0,0082	0,019	0,021	0,0024	-0,0077	0,0483	-0,0076	-0,0168
CBR3,AS1	,	,	,	,	-0,0129	-0,0041	-0,0022	0,0114	0,0248	3e-04	-0,0119	-0,0169	0,0215	-0,04	0,0031	0,0416	0,0101
IGFLR1	,	,	,	,	,	0,015	0,1051	-0,0076	-0,019	-0,0064	0,0083	0,0113	-0,0248	0,0129	-0,0062	-0,0249	-0,0612
ACOT11	,	,	,	,	,	,	0,0155	-0,0041	0,002	0,0032	-0,0092	0,0031	0,0091	-0,015	-0,0129	0,0117	-0,0275
ZBTB32	,	,	,	,	,	,	,	-0,008	-0,0266	-0,0099	0,0089	0,0151	-0,0204	0,02	-0,006	-0,0391	-0,0641
NOX5	,	,	,	,	,	,	,	,	0	-0,0104	-0,0054	0,0094	-0,0197	0,0152	-0,0042	0,0103	0,0014
FAM134A	,	,	,	,	,	,	,	,	,	-0,0162	0,0014	0,0288	-0,0069	-0,0058	0,0265	0,2085	0,0054
CCDC159	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,0147	-0,0364	-0,0311	0,0239	-0,014	-0,0041	0,0021
ERLEC1	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,0049	-0,0243	0,0099	0,0052	-0,0218	-0,0026
IQGAP3	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	-0,0173	0,0118	0,0028	0,0145	-0,0011
SPESP1	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,0032	0,0134	0,0165	0,0073
UBGLN4	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	-0,0241	-0,0299	0,0092
KIR3DL3	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,0106	-0,0198
CNPPD1	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,0207
MLL4	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,

Apêndice E - Valor da análise de desequilíbrio de ligação para cada SNP e suas possíveis combinações (p-valor; Método de Fisher).

	CPAMD8A	CPAMD8b	CX3CR1	CBR3,AS1	IGFLR1	ACOT11	ZBTB32	NOX5	FAM134A	CCDC159	ERLEC1	IQGAP3	SPESP1	UBGLN4	KIR3DL3	CNPPD1	MLL4
CPAMD8A	,	0	0,0344	0,4668	0,1061	0,0044	0,1856	0,9367	0,0552	0,7755	0,0731	0,6618	0,6021	0,0331	0,1503	0,4315	0,7061
CPAMD8b	,	,	0,1282	0,526	0,0488	0,0579	0,0872	0,1393	0,0649	0,6346	0,0034	0,5872	0,6025	0,0139	0,0176	0,3436	0,0608
CX3CR1	,	,	,	0,07	0,0012	0,2472	0,0206	0,6038	0,4261	0,479	0,0054	0,0497	0,8379	0,5231	1e-04	0,5239	0,1573
CBR3,AS1	,	,	,	,	0,2599	0,702	0,8535	0,1686	0,1574	0,9837	0,2348	0,2815	0,2147	0,0228	0,8593	0,0167	0,5599
IGFLR1	,	,	,	,	,	0,0334	0	0,1634	0,0998	0,5666	0,2092	0,2745	0,0304	0,2652	0,5914	0,03	0
ACOT11	,	,	,	,	,	,	0,0312	0,4262	0,8551	0,7593	0,1336	0,7504	0,3938	0,1643	0,2314	0,2744	0,0104
ZBTB32	,	,	,	,	,	,	,	0,1542	0,0247	0,3896	0,1857	0,1548	0,0823	0,0915	0,6104	9e-04	0
NOX5	,	,	,	,	,	,	,	,	0,9965	0,1978	0,2536	0,207	0,0164	0,0682	0,6154	0,2116	0,8697
FAM134A	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,3473	0,887	0,0697	0,6926	0,7437	0,1313	0	0,7584
CCDC159	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,13	0,0171	0,0649	0,1604	0,4119	0,8076	0,8996
ERLEC1	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,585	0,0146	0,3223	0,6002	0,0285	0,7967
IQGAP3	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,2624	0,4485	0,8557	0,3524	0,9444
SPESP1	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,8531	0,4378	0,3381	0,6736
UBGLN4	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,168	0,086	0,5952
KIR3DL3	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,5431	0,2564
CNPPD1	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	0,2281
MLL4	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,

Apêndice F - Tabela da análise de regressão logística condicionada para frente utilizando o conjunto de 18 SNP na coorte de Ribeirão Preto, modelo dominante.

Variável dependente	R	R^2	ΔR2	F	p	SI
2	0.2328	5.42%	5.42%	6.7603	0.0102	rs1824152
2, 11,	0.2458	6.04%	0.62%	3.6983	0.027	rs6887
2, 11, 9,	0.2722	7.41%	1.37%	3.0407	0.0312	rs2277552
2, 11, 9, 8,	0.2881	8.30%	0.89%	2.558	0.0418	rs2227278
2, 11, 9, 8, 3,	0.3249	10.56%	2.26%	2.6444	0.0264	rs3745335
2, 11, 9, 8, 3, 18,	0.3294	10.85%	0.29%	2.251	0.043	rs231591
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6,	0.3454	11.93%	1.08%	2.1289	0.0458	rs34562867
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14,	0.3485	12.14%	0.21%	1.883	0.0694	rs3743093
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5,	0.3527	12.44%	0.30%	1.7049	0.0961	rs8133052
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17,	0.3568	12.73%	0.29%	1.5609	0.128	rs1043160
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17, 10,	0.3577	12.80%	0.07%	1.4142	0.1768	rs3731900
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17, 10, 15,	0.3588	12.87%	0.08%	1.2928	0.2332	rs2297792
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17, 10, 15, 7,	0.3588	12.88%	0.00%	1.1823	0.3021	rs1702003
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17, 10, 15, 7, 13,	0.3636	13.22%	0.35%	1.1212	0.3484	rs744224
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17, 10, 15, 7, 13, 4,	0.3645	13.28%	0.06%	1.0417	0.4203	rs3732378
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17, 10, 15, 7, 13, 4, 12,	0.3675	13.51%	0.22%	0.9857	0.5215	rs2287345
2, 11, 9, 8, 3, 18, 6, 14, 5, 17, 10, 15, 7, 13, 4, 12, 16,	0.3676	13.52%	0.01%	0.9194	0.5538	rs117372288

R- Coeficiente de determinação; R^2 – Coeficiente de determinação ajustado; ΔR2 – Variação do coeficiente de determinação; F- Valor da regressão; p – p-valor de significância; SI – SNP incluído.

Apêndice G - Tabela da análise de regressão logística condicionada para frente utilizando o conjunto de 18 SNP na coorte de Ribeirão Preto, modelo recessivo.

Variável dependente	R	R^2	ΔR2	F	p	SI
11	0.142	2.02%	2.02%	2.4276	0.1179	rs6887
11, 17,	0.1857	3.45%	1.43%	2.0891	0.1263	rs1043160
11, 17, 6,	0.2212	4.89%	1.44%	1.9893	0.118	rs34562867
11, 17, 6, 12,	0.2398	5.75%	0.86%	1.7539	0.1419	rs2287345
11, 17, 6, 12, 4,	0.2495	6.22%	0.47%	1.5129	0.1903	rs3732378
11, 17, 6, 12, 4, 5,	0.2632	6.93%	0.71%	1.4018	0.2192	rs8133052
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15,	0.2657	7.06%	0.13%	1.2151	0.2997	rs2297792
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13,	0.2797	7.82%	0.77%	1.1776	0.3184	rs744224
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3,	0.2869	8.23%	0.41%	1.096	0.3716	rs3745335
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7,	0.2908	8.46%	0.23%	1.0067	0.443	rs1702003
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7, 9,	0.2909	8.46%	0.01%	0.9078	0.536	rs2277552
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7, 9, 14,	0.2919	8.52%	0.06%	0.8307	0.6196	rs3743093
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7, 9, 14, 2,	0.2922	8.54%	0.01%	0.761	0.6998	rs1824152
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7, 9, 14, 2, 8,	0.3045	9.27%	0.74%	0.7667	0.7033	rs2227278
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7, 9, 14, 2, 8, 10,	0.3047	9.29%	0.01%	0.7098	0.7703	rs3731900
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7, 9, 14, 2, 8, 10, 16,	0.3056	9.34%	0.05%	0.6633	0.8236	rs117372288
11, 17, 6, 12, 4, 5, 15, 13, 3, 7, 9, 14, 2, 8, 10, 16, 18,	0.3061	9.37%	0.03%	0.6205	0.8689	rs231591

R- Coeficiente de determinação; R^2 – Coeficiente de determinação ajustado; ΔR2 – Variação do coeficiente de determinação; F- Valor da regressão; p – p-valor de significância; SI – SNP incluído.

ANEXOS

Anexo A – Termo de aprovação do comitê de ética.

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de associação de SNP e obesidade em uma população miscigenada do sudeste do Brasil

Pesquisador: DIANA OLIVEIRA RIBEIRO

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 74509817.4.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.428.910

Apresentação do Projeto:

A obesidade, definida como o desequilíbrio entre a ingestão e gasto de energia do corpo, é a principal desordem nutricional da atualidade. É considerada multifatorial, em que a severidade é maior com o aumento da predisposição genética. A existência de sítios específicos de variantes gênicas relevantes, que mudam consideravelmente entre indivíduos, torna a pesquisa nessa área ainda mais complexa. Para tal, uma das principais abordagens utilizadas é o estudo de associação e análise de desequilíbrio ligação para marcadores genéticos conhecidos como SNP (Single Nucleotide Polymorphism) que desempenham um papel muito importante dentro dos estudos populacionais e de traços complexos, principalmente por sua ampla distribuição no genoma, tanto em regiões codificadoras como não codificadoras. Na população brasileira os índices de sobrepeso e obesidade são altos e a aumentam gradativamente, no entanto, as informações geradas sobre essa temática em seus aspectos genéticos na população brasileira ainda são muito escassos. Assim sendo, este trabalho pretende utilizar SNP baseados no exoma de índios obesos e aplica-los numa coorte de Ribeirão Preto, o que ajudará na compreensão dos padrões gênicos da obesidade em populações miscigenadas. Para isso, 23 variantes gênicas (SNPs) obtidas a partir do exoma indígena serão selecionados. Uma coorte de 100 indivíduos da população de Ribeirão Preto terá sua ancestralidade definida e será genotipada utilizando esse conjunto de marcadores SNPs pré-

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

selecionados. Assim, espera-se encontrar um padrão de assinatura gênica que permitirá inferir um fenótipo que possa apresentem maior risco para o desenvolvimento da obesidade entre os brasileiros.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar um painel de marcadores genéticos, originados de exoma indígena, que tenha um papel no desenvolvimento do fenótipo da obesidade em uma população miscigenada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: segundo o pesquisador responsável este trabalho não apresentará maiores riscos, uma vez que todo o material já se encontra extraído na forma de DNA (ng/ul). O caráter sigiloso desta pesquisa garante total integridade e
confiabilidade dos dados gerados.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos para os participantes da pesquisa. Porém, indiretamente a sociedade será beneficiada, uma vez que os dados gerados a partir desta pesquisa permitirão um acréscimo no conhecimento dos mecanismos genéticos da obesidade, principalmente em populações de caráter miscigenado, como é a população brasileira. O que futuramente poderá ser útil em programas de prevenção a obesidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa é relevante e pode gerar resultados importantes acerca da herança genética indígena presente na população ribeiraopretana (população triibrida) e seu impacto na obesidade em populações miscigenadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

O pesquisador responsável respondeu a todas as pendências apontadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 30 de outubro de 2017, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido , podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_950614.pdf	30/10/2017 21:51:49		Aceito
Outros	Projeto_Obesidade2.pdf	30/10/2017 21:50:54	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Outros	Carta_resposta_comite_etica.pdf	28/10/2017 08:52:14	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	27/10/2017 10:51:03	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Outros	Termo_anuencia_pesquisador.pdf	28/08/2017 08:50:39	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Outros	Dispensa_Biorepositorio.pdf	28/08/2017 08:45:13	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Outros	Errata_Carimbo_ChefeLaboratorio.pdf	16/08/2017 09:59:47	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	10/08/2017 14:22:58	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoDeDispensa.pdf	10/08/2017 14:22:30	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Orçamento	OrcamentoAprovadoDiana.pdf	10/08/2017 14:21:51	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_FINANCEIRO_DETALHADO_Diana.pdf	10/08/2017 14:21:03	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Obesidade.pdf	10/08/2017 14:20:07	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_Diana.pdf	10/08/2017 14:18:27	DIANA OLIVEIRA RIBEIRO	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Não

RIBEIRAO PRETO, 11 de Dezembro de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Anexo B – Manuscrito do trabalho que será submetido a uma revista indexada.

Three new Single Nucleotide Polymorphism associated to protection against obesity in an urban population

Ribeiro, DO[1,2]; Guerreiro, JF[3,4]; Diniz, IG[3]; Bettiol[4], H; Barbieri[4], MA; Silva Jr, WA[1,2].
1 - Department of Genetics at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. São Paulo, Brazil
2 - Regional Blood Center of Ribeirão Preto, SP
3 - Institute of Biological Center at Federal University of Pará, Belém, Brazil
4- Department of Child Care and Pediatrics, Department of Clinical Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

*Corresponding author
E-mail address: wilsonjr@usp.br

Abstract

Objective: Obesity affects big portion of global population and is the result of excessive accumulation of body fat, what can seriously affect health. However, the knowledge about polygenetic obesity in population such as Brazil's is still scarce. Therefore, in this work we selected a of set SNPs associated to obesity, which were obtained from obese Brazilians' indigenous exomes, applied them in an urban population to look for association between these SNPs and Body Mass Index. **Methods:** We carefully selected a set of 17 SNPs associated with Body Mass Index (BMI), based on exomes from obese Brazilian's and genotyped a cohort of 180 individuals (89 normal-weight and 91 obese) from Sistema Único de Saúde (SUS) of Ribeirão Preto, SP, Brazil. **Results:** The 17 SNPs selected were verified by genotyping in the indigenous and showed synonymous mutations, with rs2277552 and rs3731900 presenting pathogenicity prediction. The Principal Component Analysis (PCA) was not sensitive enough to separate obese from normal-weight. The association test used the dominant and the recessive models to all SNPs, and no correlation was observed for obese phenotype (IBM>30), independently of the model. However, rs231591 for dominant model and rs1824152 for recessive model showed significant protection values for central obesity (ratio between waist and height), with odds ratio of 0.27 ($p = 0.0013$) and 0.37 ($p = 0.0056$), respectively. When we repeated the association test and added the sex, as influential covariant within the cohort, the rs1824152, rs3732378, rs231591 and rs744224 showed significant protection values depending of the sex and model adopted. **Conclusion:** We found four SNPs (rs1824152, rs3732378, rs231591 and rs744224) associated with a protective character against obesity, from which three had never been described in the literature until now.

Keywords: Amerindians, SNP, Exome, Obesity, Urban population.

INTRODUCTION

Nowadays, obesity is the most important nutritional disorder of the world. It is the result of an excessive accumulation of body fat that leads to variation in body mass index (BMI) that can affect health("WHO | Obesity and overweight", 2017). Obesity is

frequently associated with many diseases like type 2 diabetes, hypertension, neoplasms and endocrine dysfunctions(BRESSLER et al., 2010; JANKOVIĆ et al., 2012; LEIBA et al., 2017; RE, 2009). It is known that obesity is multifactorial, where genetics and non-genetic characteristics are present, but it will be as stronger as greater it is the individual genetic predisposition(BOUCHARD et al., 1990; FRANCISCHI et al., 2000; GRUNDY, 1998; HAINER et al., 2000).

The genetic mechanisms of action that lead to obesity has been investigated by genome-wide association studies (GWAS), that allowed the identification of susceptibility *loci* for obesity in different populations(LI et al., 2010; MÄGI et al., 2013; SAJUTHI et al., 2016; SCUTERI et al., 2007; WANG et al., 2015). According to recent reviews, there are approximately 136 genes and more than 200 variants correlated with common obesity (BROWNELL; WALSH, 2018; SINGH; KUMAR; MAHALINGAM, 2017; STRYJECKI; ALYASS; MEYRE, 2018). In addition, the molecular markers called Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) have been widely used in studies of association of complex diseases, generating excellent data about obesity, specially in mixed population (COMUZZIE et al., 2012; MAO et al., 2007; NASSIR et al., 2012; PRAKASH et al., 2016; SCOTT et al., 2016; VOISIN et al., 2015; WANG et al., 2015; WU et al., 2010).

In countries with mixed population like Brazil - where the population results from recent admixture (principally of European, African and Amerindian populations)(ALVES-SILVA et al., 2000; CARVALHO-SILVA et al., 2001; PENA et al., 2000; SALZANO; SANS, 2014; TARAZONA-SANTOS et al., 2016), and where a strong obesity increse have been experienced("WHO | Obesity and overweight", 2017) - the knowledge about how genetics of obesity is acting is still poor (BRAGA, 2014; DUARTE et al., 2006; KLIMENTIDIS; MILLER; SHRIVER, 2009; MAO et al., 2007; MATTEVI et al., 2000; NASSIR et al., 2012; SALIBA et al., 2014). In the current study, we used a case-control design to identify if the 17 variants associated with BMI, identified in the exome of obese Amerindians from a Brazilian tribe, are associate with obesity in a mixed Brazilian cohort.

MATERIALS AND METHODS

Amerindians study

The Amerindians group consisted of 8 individuals. Those belong to 2 tribes located in the state of Pará: Asurini of Xingú - near Altamira's city; and Xikrin of Cateté - near Parauapebas' city. Previous nutritional anthropometric evaluation identified which Amerindians were qualified to participate in the study. The selected Amerindians presented an advanced nutritional transition process, their eating habits were very similar to people how living in urban centers, due to the frequent interaction with the urban cities located near the tribe. The Amerindians were divided based on their BMI: two Xikrins and two Asurini control (BMI ≥18.5 and < 25 Kg/m^2) and two Xikrins and two Asurini obese (BMI ≥30 and < 40 Kg/m^2) (Table 1).

Table 1 - Clinical data of the Indians containing information of sex, age, blood glucose - BG, weight, BMI and ancestry – Anc, EUR – European, AFR – African, AMR – Amerindian

Group	Tribe	Sex	Age	BG	Weight (Kg)	Height (cm)	BMI	Anc (EUR)	Anc (AFR)	Anc (AMR)
Obese	Xikrin	Female	18	76	79.7	157.0	32.33	0.052	0.045	0.903
Obese	Asurini	Male	30	66	92.4	165.5	33.73	0.121	0.01	0.869
Obese	Xikrin	Female	68	139	87.1	160.0	34.02	0.019	0.006	0.975
Obese	Asurini	Male	25	69	70.8	149.0	31.89	0.013	0.008	0.979
Control	Asurini	Male	31	76.28	60.5	163.0	22.77	0.002	0.003	0.995
Control	Asurini	Female	40	-	61.9	164.9	22.76	0.013	0.033	0.954
Control	Xikrin	Male	59	86	63.5	168.0	22.49	0.019	0.039	0.942
Control	Xikrin	Female	32	71.14	54.0	148.5	24.48	0.081	0.015	0.904

Cohort Study

We validated and analyzed the genetic variants correlated with the common obesity found in the Amerindians, in a Brazilian cohort. We used genomic DNA from 180 individuals from Unified Health System (SUS) of Ribeirão Preto/SP, previously collected by Barbieri (2006), to represent the urban population. The samples include 89 control and 91 obese individuals. None of the participants presented chronic diseases that could compromise body weight like diabetes, thyroid disorders or cancer.

Ethical Considerations

This work was subjected and approved by the Ethics Committee (CAAE 74509817.4.0000.5440).

Whole-exome sequencing of Amerindians

The genomic paired-end library was prepared from DNA (50ng/µl) that was extracted from 300 ml of blood from the Amerindian individuals using the NeoIsoColumn kit (A Lambda Inc., San Diego, CA, USA). For exome enrichment, it was used the Nextera Exome Enrichment kit (Ilumina Inc. San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

The clustering was performed using the TruSeq PE Cluster Generation Kit v5 (Illumina Inc.San Diego, CA, USA). The samples were sequenced with Ilumina Genome Analyzer IIx (GAIIx) as paired-end reads of 110 bp/read (2x55pb) (Illumina). An average depth of 100x was achieved for each sample, which is capable of identifying new low frequency variants.

We used the reads that presented Q-score greater than 30 (Phred ≥Q30). We filtered the reads and performed alignment against the human genome (GrCh37/hg19). PCR duplicates were identified and removed to call for variants and genotypes were made by the direct counting method using Samtools/BCFtools software. Only then, a set of SNPs associated with obesity was selected based on the presence of the mutation in the obese Amerindians and absence in the Amerindians controls. Validation of the exome data occurred by Real-Time PCR (qPCR) with TaqMan® system.

Genotyping of the cohort

The genotyping of all SNPs was made using the genomic DNA from Ribeirão Preto cohort, which was extracted from 500 µl of blood from each individual, using the QIAGEN FlexiGene DNA Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The genotyping was performed by Real-Time PCR (qPCR) 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), using the Taqman Universal PCR Master Mix and Taqman ™ probes (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) following the protocol of the supplier.

Each reaction had a final volume of 10 µl composed of 1X of Taqman Universal PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1X of Taqman ™ probe(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 ng of DNA and water to complete the final volume. The thermocycling program was the same for all genes, being: 1 'at 60 °C, 10' at 95 °C and 40 cycles from 15 " to 95 °C and 1 'at 60-55 °C, and 1' to 60 °C.

Statistical analyses

We used the Ensembl public database (http://www.ensembl.org/index.html) to obtain genetic diversity values from the set of SNPs selected. Structure software was used to confirm the Amerindian ancestry and to determine the ancestry of the Ribeirão Preto cohort(PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). We used the R software to make Principal Component Analysis (PCA)(R CORE TEAM, 2017). The pathogenicity of all SNPs was predicted using SIFT, PolyPhen-2, M-CAP and SNAP online platforms (ADZHUBEI et al., 2010; BROMBERG; ROST, 2007; JAGADEESH et al., 2016; KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009)

The association tests and the linkage disequilibrium analysis between SNPs were performed on the SNPstats online platform for all selected SNPs in the Ribeirão Preto cohort, adopteding BMI as the phenotypic response. The association test to obesity adopted the dominant model (DM) and recessive model (RM) to all SNPs, with distinction of obese (BMI>30) and controls (BMI ≥18.5 and < 25 Kg/m^2) in each model. Additionally, we obtained anthropometric measurements from the Ribeirão Preto cohort (waist circumference and height), which were used to classify the cohort again in a new group called central obese (ratio between waist and height - RWH). The significance values for the data obtained in this analysis were determined by p-value (≥ 0.5) and odds ratio (95% confidence interval), considering only the values that showed significance for both statistical tests (SOLE et al., 2006).

RESULTS

The exome sequencing was efficient (Phred≥ Q30), which allowed the selection of 17 SNPs (Table 2). All the SNPs showed synonymous mutations and two were predicted as pathogenic (rs3732378 and rs2277552) in all the prediction tools (Figure 1). The SNPs were validated in the Amerindians using specific probes for each region, thus confirming all mutations found by sequencing.

The Ribeirão Preto cohort was genotyped using the SNPs set selected in this work. The mutant allelic frequency of each SNP was variable when it was compared with populations' data available in the Ensembl Database. The linkage disequilibrium analysis, using the Fisher’s exact test, showed significance just for four SNPs, all found in

chromosome 19: rs1824152 and rs3745335 (CPAMD8) with p=0.03; rs2227278 (P=0.008) (ZBTB32); and rs34562867 (IGFLR1), with p=0.008. We verified the sensitivity of our markers in the Ribeirão Preto cohort by PCA, what showed that they were no capable to separate obese and control groups.

The association test to obesity phenotype, which adopted the dominant model (DM) and recessive model (RM), did not show correlation. However, when we used the central obesity as phenotype, rs231591 (for dominant model) and rs1824152 (for recessive model) showed significant values of protection against obesity (Figure 2).

Another analysis involving the SNPs and obesity as the observed phenotype (obesity and central) was performed, where we considered the sex influence for each group. For obesity phenotype (BMI) in the female group, the SNPs rs1824152 (RM), rs3732378 (DM) and rs231591 (DM) showed significant values for protection, while for the male group it was only observed for rs1824152 (DM) and rs231591 (DM and RM). When the phenotype observed was the central obesity (RWH) only the SNPs rs1824152 (RM) and rs744224 (DM) presented statistical significance for the female group, also associated with protection.

Table 3 - Set of SNPs based on Amerindians' whole-exome sequencing.

ID	Gene	Chr	NM	BM	Functional Prediction			
					SIFT	Poly Phen-2	M-CAP	SNAP
rs1824152	CPAMD8	19	His593Arg	A>G	----	----	----	----
rs3745335	CPAMD8	19	Asp586Glu	C>A	----	----	----	----
rs3732378	CX3CR1	3	Thr280Met	C>T	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
rs8133052	CBR3-AS1	3	Cys4Tyr	G>A	----	----	----	----
rs34562867	IGFLR1	19	Trp189Arg	T>C	Damaging	----	----	----
rs1702003	ACOT11	1	Gly202Asp	G>A	----	----	----	----
rs2227278	ZBTB32	19	Arg174Ser	A>C	----	----	----	----
rs2277552	NOX5	15	Arg548His	G>A	Damaging	Damaging	Damaging	Damaging
rs3731900	FAM134A	2	Pro419Gln	C>A	Damaging	----	----	----
rs2297792	UBQLN4	1	Ile475Met	C>T	----	----	----	----
rs117372288	KIR3DL3	19	Val168Ile	G>A	----	----	----	----
rs744224	IQGAP3	1	Arg663Cys	C>T	----	----	----	----
rs3743093	SPESP1	15	Gly191Glu	G>A	----	----	----	----
rs6887	CCDC159	19	Cys278Ser	G>C	----	----	----	----
rs2287345	ERLEC1	2	Val318Leu	G>C	----	----	----	----
rs1043160	CNPPD1	2	Ile262Thr	T>C	----	----	----	----
rs231591	MLL4	19	Asp2364Gly	A>G	----	----	----	----

ID – SNPs' identification; Chr - Chromosomal location; NM - Nonsynonymous Mutations; BM - Base Mutation.

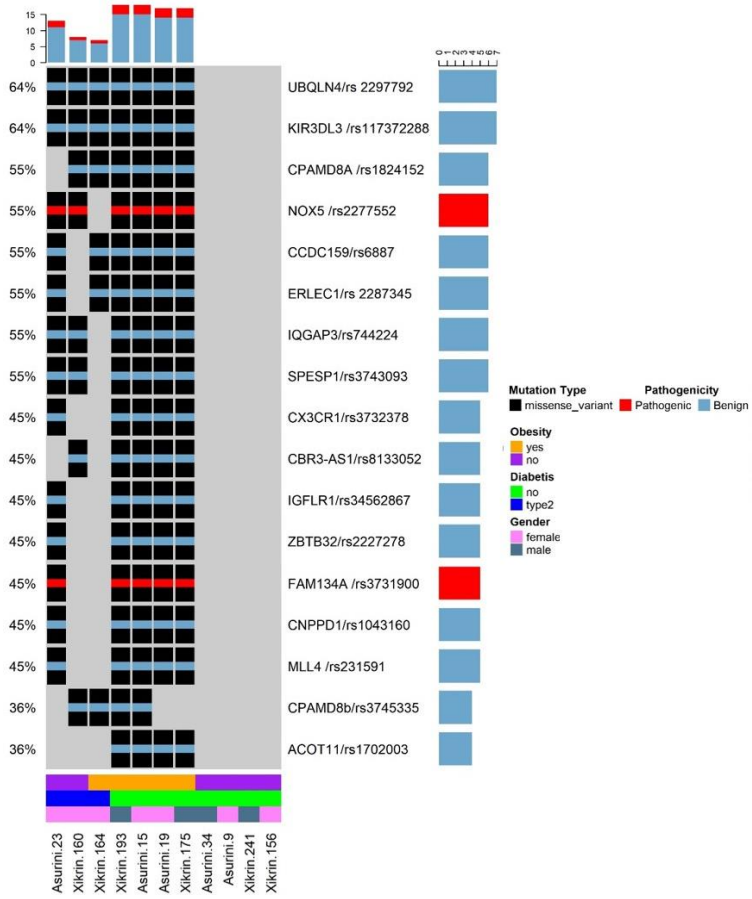

Figure 1 - Onconprint containing the clinical and mutational information of the 17 SNPs associated with obesity selected from the indigenous exome. SNPs were identified according to their respective genes; mutation type: pathogenic (red) or non-pathogenic (blue); gender: man (dark blue) and woman (pink); and classification for the phenotype: Obesity (orange), DMT2 (blue) and control (green / purple). Individuals with DMT2 and obesity/DMT2 were discarded from subsequent analyses.

DISCUSSION

We selected 17 SNPs correlated with obesity from obese Amerindians exomes, based on the presence or absence of the allelic mutation. All SNPs showed synonymous mutations, from which rs2277552 and rs3731900 presented pathogenicity prediction, what means that the change in of nitrogenous base alters the amino acid and can affect the protein function. The SNPs were validated in the Amerindians, using probes specific for each region, thus confirming all mutations found by sequencing. We searched in the literature to verify if there are information about them or even if their host genes are directly or indirectly correlated with obesity. Two of the SNPs had been described as related with obesity: rs3732378 (CX3CR1)(BRAGA, 2014; SHAH et al., 2011) and rs1702003 (ACOT11)(GREGORY et al., 2006), while rs8133052 (CBR3-AS1)(CHANG et al., 2012) is associated with DMT2. Four SNP host genes were already related to obesity (ACOT11, NOX5, SPESP1 and CX3CR1) (ADAMS et al., 2001; COMUZZIE et al., 2012; LEE et al., 2007; SIROIS-GAGNON et al., 2010), one to hypertension (NOX5) (KUNDU et al., 2013; PANDEY et al., 2012) and two to weight gain (CPAMD8 and ERLEC1) (NEBENDAHL et al., 2016; VIERA et al., 2016).

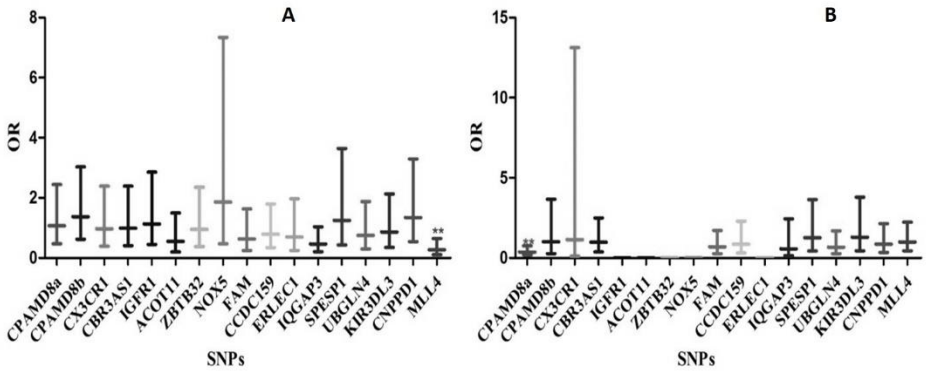

Figure 2 - Association test adopted RM and DM for obese and central obese groups using all 17 SNPs selected in this work. A - Dominant Model; B - Recessive Model; Obese - IMC; Obese2; * - P<0.05

The SNPs that showed linkage disequilibrium were rs1824152, rs3745335, rs2227278 and rs34562867. These SNPs are located in the chromosome 19 and they were not enough to segregate obese and control groups. This result was expected because rs1824152 and rs3745335 (D = 0.1662) are found in the same gene (CPAMD8), whereas the SNPs rs2227278 and rs34562867 (D = 0.1051), although located in different genes (ZBTB32 and IGFLR1, respectively) are close to each other on chromosome 19.

For PCA, the set of SNPs selected here was not enough to segregate the Ribeirão Preto cohort in obese and control groups. The literature reports that polygenic obesity may vary between individuals, due to genetic inheritance related with obesity(BELL; WALLEY; FROGUEL, 2005; BRAY; KIM; WILDING, 2017; SINGH; KUMAR; MAHALINGAM, 2017). In addition, each gene can have different contributions for the obesity phenotype(BENEDICT et al., 2014; CHUENTA et al., 2014; DASTANI et al., 2012; LOOS; JANSSENS, 2017; STENDER et al., 2017; STRAWBRIDGE et al., 2016). Thus, the non-segregation between the obese and control groups can be justified by the weak interaction that they must have.

Another type of analysis pertinent to this work is the identification of gene variants significantly different between case and control groups for a given characteristic, that allows the detection of discrete or moderate polygenic effects developed of the phenotype such as polygenic obesity (REDDON et al., 2016; STENDER et al., 2017). Thus, we performed association tests for the 17 SNPs with obesity and central obesity. Our results for obesity (increase in BMI) were not significant in the Ribeirão Preto cohort, independently of the model adopted (MD or MR). However, for central obesity (RWH), the rs231591 for the MD and rs1824152 for the MR were significant, both denoting protection for the Ribeirão Preto cohort in the presence of the mutant allele.

The rs1824152 and rs231591 showed a significant association with central obesity protection independently of sex influence. The CPAMD8 gene where rs1824152 is inserted is a member of the protease inhibitor I39 (alpha-2-macroglobulin), important in innate and acquired immunity and it is associated to pancreatic insulin secretion, increase in platelets and hyperactivity, being indicated as a biological marker for T2DM and obesity(LAMBEIR et al., 2001; LI; WU; ENGVALL, 2004; SALONEN et al., 2007). In turn, rs231591 is part of the MLL4 gene, also known as KMT2B (Lysine Methyltransferase 2B), which is expressed ubiquitously in adult tissues (LI et al., 2016; MEYER et al., 2017). In mice, it had been already associated with adipogenesis and the

PPARγ pathway, as well as transcription factors that regulate the function of pancreatic β cells, connecting them directly with DMT1 and DMT2 (LEE et al., 2008; SCOVILLE et al., 2015).

The more refined analysis also showed that rs3732378 and rs744224, in CX3CR1 and IQGAP3 genes, respectively, presented statistical significance only when the influence of sex was observed within each case-control group separately. The protective character for obesity was associated with the presence of the mutant allele rs3732378, as well as rs744224 for the central obesity. While in this study rs3732378 was associated with the protective character for obesity in females, Shah et al. (2011), studying the obesity in the Canadian population found association obesity for this SNP (SHAH et al., 2011). On the other side, Braga (2011) did not find susceptibility related to the same SNP in his obese patients. The rs744224, which was associated to central obesity protection only in females, had never been reported in the literature in a similar way until now. Because rs744224 is located in the IQGAP3 gene, which has already been implicated in mice with the proliferation of pancreatic β-cells(KLOCHENDLER et al., 2016), we believe that the association with the protective character found here may be directly linked to the gene's biological function.

CONCLUSIONS

The SNPs rs1824152, rs231591 and rs744224 until this moment have not been described in the literature in association with obesity or obesity protection. The results presented here may be justified by the biological aspects of the genes where they are located. Thus, we present here the protective character associated with four SNPs - rs1824152, rs3732378, rs231591 and rs744224 – from which three (rs1824152, rs231591 and rs744224) had not been directly related to obesity so far.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank for financial support by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

REFERENCES

ADAMS, S. H. et al. BFIT, a unique acyl-CoA thioesterase induced in thermogenic brown adipose tissue: cloning, organization of the human gene and assessment of a potential link to obesity. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 135–142, 15 nov. 2001.

ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, abr. 2010.

AL-DAGHRI, N. M. et al. Association between type 2 diabetes mellitus-related SNP variants and obesity traits in a Saudi population. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 3, p. 1731–40, mar. 2014.

ALLISON, D. B. et al. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 20, n. 6, p. 501–6, jun. 1996.

ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **American journal of human genetics**, v. 67, n. 2, p. 444–61, ago. 2000.

AUTON, A. et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 30 set. 2015.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/pt-br/publicacoes/publicacoes/2007/livros/bioestat-50/>. Acesso em: 23 ago. 2017.
AZEVEDO, M. M. Diagnóstico da população indígena no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 4, p. 19–22, 2008.
BACOPOULOU, F. et al. Waist circumference, waist-to-hip ratio and waist-to-height ratio reference percentiles for abdominal obesity among Greek adolescents. **BMC Pediatrics**, v. 15, n. 1, p. 50, 4 dez. 2015.
BARBIERI, M. A. et al. Health in early adulthood: the contribution of the 1978/79 Ribeirão Preto birth cohort. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 39, n. 8, p. 1041–55, ago. 2006.
BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 15 jan. 2005.
BAUER, K. W. et al. Cardio-metabolic risk screening among adolescents: understanding the utility of body mass index, waist circumference and waist to height ratio. **Pediatric Obesity**, v. 10, n. 5, p. 329–337, 1 out. 2015.
BELL, C. G.; WALLEY, A. J.; FROGUEL, P. The genetics of human obesity. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 3, p. 221–34, mar. 2005.
BENEDICT, C. et al. Fat mass and obesity-associated gene (FTO) is linked to higher plasma levels of the hunger hormone ghrelin and lower serum levels of the satiety hormone leptin in older adults. **Diabetes**, v. 63, n. 11, p. 3955–9, nov. 2014.
BETO, R.; FANY, R. **Povos indígenas no Brasil : 2006/2010**. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2011.
BOUCHARD, C. et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. **The New England journal of medicine**, v. 322, n. 21, p. 1477–82, 24 maio 1990.
BRAGA, A. A. **Polimorfismos dos genes CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação à obesidade**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 21 maio 2014.
BRAY, G. A.; KIM, K. K.; WILDING, J. P. H. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 7, p. 715–723, 1 jul. 2017.
BRESSLER, J. et al. Risk of Type 2 Diabetes and Obesity Is Differentially Associated with Variation in FTO in Whites and African-Americans in the ARIC Study. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10521, 20 maio 2010.
BROMBERG, Y.; ROST, B. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 11, p. 3823–35, 2007.
BROWNELL, K. D.; WALSH, B. T. **Eating disorders and obesity : a comprehensive handbook**. Third ed. [s.l.] The Guilford Press, 2018.
CALLO, G. et al. Excesso de peso/obesidade no ciclo da vida e composição corporal na idade adulta: coorte de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 1982. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 4, 2016.
CARVALHO-SILVA, D. R. et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **American journal of human genetics**, v. 68, n. 1, p. 281–6, jan. 2001.
CASTILLO-HERNANDEZ, J. et al. A obesidade é um determinante da resistência à insulina mais importante do que os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 320–329, jul. 2017.
CELIS-MORALES, C. A. et al. Dietary fat and total energy intake modifies the association of genetic profile risk score on obesity: evidence from 48 170 UK Biobank participants. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 12, p. 1761–1768, 15 dez. 2017.
CHANG, Y.-C. et al. Genetic variation in the carbonyl reductase 3 gene confers risk of type 2 diabetes and insulin resistance: a potential regulator of adipogenesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 7, p. 847–858, 15 jul. 2012.
CHIARA, V. L. et al. Correlação e concordância entre indicadores de obesidade central e índice de massa corporal em adolescentes. **Rev Bras Epidemiol**, v. 12, n. 3, p. 368–77, 2009.

CHO, Y. S. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. **Nature genetics**, v. 44, n. 1, p. 67–72, jan. 2012.
CHOQUET, H.; MEYRE, D. Genetics of Obesity: What have we Learned? **Current genomics**, v. 12, n. 3, p. 169–79, maio 2011.
CHUENTA, W. et al. Common variations in the FTO gene and obesity in Thais: A family-based study. **Gene**, v. 558, n. 1, p. 75–81, 24 dez. 2014.
CHUNG, W. K. et al. Analysis of 30 Genes (355 SNPS) Related to Energy Homeostasis for Association with Adiposity in European-American and Yup'ik Eskimo Populations. **Human Heredity**, v. 67, n. 3, p. 193–205, jan. 2009.
CLÉMENT, K. Genetics of human obesity. **Comptes rendus biologies**, v. 329, n. 8, p. 608-22–5, ago. 2006.
COMUZZIE, A. G. et al. Novel genetic loci identified for the pathophysiology of childhood obesity in the Hispanic population. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51954, 14 dez. 2012.
CORRÊA, M. M. et al. Razão cintura-estatura como marcador antropométrico de excesso de peso em idosos brasileiros. **Reports in public health**, v. 33, n. 5, p. 1–14, 2017.
DALGAARD, K. et al. Trim28 Haploinsufficiency Triggers Bi-stable Epigenetic Obesity. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 353–364, 28 jan. 2016.
DASTANI, Z. et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. **PLoS genetics**, v. 8, n. 3, p. e1002607, 2012.
DEL BOSQUE-PLATA, L. et al. Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population. **Molecular genetics and metabolism**, v. 81, n. 2, p. 122–6, fev. 2004.
DUARTE, S. F. P. et al. p.Q223R leptin receptor polymorphism associated with obesity in Brazilian multiethnic subjects. **American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council**, v. 18, n. 4, p. 448–53, 2006.
DUBERN, B. et al. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and α-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. **The Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 2, p. 204–209, ago. 2001.
DUBERN, B. et al. Mutational analysis of the pro-opiomelanocortin gene in French obese children led to the identification of a novel deleterious heterozygous mutation located in the alpha-melanocyte stimulating hormone domain. **Pediatric research**, v. 63, n. 2, p. 211–6, fev. 2008.
DURBIN, R. M. et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061–1073, 28 out. 2010.
FADASON, T. et al. Physical Interactions and Expression Quantitative Traits Loci Identify Regulatory Connections for Obesity and Type 2 Diabetes Associated SNPs. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 150, 13 out. 2017.
FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Monogenic human obesity syndromes. **Recent progress in hormone research**, v. 59, p. 409–24, jan. 2004.
FLACHSBART, F. et al. Investigation of genetic susceptibility factors for human longevity – A targeted nonsynonymous SNP study. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 694, n. 1, p. 13–19, 2010.
FONT-CLOS, F.; ZAPPERI, S.; LA PORTA, C. A. M. Gene expression signature of obesity in monozygotic twins. **Physiological Measurement**, v. 39, n. 4, p. 44008, 26 abr. 2018.
FRANCISCHI, R. P. P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 1, p. 17–28, abr. 2000.
FROGUEL, P. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 398–401, 26 mar. 1998.
FUTUYMA, D. **Biologia Evolutiva**. 3ª ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2009.
GRAFF, M. et al. PNPLA3 gene-by-visceral adipose tissue volume interaction and the pathogenesis of fatty liver disease: the NHLBI family heart study. **International journal of obesity (2005)**, v. 37, n. 3, p. 432–8, mar. 2013.
GREGORY, S. G. et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 315–321, 18 maio 2006.
GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3 Suppl, p. 563S–72S, mar. 1998.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. **Plant molecular biology**, v. 57, n. 4, p. 461–85, mar. 2005.
HAINER, V. et al. Intrapair resemblance in very low calorie diet-induced weight loss in female obese identical twins. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. 8, p. 1051–1057, 6 set. 2000.
HARDY, J.; SINGLETON, A. Genomewide Association Studies and Human Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 17, p. 1759–1768, 23 abr. 2009.
HARDY, L. L. et al. 30-year trends in overweight, obesity and waist-to-height ratio by socioeconomic status in Australian children, 1985 to 2015. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 1, p. 76–82, 16 jan. 2017.
HAUN, R.; JOSÉ GONDIM PITANGA, F.; LESSA, I. Razão Cintura/estatura Comparado a outros indicadores antropométricos de obesidade como preditor de risco coronário elevado. **Artigo Original Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 6, p. 705–11, 2009.
HERRERA, B. M.; KEILDSON, S.; LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas**, v. 69, n. 1, p. 41–9, maio 2011.
HESTER, J. M. et al. Implication of European-derived adiposity loci in African Americans. **International journal of obesity (2005)**, v. 36, n. 3, p. 465–73, 12 mar. 2012.
HINDORFF, L. A. et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 23, p. 9362–7, 9 jun. 2009.
HONG, S. et al. Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: role of beta adrenergic receptors. **Brain, behavior, and immunity**, v. 39, p. 113–20, jul. 2014.
HORIKOSHI, M. et al. Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 248–252, 28 set. 2016.
ICHIHARA, S.; YAMADA, Y. Genetic factors for human obesity. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 7–8, p. 1086–98, abr. 2008.
IMAI, T. et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 521–30, 14 nov. 1997.
INTERNATIONAL CONSORTIUM FOR BLOOD PRESSURE GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES, G. B. et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 103–9, 11 set. 2011.
JAGADEESH, K. A. et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. **Nature Genetics**, v. 48, n. 12, p. 1581–1586, 24 out. 2016.
JANKOVIĆ, D. et al. Prevalence of Endocrine Disorders in Morbidly Obese Patients and the Effects of Bariatric Surgery on Endocrine and Metabolic Parameters. **Obesity Surgery**, v. 22, n. 1, p. 62–69, 4 jan. 2012.
JOKINEN, E. Obesity and cardiovascular disease. **Minerva pediatrica**, v. 67, n. 1, p. 25–32, fev. 2015.
KAMEL, K. A.; KROC, M.; ŚWIĘCICKI, W. Application of the High Resolution Melting analysis for genetic mapping of Sequence Tagged Site markers in narrow-leafed lupin (Lupinus angustifolius L.). **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, p. 533–540, 28 jul. 2015.
KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 15 jun. 2012.
KELISHADI, R. et al. Association of eating frequency with anthropometric indices and blood pressure in children and adolescents: the CASPIAN-IV Study. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 2, p. 156–167, 1 mar. 2016.
KLIMENTIDIS, Y. C.; MILLER, G. F.; SHRIVER, M. D. The relationship between European genetic admixture and body composition among Hispanics and Native Americans. **American Journal of Human Biology**, v. 21, n. 3, p. 377–382, 1 maio 2009.
KLOCHENDLER, A. et al. The Genetic Program of Pancreatic β-Cell Replication In Vivo. **Diabetes**, v. 65, n. 7, p. 2081–93, 1 jul. 2016.
KNOWLER, W. C. et al. Obesity in the Pima Indians: its magnitude and relationship with diabetes. **The American journal of clinical nutrition**, v. 53, n. 6 Suppl, p. 1543S–1551S, jun. 1991.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635–43, 6 abr. 2000.
KRUDE, H. et al. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature genetics**, v. 19, n. 2, p. 155–7, 1 jun. 1998.
KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073–81, jan. 2009.
KUNDU, A. et al. Analysis of non-synonymous single-nucleotide polymorphisms and population variability of PLD2 gene associated with hypertension. **International Journal of Bioinformatics Research and Applications**, v. 9, n. 3, p. 227, 2013.
KWOK, P.-Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? **Molecular Medicine Today**, v. 5, n. 12, p. 538–543, dez. 1999.
LAMBEIR, A.-M. et al. Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. **FEBS Letters**, v. 507, n. 3, p. 327–330, 2 nov. 2001.
LEBOUTE, A. P. M.; SIMÕES, A. L. **Polimorfismos genéticos em três amostras da população urbana brasileira**. [s.l: s.n.].
LEE, J. et al. Targeted inactivation of MLL3 histone H3–Lys-4 methyltransferase activity in the mouse reveals vital roles for MLL3 in adipogenesis. **PNAS**, v. 105, n. 49, p. 19229 –19234, 2008.
LEE, N. et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456–469, 10 ago. 2007.
LEIBA, A. et al. Obesity and related risk of myeloproliferative neoplasms among Israeli adolescents. **Obesity**, v. 25, n. 7, p. 1187–1190, 1 jul. 2017.
LEÓN-MIMILA, P. et al. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in mexican children and adults. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70640, jan. 2013.
LI, H. et al. Variants in the Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene Are Not Associated With Obesity in a Chinese Han Population. **Diabetes**, v. 57, n. 1, p. 264–268, 1 jan. 2008.
LI, P. et al. Genetic association analysis of 30 genes related to obesity in a European American population. **International journal of obesity (2005)**, v. 38, n. 5, p. 724–9, maio 2014.
LI, S. et al. Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 1, p. 184–90, 1 jan. 2010.
LI, Y. et al. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. **Nature**, v. 530, n. 7591, p. 447–52, 25 fev. 2016.
LI, Z.-F.; WU, X.; ENGVALL, E. Identification and characterization of CPAMD8, a novel member of the complement 3/α2-macroglobulin family with a C-terminal Kazal domain. **Genomics**, v. 83, n. 6, p. 1083–1093, 1 jun. 2004.
LOCKE, A. E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 197–206, 12 fev. 2015.
LOOS, R. J. F. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 26, n. 2, p. 211–26, 4 abr. 2012.
LOOS, R. J. F.; JANSSENS, A. C. J. W. Predicting Polygenic Obesity Using Genetic Information. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 535–543, 7 mar. 2017.
MA, L. et al. Melanocortin 4 receptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians. **Diabetes**, v. 53, n. 10, p. 2696–9, out. 2004.
MÄGI, R. et al. Contribution of 32 GWAS-identified common variants to severe obesity in European adults referred for bariatric surgery. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70735, 2013.
MALTA, D. C. et al. Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. suppl 1, p. 267–276, 2014.
MAMMES, O. et al. LEPR gene polymorphisms: associations with overweight, fat mass and response to diet in women. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n. 5, p. 398–404, 1 maio 2001.
MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 747–753, 8 out. 2009.

MAO, X. et al. REPORT A Genomewide Admixture Mapping Panel for Hispanic/Latino Populations. **The American Journal of Human Genetics Am. J. Hum. Genet**, v. 8080, p. 1171–1178, 2007.
MARTI, A. et al. Association between leptin receptor (LEPR) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants and obesity: a case-control study. **Nutritional neuroscience**, v. 12, n. 4, p. 183–8, 2 ago. 2009.
MASSARO, J. D. **Dinâmica de polimorfismos genéticos ligados ao gene da hemofilia A (F8) na população brasileira**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.
MATTEVI, V. S. et al. Association of the low-density lipoprotein receptor gene with obesity in Native American populations. **Human genetics**, v. 106, n. 5, p. 546–52, maio 2000.
MCDERMOTT, D. H. et al. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 8, p. 1241–1250, 15 abr. 2003.
MCKEIGUE, P. M. et al. Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach : application to African-American populations. **Ann. Hum. Genet**, v. 64, p. 171–186, 2000.
MEYER, E. et al. Mutations in the histone methyltransferase gene KMT2B cause complex early-onset dystonia. **Nature Genetics**, v. 49, n. 2, p. 223–237, 19 fev. 2017.
MILLS, R. E. et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. **Nature**, v. 470, n. 7332, p. 59–65, 3 fev. 2011.
MIRAGLIA DEL GIUDICE, E. et al. Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Italian obese children: report of three new mutations. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 25, n. 1, p. 61–7, jan. 2001.
MONTEIRO, C. A. et al. Shifting obesity trends in Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 4, p. 342–346, 1 abr. 2000.
MUEHLSCHLEGEL, J. D. et al. Polymorphism in the protease-activated receptor-4 gene region associates with platelet activation and perioperative myocardial injury. **American journal of hematology**, v. 87, n. 2, p. 161–6, fev. 2012.
MULLANEY, J. M. et al. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R2, p. R131–R136, 15 out. 2010.
MUNIANDY, M. et al. Gene expression profile of subcutaneous adipose tissue in BMI-discordant monozygotic twin pairs unravels molecular and clinical changes associated with sub-types of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 8, p. 1176–1184, 23 ago. 2017.
NASSIR, R. et al. Relationship between adiposity and admixture in African-American and Hispanic-American women. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 2, p. 304–313, 12 fev. 2012.
NAWARYCZ, T. et al. Waist-to-height ratio as a measure of abdominal obesity in southern Chinese and European children and adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 7, p. 1109–1118, 27 jul. 2016.
NEBENDAHL, C. et al. Early postnatal feed restriction reduces liver connective tissue levels and affects H3K9 acetylation state of regulated genes associated with protein metabolism in low birth weight pigs. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 29, p. 41–55, mar. 2016.
NICOLETTI, C. F. et al. UCP1 -3826 A>G polymorphism affects weight, fat mass, and risk of type 2 diabetes mellitus in grade III obese patients. **Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 83–87, 2016.
NICOLETTI, C. F. et al. The Ala55Val and -866G>A polymorphisms of the UCP2 gene could be biomarkers for weight loss in patients who had Roux-en-Y gastric bypass. **Nutrition**, v. 33, p. 326–330, 2017.
OECD| OBESITY UPDATE. Did you know? 2017.
OLIVEIRA, B. Análise da expressão de genes relacionados ao gasto energético de indivíduos obesos grau III antes e após cirurgia bariátrica. 2013.
OLIVEIRA, B. et al. UCP2 and PLIN1 Expression Affects the Resting Metabolic Rate and Weight Loss on Obese Patients. **Obesity Surgery**, v. 27, n. 2, p. 343–348, 4 fev. 2017.
OLIVEIRA, G. et al. Prevalence of Obesity and Overweight in an Indigenous Population in Central Brazil: A Population-Based Cross-Sectional Study. **Obesity facts**, v. 8, n. 5, p. 302–10,

2015.
PANDEY, D. et al. Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 302, n. 10, p. H1919-28, 15 maio 2012.
PENA, S. D. . et al. Retrato molecular do Brasil. **Ciências Hoje**, v. 27, n. 159, p. 16–25, 2000.
PENA, S. D. J. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 870–876, out. 2009.
PEREIRA, P. F. et al. Circunferência da cintura e relação cintura/estatura: úteis para identificar riscos metabólicos em adolescente do sexo feminino? **Rev Paul Pediatr**, v. 29, n. 3, p. 372–7, 2011.
PRAKASH, J. et al. Association of FTO rs9939609 SNP with Obesity and Obesity- Associated Phenotypes in a North Indian Population. **Oman medical journal**, v. 31, n. 2, p. 99–106, mar. 2016.
PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.
R CORE TEAM. **R: The R Project for Statistical Computing**. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 23 ago. 2017.
RAFAEL, J.; SANTOS, D. Imigração e Ascenção Social em Ribeirão Preto entre o final do século XIX e meados do XX. 2006.
RAVUSSIN, E.; BOUCHARD, C. Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 410, n. 2–3, p. 131–145, dez. 2000.
RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248–249, 1 maio 1995.
RE, R. N. Obesity-related hypertension. **The Ochsner journal**, v. 9, n. 3, p. 133–6, 2009.
REDDON, H. et al. Physical activity and genetic predisposition to obesity in a multiethnic longitudinal study. **Scientific reports**, v. 6, p. 18672, jan. 2016.
REINEHR, T. et al. Lifestyle Intervention in Obese Children With Variations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. **Obesity**, v. 17, n. 2, p. 382–389, 1 fev. 2009.
RESQUE, R. et al. Male Lineages in Brazil: Intercontinental Admixture and Stratification of the European Background. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0152573, 5 abr. 2016.
RESQUE, R. L. et al. Estimates of interethnic admixture in the Brazilian population using a panel of 24 X-linked insertion/deletion markers. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 6, p. 849–852, 1 nov. 2010.
RIBEIRO, D. **O Povo Brasileiro: A Formação e o sentido do Brasil**. Disponível em: <http://www.usp.br/cje/anexos/pierre/ribeiro_darcy_povo_brasileiro_formacao_e_o_sentido_do_brasil.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016.
ROMAN, D. L. et al. Leptin Receptor Lys656Asn Polymorphism Is Associated with Decreased Leptin Response and Weight Loss Secondary to a Lifestyle Modification in Obese Patients. **Archives of Medical Research**, v. 37, n. 7, p. 854–859, out. 2006.
SAJUTHI, S. P. et al. Mapping adipose and muscle tissue expression quantitative trait loci in African Americans to identify genes for type 2 diabetes and obesity. **Human genetics**, 19 maio 2016.
SALIBA, L. F. et al. Obesity-related gene ADRB2, ADRB3 and GHRL polymorphisms and the response to a weight loss diet intervention in adult women. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, 2014.
SALONEN, J. T. et al. **Novel genes and markers in type 2 diabetes and obesity**, 9 maio 2007. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/WO2007128884A1/en>. Acesso em: 3 maio. 2018
SALZANO, F. M. **Genômica e evolução: moléculas, organismos e sociedades - Francisco M. Salzano - Google Livros**. São Paulo: Oficina de Textos, 2012.
SALZANO, F. M.; HUTZ, M. H. Genética, genômica e populações nativas brasileiras: história e biomedicina. **Revista de Estudos e Pesquisas (FUNAI)**, v. 2, n. 1, p. 175–197, 2005.
SALZANO, F.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 suppl 1, p. 151–170, 2014.
SANTOS, N. P. C. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure

using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human Mutation**, v. 31, n. 2, p. 184–190, fev. 2010.
SCHEID, J. L. et al. FTO polymorphisms moderate the association of food reinforcement with energy intake. **Physiology & behavior**, v. 132, p. 51–6, 10 jun. 2014.
SCOTT, W. R. et al. Investigation of Genetic Variation Underlying Central Obesity amongst South Asians. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155478, jan. 2016.
SCOVILLE, D. W. et al. MLL3 and MLL4 Methyltransferases Bind to the MAFA and MAFB Transcription Factors to Regulate Islet β-Cell Function. **Diabetes**, v. 64, n. 11, p. 3772–83, nov. 2015.
SCUTERI, A. et al. Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 7, p. e115, 2007.
SHAH, R. et al. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1512–8, maio 2011.
SHAWKY, R. M.; SADIK, D. I. Genetics of obesity. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 13, n. 1, p. 11–17, fev. 2012.
SHEN, Y. et al. Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 2, p. 464–72, 9 jan. 2013.
SHUNGIN, D. et al. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 187–196, 11 fev. 2015.
SINGH, R. K.; KUMAR, P.; MAHALINGAM, K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 2, p. 87–108, fev. 2017.
SIROIS-GAGNON, D. et al. Association of Common Polymorphisms in the Fractalkine Receptor (CX3CR1) With Obesity. **Obesity**, v. 19, n. 1, p. 222–227, 3 jun. 2010.
SLATKIN, M. Linkage disequilibrium in growing and stable populations. **Genetics**, v. 137, n. 1, p. 331–6, maio 1994.
SOLE, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v. 22, n. 15, p. 1928–1929, 1 ago. 2006.
SPELIOTES, E. K. et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. **Nature genetics**, v. 42, n. 11, p. 937–48, nov. 2010.
SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the Regulation of Energy Balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531–543, fev. 2001.
STENDER, S. et al. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. **Nature genetics**, v. 49, n. 6, p. 842–847, 24 jun. 2017.
STRAWBRIDGE, R. J. et al. Effects of Genetic Loci Associated with Central Obesity on Adipocyte Lipolysis. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153990, jan. 2016.
STRYJECKI, C.; ALYASS, A.; MEYRE, D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 1, p. 62–80, 1 jan. 2018.
STUNKARD, A. J.; FOCH, T. T.; HRUBEC, Z. A Twin Study of Human Obesity. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 1, p. 51, 4 jul. 1986.
TARAZONA-SANTOS, E. et al. BRASIL E A IDIOSSINCRASIA DA MISCIGENAÇÃO. **Revista da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 22, n. 1.2, 9 set. 2016.
TEMPLETON, A. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva - Loja e Livraria da Editora Cubo**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética - SBG, 2011.
TIMOFEEVA, A. V. et al. Altered Gene Expression Pattern in Peripheral Blood Leukocytes from Patients with Arterial Hypertension. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1091, n. 1, p. 319–335, dez. 2006.
TRAURIG, M. T. et al. Evidence for a role of LPGAT1 in influencing BMI and percent body fat in Native Americans. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 21, n. 1, p. 193–202, jan. 2013.
TREMBLAY, K. et al. Association study between the CX3CR1 gene and asthma. **Genes and Immunity**, v. 7, n. 8, p. 632–639, 2 dez. 2006.
TSUI, L. et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. **Science**, v. 230, n. 4729, p. 1054–1057, 29 nov. 1985.
VAISSE, C. et al. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant formof obesity. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 113–114, 1 out. 1998.

VARELLA, C. A. A. PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CPGA-CS Análise de Componentes Principais Conteúdo. 2008.
VIERA, J. et al. Phospholipases D1 and D2 Suppress Appetite and Protect against Overweight. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157607, 14 jun. 2016.
VOGAN, K. RPGRIP1L, FTO and obesity. **Nature Genetics**, v. 46, n. 6, p. 532–532, 28 maio 2014.
VOISIN, S. et al. Many obesity-associated SNPs strongly associate with DNA methylation changes at proximal promoters and enhancers. **Genome medicine**, v. 7, n. 1, 2015.
VOLIN, M. V. et al. Fractalkine: A Novel Angiogenic Chemokine in Rheumatoid Arthritis. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 4, p. 1521–1530, out. 2001.
WANG, G.; SPEAKMAN, J. R. Analysis of Positive Selection at Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Body Mass Index Does Not Support the ???Thrifty Gene??? Hypothesis. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 4, 2016.
WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 16, p. e164, set. 2010.
WANG, L. et al. Mixture SNPs effect on phenotype in genome-wide association studies. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 3, 3 fev. 2015.
WHEELER, E. et al. Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity. **Nature genetics**, v. 45, n. 5, p. 513–7, maio 2013.
WHO | Obesity: preventing and managing the global epidemic. **WHO**, 2015.
WHO | Obesity and overweight. **WHO**, 2017.
WU, L. et al. Associations of six single nucleotide polymorphisms in obesity-related genes with BMI and risk of obesity in Chinese children. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3085–9, 1 dez. 2010.
XIA, Q.; GRANT, S. F. A. The genetics of human obesity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, p. 178–90, abr. 2013.
YANG, J. et al. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. **American journal of human genetics**, v. 88, n. 1, p. 76–82, 7 jan. 2011.
YEO, G. S. H. et al. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inheritedhuman obesity. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 111–112, 1 out. 1998.
ZAMBRANO, A. K. et al. Ancestry characterization of Ecuador's Highland mestizo population using autosomal AIM-INDELs. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 0, n. 0, set. 2017.
ZAPATA, C.; VISEDO, G. Gametic disequilibrium and physical distance. **American journal of human genetics**, v. 57, n. 1, p. 190–3, jul. 1995.
ZURBANO, R. et al. Influence of the -866G/A polymorphism of the UCP2 gene on an obese pediatric population. **Nutricion hospitalaria**, v. 21, n. 1, p. 52–6, 2006.