

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Natália Luiza Kops

Polimorfismo Ala54Thr do gene *Fatty Acid Binding Protein-2*: perfil  
lipídico de obesos graves controlado pelo consumo alimentar

Porto Alegre, 2013.

Natália Luiza Kops

“Polimorfismo Ala54Thr do gene *Fatty Acid Binding Protein-2*: perfil lipídico de obesos graves controlado pelo consumo alimentar”

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Friedman

Co-orientadora: Prof. Dra. Gabriela Corrêa Souza

Porto Alegre, 2013.

Natália Luiza Kops

Polimorfismo Ala54Thr do gene *Fatty Acid Binding Protein-2*: perfil lipídico de obesos graves controlado pelo consumo alimentar

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Friedman

Co-orientador: Prof. Dra. Gabriela Corrêa Souza

Porto Alegre, 2013.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o trabalho de conclusão de curso **“Polimorfismo Ala54Thr do gene *Fatty Acid Binding Protein-2*: perfil lipídico de obesos graves controlado pelo consumo alimentar”**, elaborado por Natália Luiza Kops, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dra. Valesca Dall’Alba (UFRGS)

---

Prof. Dra. Mirela Jobim de Azevedo (UFRGS)

---

Prof. Dra. Gabriela Correa de Souza (Co-orientadora - UFRGS)

---

Prof. Dr. Rogério Friedman (Orientador - UFRGS)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar meu amor e gratidão à minha família, aos meus pais, pelo colo, admiração e carinho sempre presentes, mesmo alguns quilômetros distante. Ao meu irmão pela companhia diária, pela sintonia e silêncio.

Quero também registrar meus agradecimentos especiais para o Prof. Dr. Rogério Friedman, por me dar a oportunidade de aprender, por ter dividido sua sabedoria e conhecimento. Ao nosso grupo de pesquisa, Mariana, Natasha, Vanessa, Ylana, Letícia e, especialmente à Nut. Jaqueline Driemeyer Horvath pela dedicação, paciência e ensino ao longo destes últimos anos. Agradeço também a Nut. Prof. Gabriela Souza pela leitura crítica, análise do trabalho e apoio constante.

Aos amigos “das antigas”, de Santa Cruz, por toda a trajetória, risadas e indiadas. Às amigas da faculdade por tornarem os dias sempre mais divertidos.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi fundamental o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA). Este estudo também recebeu bolsas de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**“Quem quer tenha sido o pai da doença, a mãe foi  
uma dieta deficiente” – Provérbio Chinês**

## RESUMO

Estima-se que os fatores genéticos possam responder por 40 a 60% da variância no índice de massa corporal (IMC). Não somente fatores genéticos, mas também os ambientais, emocionais e o estilo de vida justificam o ganho de peso. As *Fatty Acid Binding Protein 2* (FABP-2) formam uma família de proteínas ligantes aos ácidos graxos (AG) e possuem papel importante no transporte e distribuição intracelular dos AG, especialmente de cadeia longa. O foco deste trabalho foi o polimorfismo Ala54Thr do gene FABP-2. Este gene codifica uma proteína expressa somente nos enterócitos e limitada ao intestino delgado, especialmente na porção proximal. O polimorfismo, resultante de uma substituição de alanina (Ala) por treonina (Thr) no códon 54 vem sendo associado com o IMC, resistência insulínica, síndrome metabólica e obesidade. A presença de somente um alelo Thr54 parece ser suficiente para apresentar algum efeito quando comparado aos homozigotos Ala54; contudo, homozigotos Thr54 parecem sofrer um efeito ainda maior. Em 1995 descobriu-se que o alelo mutante Thr54 tinha afinidade duas vezes maior para o ácido graxo de cadeia longa do que o genótipo selvagem (Ala54Ala). Logo, a hipótese era a de que o alelo Thr54 aumentasse a absorção de AG dietéticos pelo intestino, a concentração lipídica plasmática e, assim, aumentasse oxidação de gordura. Acredita-se que os indivíduos portadores do alelo Thr54 tenham uma suscetibilidade aumentada aos efeitos das gorduras da dieta, o que por sua vez, aumenta a frequência das complicações da obesidade. Diversos estudos associaram o alelo Thr54 com níveis séricos de lipídios; no entanto, estes achados não foram controlados pelo consumo alimentar dos indivíduos, o qual poderia ser responsável por esta diferença. Estudos de intervenção também já mostraram uma diferente resposta à gordura dietética nos portadores do polimorfismo Ala54Thr. Considerando as inconclusivas relações entre o polimorfismo Ala54Thr do gene FABP-2, o presente estudo busca avaliar a influencia do alelo Thr54 em indivíduos obesos graves candidatos à cirurgia bariátrica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Palavras-chave:** Obesidade mórbida. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. FABP2

## LISTA DE ABREVIACÕES

AG – Ácidos graxos

AGCL – Ácido graxo de cadeia longa

ALA54 – Alelo alanina no códon 54

ALA54THR – Polimorfismo Ala54Thr (substituição do aminoácido Ala54 por Thr54)

APO B – Apolipoproteína B

CT – Colesterol total

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

FABP – Proteína ligadora de ácidos graxos - *Fatty Acid Binding Protein*

FABP-2 – Proteína intestinal ligadora de ácidos graxos - *Intestinal Fatty Acid Binding Protein*

HDL-c – Lipoproteína de Alta Densidade - *High Density Lipoproteins cholesterol*

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

LDL-c – Lipoproteína de baixa densidade – *Low Density Lipoproteins cholesterol*

PCR – Proteína C Reativa

RCQ – Razão Cintura-Quadril

RI – Resistência à insulina

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único - *Single Nucleotide Polymorphism*

THR54 – Alelo treonina no Códon 54

TG – Triglicerídeos

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **Figura Referencial Teórico**

Figura 1 - Estão representados os papéis das FABP (*Fatty Acid Binding Protein*) como transportadoras de ácidos graxos e gerenciadoras da distribuição destes ácidos entre as organelas ..... 13

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

Tabela 1. Características antropométricas dos pacientes de acordo com o polimorfismo no códon 54 do gene FABP-.....	40
Tabela 2. Análise da média do Registro Alimentar de 3 dias dos pacientes de acordo com o polimorfismo no códon 54 do gene FABP-2.....	41
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos dos pacientes de acordo com o polimorfismo no códon 54 do gene FABP-2.....	42



## SUMÁRIO

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
1.1 GENÉTICA DA OBESIDADE.....	10
1.2 POLIMORFISMO ALA54THR DO GENE FABP-2.....	11
1.2.1 Associação do polimorfismo com Parâmetros Antropométricos.....	15
1.2.2 Associação do polimorfismo com Perfil Lipídico.....	15
1.2.3 Associação do polimorfismo com Adipocitocinas Circulatórias.....	16
1.2.4 Intervenção dietética e o polimorfismo Ala54Thr.....	17
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>21</b>
<b>4 ARTIGO ORIGINAL:.....</b>	<b>25</b>
4.1 PERIÓDICO DE ESCOLHA.....	26
<b>ANEXOS.....</b>	<b>43</b>
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	44
Anexo B – Ficha de 1ª Consulta.....	46
Anexo C – Registro Alimentar.....	47
Anexo D – Questionário Internacional de Atividade Física.....	48
Anexo E – Normas da Revista European Journal of Nutrition.....	49

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 GENÉTICA DA OBESIDADE

A espécie humana se modificou ao longo da história por meio de transformações lentas e progressivas, num processo de permanente adaptação às circunstâncias do meio externo. Ao longo de sua evolução foi necessário que o homem se adaptasse às carências nutricionais, infecções e traumas, acumulando mutações “favoráveis” que culminaram em "genótipo poupador". O progresso ininterrupto, porém, modificou o ambiente e a vida atual é de abundância. Neste cenário, o genoma selecionado na escassez se tornou “desfavorável” (CHAKRAVARTHY; BOOTH, 2004).

A oferta ilimitada de alimentos baratos, palatáveis, práticos e calóricos, aliada ao crescente sedentarismo, forma um ambiente obesogênico, determinante do crescimento da prevalência da obesidade. A Organização Mundial da Saúde reporta que, pelo menos, um bilhão de adultos está acima do peso e 300 milhões são obesos (WHO, 2010). Nos Estados Unidos, a obesidade, clinicamente definida pelo Índice de Massa Corporal (IMC) maior ou igual a 30kg/m<sup>2</sup>, é prevalente em mais de 30% da população adulta (FLEGAL et al., 2012). No Brasil, segundo levantamento realizado pelo VIGITEL, em 2006, 47,2% dos homens e 38,5% das mulheres estavam acima do peso ideal. Em 2011, as proporções subiram para 52,6% e 44,7%, respectivamente (BRASIL, 2012). A prevalência de obesos graves (IMC<sub>≥</sub>40 kg/m<sup>2</sup>) no Brasil aumentou 225% entre 1974 e 2003 e esses números deverão aumentar ainda mais no futuro, se não houver uma intervenção (SANTOS et al., 2010).

A obesidade é uma doença de etiologia complexa e multifatorial, resultante de uma disfunção crônica do balanço energético. O equilíbrio entre o consumo alimentar e o gasto energético determina, inicialmente, a quantidade de energia estocada no corpo. Em geral, o tamanho dos adipócitos aumenta juntamente com o nível de adiposidade, mas atinge um patamar em indivíduos massivamente obesos. Quando os adipócitos atingem o tamanho máximo, a célula se divide gerando novos adipócitos. Células gorduras, uma vez presentes, não são perdidas. Dessa forma, um indivíduo obeso, com número aumentado de adipócitos, terá de reduzir o tamanho dessas células a fim de normalizar seus estoques de gordura. Isso

explica, em parte, a dificuldade na manutenção do peso, uma vez reduzido (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013). A obesidade pode ser definida, assim, como um estado do aumento da porcentagem de gordura corporal, de magnitude suficiente para produzir consequências adversas à saúde, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença cardíaca, apnéia do sono, hipertensão, asma, problemas articulares e infertilidade (SPIEGELMAN et al., 2001).

Além de fatores ambientais, emocionais e do estilo de vida, fatores genéticos podem desempenhar um papel expressivo no desequilíbrio energético. Estudos mostram claramente a importância e envolvimento do componente genético no desenvolvimento da obesidade. Em relação ao IMC, uma meta-análise encontrou herdabilidade de 40 a 60% (KATZMARZYK et al., 2000). No entanto, a epidemia da obesidade tem se desenvolvido somente nas últimas décadas, não podendo, assim, ser explicada somente por modificações no genoma humano. O rápido ganho de peso de uma população é, provavelmente, melhor explicado por alterações ambientais que promovem o aumento do consumo e uma redução do gasto energético. De qualquer forma, há diferenças interindividuais mediadas pelo componente genético, o que explica por que indivíduos respondem diferentemente a alterações do balanço energético (LOOS; RANKINEN, 2005).

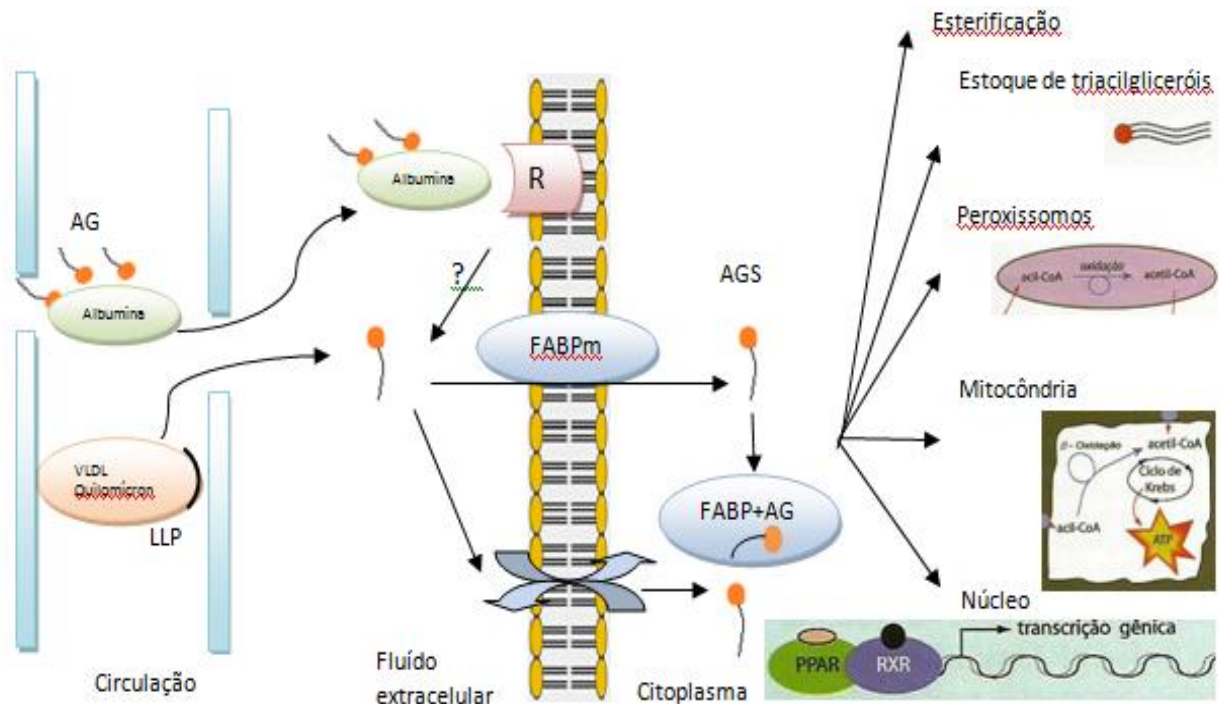
A busca de variantes genéticas que contribuem para a predisposição à obesidade iniciou em meados da década de 1990. Centenas de genes foram propostos como candidatos, atuando na regulação do peso corporal; entretanto, apenas uma minoria tem mostrado associação com susceptibilidade à obesidade (RANKINEN et al., 2006; LOOS, 2012). Entre eles, um polimorfismo do gene *Fatty Acid Binding Protein 2* (FABP-2) vem sendo associado com o IMC e o risco de obesidade (BAIER et al., 1995; HEGELE et al., 1996; NAKANISHI et al., 2004).

## 1.2 POLIMORFISMO ALA54THR DO GENE FABP-2

As FABP formam uma família de proteínas ligantes aos ácidos graxos (AG) e possuem papel importante na transferência destes ácidos através da membrana celular, além de torná-los disponíveis para a metabolização. Embora os mecanismos não estejam totalmente elucidados, as FABP são responsáveis pelo transporte e distribuição intracelular dos AG de cadeia longa, com uma possível participação na absorção dos AG (STORCH; THUMSER,

2010). Estas proteínas foram identificadas pela primeira vez em 1972 (OCKNER, 1972); até hoje, foram descritos nove tipos de FABP (*Fatty Acid Binding Protein*), denominadas em função do local em que foram inicialmente identificadas ou onde podem ser encontradas em maior concentração. As mais importantes foram isoladas a partir do fígado, coração, intestino (I-FABP ou FABP-2), cérebro, epiderme e adipócitos (STORCH; THUMSER, 2010).

Todas as FABP possuem alta afinidade com AG, sendo as FABP-2, ligadoras específicas de AG, especialmente de cadeia longa. O mecanismo de transporte dos ácidos graxos através da membrana celular tem sido descrito como um processo de difusão simples, passando pela adsorção à membrana, movimento transmembrana e dessorção. Após, a ligação do AG a uma FABP citoplasmática favorece a dessorção e internalização dos AG. Por esse mecanismo, as FABP modulam sua utilização como metabólitos energéticos e de armazenamento. Além da assimilação dos lipídios dietéticos no intestino, outras funções também estão descritas: direcionamento dos AG do fígado aos caminhos catabólicos e anabólicos, regulação do armazenamento de lipídios, encaminhamento à  $\beta$ -oxidação no músculo e manutenção das membranas fosfolipídicas em tecidos neurais (STORCH; THUMSER, 2010).



**FIGURA 1** - Estão representados os papéis das FABP (*Fatty Acid Binding Protein*) como transportadoras de ácidos graxos e gerenciadoras da distribuição destes ácidos entre as organelas. Fonte: Adaptado de Curi (2002, p.101).

Legenda: FABP=proteínas ligadoras de AG; AG=ácidos graxos; VLDL=lipoproteína de densidade muito baixa; LLP=lipase lipoproteica; AGS=enzima ácido graxo sintetase; FABPm=proteínas transportadoras de AG; PPAR-RXR=fatores de transcrição; R=receptor de membrana de albumina; ?=processo ainda não elucidado.

Os AG são transportados por quilomírons, VLDL ou albumina no fluxo sanguíneo e são incorporados pelo processo de “flip-flop” ou transportados para o interior da célula com o auxílio de uma proteína de membrana. Parte dos AG provém de síntese interna ou da hidrólise dos fosfolípidios da membrana. Quando ligados às FABP, os AG podem ser distribuídos pelas organelas e são utilizados na oxidação e geração de energia, além de desempenharem funções na regulação da transcrição gênica. Podem, ainda, ser estocados em triacilgliceróis ou ser esterificados nos fosfolípidios. (Figura 1)

Estudos de evolução foram realizados com as sequências de FABP e indicam que as diferentes subfamílias são decorrentes de um gene ancestral comum. Entretanto, o mapeamento dos genes de FABP em humanos e camundongos mostrou que os mesmos estão localizados em diferentes cromossomos. O gene FABP-2 codifica uma proteína intracelular da mucosa intestinal responsável pela absorção e transporte intracelular de ácidos graxos e está localizado na região cromossomal 4q28–4q31 (HERTZEL; BERNLOHR, 2000). A proteína FABP-2 é expressa nos enterócitos e limitada ao intestino delgado, especialmente na porção proximal. Possui um local único de ligação com elevada afinidade tanto para AG saturados como insaturados de cadeia longa (BAIER et al.,1995). As ações do FABP-2 no enterócito podem levar a efeitos sistêmicos metabólicos, embora os relatos não sejam inteiramente consistentes (STORCH; THUMSER, 2010).

Entre os diversos polimorfismos do gene FABP-2, o Ala54Thr é um exemplo de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), resultante de uma substituição de alanina (Ala) por treonina (Thr) no códon 54, que vem sendo associado com síndrome metabólica (VIMALESWARAN; RADHA; MOHAN, 2006), resistência à insulina (RI) (BAIER et al., 1995) e obesidade (HEGELE et al., 1996; NAKANISHI et al., 2004; TAVRIDOU et al., 2009). A primeira associação do Ala54Thr foi com RI. Em 1995 se descobriu, através de microcalorimetria, que o alelo mutante Thr54 (rs1799883) tinha afinidade duas vezes maior para o ácido graxo de cadeia longa (AGCL) do que o tipo selvagem. Logo, a hipótese é de que o alelo Thr54 aumente a absorção de AG dietéticos pelo intestino, a concentração lipídica plasmática e, assim, aumente a oxidação de gordura (BAIER et al., 1995). Depois da absorção dos AG, muitos são convertidos em triacilgliceróis e transportados por quilomícrons até os tecidos periféricos. Os triglicédeos são então hidrolisados pela lipase lipoproteica e oxidados, ou reesterificados de volta para o plasma. Como proposto por Randle e colaboradores (1963), o aumento de oxidação de gordura inibe a piruvato-desidrogenase, que é o ponto de entrada para a glicose (via piruvato) para o metabolismo oxidativo e aumenta os níveis de citrato, o qual inibe a glicólise e provoca a diminuição da absorção de glicose; ou seja, o aumento da concentração de AG inibe a captação de glicose no músculo, o que resulta em RI. Portanto, o alelo Thr54 poderia aumentar a RI. A presença de somente um alelo Thr54 parece ser suficiente para apresentar algum efeito quando comparado aos homozigotos Ala54; contudo, indivíduos homozigotos Thr54 parecem sofrer um efeito ainda maior.

Estima-se que a frequência do polimorfismo Ala54Thr seja em torno de 30% na população em geral (DE LUIS et al., 2006). No Brasil, Canani e colaboradores (2005) encontraram uma frequência do alelo Thr54 de 25% em uma amostra de 493 indivíduos com DM2. Um estudo realizado com indivíduos obesos graves encontrou uma frequência ainda maior do alelo Thr (47,3%) (DE LUIS et al., 2009), mostrando que este poderia estar associado ao IMC (HEGELE et al. 1996; NAKANISHI et al., 2004; TAKAKURA et al., 2005; TAVRIDOU et al., 2009), o que ainda é controverso (YAMADA et al., 1997; SIPIILAINEN et al., 1997; VIMALESWARAN; RADHA; MOHAN, 2006; ZHAO et al., 2010).

### 1.2.1 Associação do polimorfismo com Parâmetros Antropométricos

O polimorfismo Ala54Thr tem sido associado com obesidade; todavia, os resultados são conflitantes e inconclusivos. Hegele e colaboradores (1996), ao avaliarem a variação no IMC em 507 aborígenes canadenses, encontraram uma associação significativa do alelo Thr54 com maior IMC e percentual de gordura corporal. Outro estudo, com 249 nipo-americanos, diagnosticados como não diabéticos, sugere que a diferença de gênero e a presença de obesidade devem ser considerados ao associar o IMC com o polimorfismo Ala54Thr. Entretanto, uma metanálise com 27 estudos (10974 indivíduos) não encontrou evidências de que o polimorfismo Ala54Thr tenha associação significativa com IMC (ZHAO et al., 2010). Presume-se que o sexo, idade e raça podem contribuir para as diferenças em estudos de associação entre o polimorfismo Ala54Thr e obesidade (TAKAKURA et al., 2005).

O polimorfismo já foi associado com massa gorda em japoneses (YAMADA et al., 1997) e porcentagem de gordura corporal em aborígenes canadenses (HEGELE et al., 1996). Outro estudo mostrou que, após intervenção nutricional com dieta e exercício físico, os indivíduos portadores do alelo Thr54 tiveram maior redução da circunferência de cintura do que o genótipo homozigoto Ala54, embora não tenha havido diferença significativa no tecido adiposo visceral (TAKAKURA et al., 2005).

### 1.2.2 Associação do polimorfismo com Perfil Lipídico

Alguns estudos mostram que portadores do alelo Thr54 têm níveis séricos de lipídios mais elevados do que os portadores do alelo homozigoto Ala54; no entanto, estes achados não foram controlados para o consumo alimentar dos indivíduos, o qual poderia ser responsável pela diferença no nível sérico dos lipídios (HEGELE et al., 1996; GALLUZZI et al., 2001; NAKANISHI et al., 2004; VIMALESWARAN; RADHA; MOHAN, 2006; DE LUIS et al., 2008). Uma metanálise com 30 estudos (14.401 indivíduos) mostra uma associação do polimorfismo com níveis aumentados de colesterol total (CT) e LDL-c, e valores diminuídos de lipoproteína de alta densidade (HDL-c), sugerindo que o polimorfismo está significativamente associado com lipídios plasmáticos (ZHAO; NZEKEBALOUDOU; IV,

2010). Em pacientes com DM2, a presença do polimorfismo Ala54Thr foi associada a valores elevados de triacilgliceróis (CANANI et al., 2005). Além disso, após sobrecarga lipídica, um aumento nos triacilgliceróis plasmáticos foi observado em pacientes homozigotos Thr54 quando comparado aos pacientes homozigotos Ala54 (GEORGOPOULOS; ARAS; TSAI, 2000; ALMEIDA et al, 2010). O *Framingham Offspring Study* (2001) (n=1930) concluiu que portadores Thr54 possuem uma maior absorção de lipídios pelos enterócitos, levando a um aumento na secreção de quilomícrons, já que encontrou valores aumentados de LDL-c e apolipoproteína B (ApoB) em homens Thr54, e de CT e HDL-c em mulheres Thr54 (GALLUZZI et al., 2001). Por outro lado, um estudo semelhante (n=1022) associou o polimorfismo com menor CT e LDL-c em ambos os sexos, novamente mostrando resultados contraditórios (DUARTE et al., 2003). Nesses estudos, os componentes dietéticos não foram avaliados, sendo um possível viés. Hegele e colaboradores (1997) mostraram que, quando comparados com homozigotos Ala54, os indivíduos portadores do alelo Thr54 apresentam uma diminuição significativa do CT, LDL-c e ApoB após uma dieta rica em fibras solúveis.

Esse polimorfismo também foi associado à presença de nefropatia diabética (CANANI et al., 2005), síndrome metabólica (VIMALESWARAN; RADHA; MOHAN, 2006), resistência insulínica (DE LUIS et al., 1995 e 2009) e suscetibilidade a doenças cardiovasculares (CARLSSON et al., 2000).

### 1.2.3 Associação do polimorfismo com Adipocitocinas Circulatórias

O tecido adiposo é um órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocitocinas. Alterações na quantidade de tecido adiposo, como ocorrem na obesidade, afetam a produção da maioria desses fatores secretados pelos adipócitos. Ácidos graxos livres elevados aumentam a acumulação de TG no adipócito, associando-se com um desequilíbrio da atividade da lipase lipoprotéica e um excesso de produção de adipocinas (DE LUIS et al., 2010). Já se sabe que uma variedade de citocinas inflamatórias, além do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), estão aumentadas em obesos, incluindo as interleucinas IL- 6 e IL-1 $\beta$  acompanhadas de altos níveis de proteína C reativa (PCR)(GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).



Os valores de PCR, marcador inflamatório produzido pelo fígado, foram maiores nos indivíduos com genótipo Ala54Thr, possivelmente devido a uma resposta de absorção pós-prandial alterada de AG (AGREEN et al., 2001; DE LUIS et al., 2010). De Luis e colaboradores (2007) encontraram associação entre o fenótipo mutante (Ala54Thr e Thr54Thr) e maiores níveis de PCR, IL-6 e lipoproteína A.

A leptina, hormônio secretado pelos adipócitos, cujos efeitos sobre o sistema nervoso simpático e função endócrina são parte ativa no controle do dispêndio energético e do apetite, também foi avaliada. De Luis e colaboradores (2009) encontraram níveis menores de adiponectina e níveis maiores de leptina em indivíduos obesos mórbidos com o alelo Thr54; por outro lado, não encontraram diferenças significativas em valores basais de LDL-c ou TG entre pacientes do grupo selvagem e mutante, sugerindo que o efeito deste polimorfismo no metabolismo poderia ser mediado diretamente por adipocitocinas. Esses dados também foram relatados por Albala e colaboradores (2004), que encontraram níveis mais elevados de leptina e TNF- $\alpha$  entre homozigotos Thr54.

#### 1.2.4 Intervenção dietética e o polimorfismo Ala54Thr

Estudos de intervenção mostram uma diferente resposta à gordura dietética nos portadores do polimorfismo Ala54Thr. Em dieta rica em gordura saturada, conforme dados de um questionário alimentar, estes portadores apresentam menores níveis de HDL-c, maior CT, LDL-c e triglicerídeos (TG) (CHAMBERLAIN et al., 2009). O mesmo ocorre em uma dieta rica em ácidos graxos trans. Também foi relatado que os indivíduos com duas cópias da variante Thr54Thr apresentaram um maior aumento pós-prandial dos níveis de triglicerídeos após refeições de almoço oferecidas durante uma semana (LEFEVRE et al., 2005). Em outro estudo, indivíduos normais portadores do polimorfismo apresentaram uma redução na sensibilidade periférica à ação da insulina e maiores valores de AG livres séricos, quando consumiram uma dieta rica em AG saturados no período de um mês, em comparação a uma dieta rica em monoinsaturados ou em carboidratos em igual período (MARÍN et al., 2005).

Ao submeter 109 indivíduos com IMC maior de 25kg/m<sup>2</sup> a uma intervenção nutricional, os portadores do alelo Thr54 responderam melhor a uma dieta moderada de gordura do que homozigotos Ala54. Após 2 meses em dieta com 30% de gordura (gordura

saturada <7%, monoinsaturada 10-15% e, poliinsaturada 10%, do total de calorias), 15% de proteína e 55% de carboidrato, indivíduos Ala54Thr/Thr54Thr, quando comparados com Ala54Ala, diminuíram significativamente o peso ( $7,5\pm 1,2\text{kg}$  versus  $4,2\pm 0,7\text{kg}$ ), o IMC ( $2,1\pm 0,9\text{kg/m}^2$  versus  $1,2\pm 0,2\text{kg/m}^2$ ), circunferência de cintura ( $7,6\pm 0,6\text{cm}$  versus  $5,2\pm 0,4\text{cm}$ ), razão cintura/quadril ( $0,04\pm 0,02$  versus  $0,02\pm 0,02$ ), e proteína C reativa ( $1,4\pm 0,18\text{mg/L}$  versus  $0,76\pm 0,2\text{mg/L}$ ) ( $p<0,05$ ) (LOPEZ et al., 2012).

Após uma modificação no estilo de vida, incluindo dieta hipocalórica e exercício aeróbico, obesos portadores do alelo Thr54 tiveram significativa redução de pressão arterial sistólica e níveis de glicose. Já os indivíduos com genótipo selvagem tiveram redução significativa na massa de gordura corporal, LDL-c e níveis de leptina (DE LUIS et al., 2006). Outro estudo, com 80 mulheres obesas japonesas e 146 controles, todas com intervenção dietética de 1200 kcal/dia (60% carboidrato, 20% gordura) e exercício físico por 6 meses, concluiu que o alelo Thr54 está associado com menor taxa metabólica de repouso e maior circunferência da cintura após intervenção (TAKAKURA et al., 2005).

A gravidade clínica da RI e o seu efeito sobre a homeostase da glicose dependem da composição de AG da dieta. O aumento da absorção de AG poliinsaturados ômega-3 melhora a sensibilidade à insulina, diferente da absorção aumentada de AG saturados. Portanto, o polimorfismo Ala54Thr do FABP-2 pode ser potencialmente mais prejudicial em indivíduos que consomem uma dieta rica em gordura saturada (CHAMBERLAIN et al., 2009).

## 2 JUSTIFICATIVA

Diversos genes vêm sendo associados com susceptibilidade à obesidade. No entanto, apenas uma minoria tem mostrado associação convincente. Tendo em vista a magnitude do problema, se faz necessário aprofundar o conhecimento de fatores genéticos em fenótipos relacionados. Os genes envolvidos nas vias de consumo de alimentos, absorção intestinal e gasto energético podem ter um papel na predisposição para a obesidade. Considerando as inconclusivas relações entre o polimorfismo Ala54Thr do gene FABP-2 (*Fatty Acid Binding Protein 2*) e obesidade, o presente estudo busca avaliar a influencia do alelo Thr54 em indivíduos obesos graves candidatos à cirurgia bariátrica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar o perfil lipídico, perfil metabólico e o peso corporal de pacientes obesos, candidatos à cirurgia bariátrica, com ou sem o polimorfismo Ala54Thr do gene FABP-2, levando em consideração o consumo alimentar dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ÅGREN, Jyrki J et al. Postprandial responses of individual fatty acids in subjects homozygous for the threonine- or alanine-encoding allele in codon 54 of the intestinal fatty acid binding protein 2 gene. **Am J Clin Nutr**, Kuopio, v. 73, n. 1, p.31-35, jan. 2001.
- ALBALA, Cecília. Intestinal FABP2 A54T polymorphism: association with insulin resistance and obesity in women. **Obesity Research**, v. 12, n. 2, p.340-345, fev. 2004.
- ALMEIDA Jussara C et al. The Ala54Thr polymorphism of the FABP2 gene influences the postprandial fatty acids in patients with type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, 95:3909-3917, 2010.
- BAIER, Leslie J et al. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. **J Clin Invest**, New York, v.95, p.1281-1287, mar. 1995.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2011: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 132 p.: Il.
- CANANI, Luis H et al. The fatty acid-binding protein-2 A54T polymorphism is associated with renal disease in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, Porto Alegre, v. 54, n. , p.3326-3330, nov. 2005.
- CARLSSON, Martin et al. The T 54 allele of the intestinal fatty acid-binding protein 2 is associated with a parental history of stroke. **J Clin Endocrinol Metab**, Sweden, v. 85, n. 8, p.2801-2804, 1 ago. 2000.
- CHAKRAVARTHY M.V.; BOOHT F.W. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. **J Appl Physiol**, 96(1):3-10, jan 2004.
- CHAMBERLAIN, Alanna M. et al. The T 54 allele of the intestinal fatty acid-binding protein 2 is associated with a parental history of stroke. **Metabolism - Clinical And Experimental**, Houston, v. 58, n. 7, p.1222-1228, set. 2009.
- CURI, Rui et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. cap 9, p. 93 a 108.
- DE LUIS, DA. et al. Ala54Thr polymorphism of fatty acid binding protein 2, role on insulin resistance and cardiovascular risk factors in presurgical morbid obesity patients. **Obesity Surgery**, Spain, v. 12, n. 19, p.1691-1696, dez. 2009.
- DE LUIS, DA. et al. Influence of ALA54THR Polymorphism of Fatty Acid Binding Protein 2 on Lifestyle Modification Response in Obese Subjects. **Annals Of Nutrition and Metabolism**, Spain, n. , p.354-360, 2006.

DE LUIS, DA. et al. Influence of Ala54Thr polymorphism of fatty acid-binding protein-2 on clinical results of biliopancreatic diversion. **Nutrition**, Spain, v. 4, n. 24, p.300-304, abr. 2008.

DE LUIS, DA. et al. Influence of ALA54THR Polymorphism of Fatty Acid Binding Protein 2 on obesity and cardiovascular risk factors. **Hormone and Metabolic Research**, Spain, v. 11, n. 39, p.830-834, nov. 2007.

DUARTE, Natalia L et al. Influence of ALA54THR Polymorphism of Fatty Acid Binding Protein 2 on Lifestyle Modification Response in Obese Subjects. **Molecular Genetics and Metabolism**, Australia, n. , p.183-188, 2003.

FLEGAL, K.M. et al. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. **JAMA: The Journal of The American Medical Association**, v. 307, n. 5, p.491-497, 1 fev. 2012.

GALUZZI, Jennifer R et al. Association of the A/T54 polymorphism in the intestinal fatty acid binding protein with variations in plasma lipids in the Framingham Offspring Study. **Atherosclerosis**, v. 159, n. 2, p.417-424, dez. 2001.

GEORGOPOULOS, A; ARAS, O; TSAI, MY. Codon-54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with elevation of fasting and postprandial triglyceride in type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 9, p.3155-3160, 2000.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. , p.415-445, 2011.

HEGELE, Robert A et al. Genetic variation of intestinal fatty acid-binding protein associated with variation in body mass in aboriginal Canadians. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, p. 4334-4337, 1996.

HEGELE, Robert A et al. Intestinal fatty acid-binding protein variation associated with variation in the response of plasma lipoproteins to dietary fibre. **European Journal of Clinical Investigation**, Toronto, v. 27, p. 857-862, 1997.

HERTZEL, Ann Vogel; BERNLOHR, David A.. The mammalian fatty acidbinding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, St Paul, v. 11, n. 5, p.170-180, 2000.

KATZMARZYK, Peter T et al. Familial Resemblance in Fatness and Fat Distribution. **American Journal of Human Biology**, v.12, p.395-404, 2000.

LEFEVRE, Michael et al. Comparison of the acute response to meals enriched with cis- or trans-fatty acids on glucose and lipids in overweight individuals with differing FABP2 genotypes. **Metabolism**, v. 54, p.1652-1658, 2005.

LOOS, Ruth JF. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n.2, p. 211-226, apr. 2012.

LOOS, Ruth JF; RANKINEN Tuomo. Gene-diet interactions on body weight changes. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, p. S29-S34, 2005.

LOPEZ, Martinez E et al. Effect of Ala54Thr polymorphism of FABP2 on anthropometric and biochemical variables in response to a moderate-fat diet. **Nutrition**, Guadalajara, v. 29, n. 1, p. 46-51, jul. 2012.

MARIN, Carmen et al. The ala54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with a change in insulin sensitivity after a change in the type of dietary fat. **Am J of Clin Nutr**, v. 82, p.196-200, 2005.

NAKANISHI, S et al. The effect of polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein 2 gene on fat metabolism is associated with gender and obesity amongst non-diabetic Japanese-Americans. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Hiroshima, v. 6, p. 45-49, jan. 2004.

OCKNER, Robert K et al. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, and other tissues. **Science**, San Francisco, n. , p.51-70, 7 jul. 1972.

RANDLE, PJ et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 281, n. 7285, p.785-789, apr. 1963.

RANKINEN, T et al. The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity**, n. 14, p.529-644, apr. 2006.

SANTOS, LM et al. Trends in Morbid Obesity and in Bariatric Surgeries Covered by the Brazilian Public Health System. **Obesity Surgery**, v. 7, n. 20, p.943-948, jul. 2010

SIPIILAINEN R. et al. Variants in the human intestinal fatty acid binding protein 2 gene in obese subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 8, p.2629-2632, aug. 1997.

SPIEGELMAN, Bruce M; FLIER Jeffrey S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, Vol. 104, 531–543, 23 feb, 2001.

STORCH, Judith; THUMSER, Alfred E. Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. **Journal of Biological Chemistry**, United Kingdom, v. 285, p. 32679-32683, out. 2010.

TAKAKURA, Yasuto et al. Thr54 allele of the FABP2 gene affects resting metabolic rate and visceral obesity. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Kyoto, v. 67, n. 1, p.36-42, jan. 2005.

TAVRIDOU, A et al. Thr54 allele of fatty-acid binding protein 2 gene is associated with obesity but not type 2 diabetes mellitus in a Caucasian population. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Alexandroupolis, v. 84, n. , p.132-137, 2009.

TCHERNOF, André; DESPRÉS, Jean-pierre. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiological Reviews**, v. 93, p.359-404, jan. 2013.

VIMALESWARAN, Karani S.; RADHA, Venkatesan; MOHAN, Viswanathan. Thr54 allele carriers of the Ala54Thr variant of FABP2 gene have associations with metabolic syndrome and hypertriglyceridemia in urban South Indians. **Metabolism Clinical and Experimental**, Chennai, n. , p.1222-1226, 2006.

WHO. World Health Organization. **Fact Files: Ten facts on obesity**. 2010.

YAMADA, K et al. Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. **Diabetologia**, Kumamoto, v. 40, n. , p.706-710, 1997.

ZHAO, T et al. Meta-analysis on the effect of the Ala54Thr polymorphism of the fatty acid-bindingprotein 2 gene on body mass index. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, Hangzhou, v. 21, n. 10, p.823-829, jun. 2010.

ZHAO, T.; NZEKEBALOUDOU, M.; IV, J. Ala54Thr polymorphism of fatty acid-binding protein 2 gene and fasting bloodlipids: a meta-analysis. **Atherosclerosis**, Hangzhou, v. 210, n. 2, p.461-467, jun. 2010.



**ARTIGO ORIGINAL: Polimorfismo Ala54Thr do gene *Fatty Acid Binding Protein-2*:  
perfil lipídico de obesos graves controlado pelo consumo alimentar**

4.1 PERIÓDICO DE ESCOLHA

European Journal of Nutrition (Springer)

Fator de impacto: 3.127

Editor/distribuidor: Gerhard Rechkemmer: 1436-6207

**Polimorfismo Ala54Thr do gene *Fatty Acid Binding Protein-2*: perfil lipídico de obesos graves controlado pelo consumo alimentar**

**Ala54Thr Polymorphism of *Fatty Acid Binding Protein -2*: blood lipids of morbid obesity patients controlled by food intake**

Natália Luiza Kops<sup>1</sup>

Jaqueline Driemeyer Correia Horvath<sup>2,3,4</sup>

Mariana Laitano Dias de Castro<sup>2,3</sup>

Natasha Malinoski<sup>1</sup>

Gabriela Corrêa Souza<sup>1,5</sup>

Rogério Friedman<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina – Graduação Nutrição – UFRGS

<sup>2</sup> Programa de Pós Graduação em Endocrinologia - UFRGS

<sup>3</sup> Serviço de Endocrinologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA

<sup>4</sup> Centro de Ciências da Saúde - Graduação Nutrição - UCS

<sup>5</sup> Departamento de Medicina Interna – FAMED-UFRGS

Conflito de interesses: os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – FIPE/HCPA

Endereço para correspondência:

Rogério Friedman

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2.350

Porto Alegre – RS. CEP 90035-903

Fone: 55 51 33598000 ou Fax: 55 51 33598001

E-mail: rogeriofriedman@gmail.com

## RESUMO

*Objetivo:* Avaliar o perfil antropométrico e lipídico de pacientes obesos grau III, com ou sem o alelo Thr do gene FABP-2 (*Fatty Acid Binding Protein 2*), levando em consideração o consumo alimentar dos pacientes. *Metodologia:* Estudo transversal, com 89 pacientes com indicação de cirurgia bariátrica. Todos realizaram avaliações nutricionais (antropometria e registro alimentar pesado de 3 dias com balança digital de cozinha e copo graduado), laboratoriais e genéticas. Foram excluídos aqueles com triglicerídeos  $\geq 400$  mg/dl. *Resultados:* Os pacientes foram divididos de acordo com a presença do alelo Thr54. Dos pacientes avaliados, 32,6% possuem o genótipo Ala54Thr e 7,9% possui o genótipo homozigoto mutante (Thr54Thr). Não foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros antropométricos. O colesterol total ( $175,33 \pm 34,9$  vs  $197 \pm 34,7$ ;  $p=0,007$ ) e o HDL-c ( $38,5 \pm 7,6$  vs  $43,3 \pm 11,1$  mg/dL;  $p=0,034$ ) foram mais baixos nos portadores do alelo Thr do que no homozigoto Ala54. A única diferença significativa no consumo alimentar foi a razão ômega 3/ômega 6, também menor nos portadores do alelo Thr. Quando ajustado pelo consumo alimentar, o HDL-c ( $p=0,365$ ) e o colesterol total ( $p=0,227$ ) não têm diferença significativa entre os pacientes com e sem o alelo Thr do gene FABP2. *Conclusões:* Neste estudo, os valores lipídicos foram controlados pelo consumo alimentar de ácidos graxos poliinsaturados e nenhuma associação foi encontrada.

Palavras-chave: FABP-2. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. Obesidade. Perfil lipídico.

**ABSTRACT**

*Objective:* To evaluate the anthropometric and lipid profile of grade III obesity patients, with or without the Thr allele of the gene FABP-2 (*Fatty Acid Binding Protein 2*), taking into account the patient's food consumption. *Methods:* It was evaluated 89 patients referred for bariatric surgery. They were subjected to nutritional (anthropometry and food weight records for 3 days with digital kitchen scale and measuring cup), laboratory and genetic assessments. We excluded those with triglycerides  $\geq 400$ mg/dl. *Results:* The patients were divided according to the presence of the Thr54 allele. Among the patients, 32.6% have Ala54Thr genotype and 7.9% have the Thr54Thr genotype. No significant differences were found between anthropometric parameter. The value of the total cholesterol ( $175,33 \pm 34,9$  vs  $197 \pm 34,7$ ;  $p=0,007$ ) and the HDL-C ( $38,5 \pm 7,6$  vs  $43,3 \pm 11,1$ mg/dL;  $p=0,034$ ) were lower in carriers of the Thr allele than in wild group ( $38,5 \pm 7,6$  vs  $43,3 \pm 11,1$ mg/dL,  $p = 0,034$ ). The only significant difference in dietary intake was the  $\omega 3/\omega 6$  rate, also lower in carriers of the Thr allele. When adjusted for dietary intake, HDL-C ( $p=0,365$ ) and total cholesterol ( $p=0,227$ ) it has no significant difference between patients with and without the Thr allele FABP2 gene. *Conclusions:* In this study the lipid values was controlled by the dietary intake of polyunsaturated fatty acids, and no association was found.

**Key words:** Fatty Acid Binding Protein 2. Single Nucleotide Polymorphism. Obesity. Blood lipids.

## INTRODUÇÃO

A busca de variantes genéticas que contribuem para a predisposição à obesidade iniciou em meados da década de 1990. Centenas de genes foram propostos como candidatos, atuando na regulação do peso corporal; entretanto, apenas uma minoria tem mostrado associação com susceptibilidade à obesidade [1,2]. Entre eles, o polimorfismo Ala54Thr do gene FABP-2 (*Fatty Acid Binding Protein 2*) vem sendo associado com Índice de Massa Corporal (IMC)[3-6], síndrome metabólica [7] e resistência à insulina (RI) [3]. Este polimorfismo é um exemplo de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), resultante de uma substituição de alanina (Ala) por treonina (Thr) no códon 54.

O gene FABP-2 (*Fatty Acid Binding Protein 2*), localizado no braço longo do cromossomo 4, codifica uma proteína intracelular da mucosa intestinal responsável pela absorção e transporte intracelular de ácidos graxos (AG), embora a função específica da FABP-2 não esteja totalmente elucidada. Identificadas pela primeira vez em 1972 [8], estão descritas nove tipos de FABP (*Fatty Acid Binding Protein*), proteínas ligantes aos AG, importantes na transferência destes ácidos através da membrana celular. A proteína FABP-2 é expressa nos enterócitos e limitada ao intestino delgado, especialmente na porção proximal [9].

A primeira associação do Ala54Thr foi com RI em 1995, se descobriu, através de microcalorimetria, que o alelo mutante Thr54 (rs1799883) tinha afinidade duas vezes maior para o ácido graxo de cadeia longa (AGCL) do que o tipo selvagem. Logo, a hipótese é de que o alelo Thr54 aumente a absorção de AG dietéticos pelo intestino, a concentração lipídica plasmática e, assim, tenha maior oxidação de gordura [3]. Alguns estudos mostram que portadores do alelo Thr54 têm níveis séricos de lipídios mais elevados do que os portadores do alelo homocigoto Ala54; no entanto, estes achados não foram controlados para o consumo alimentar dos indivíduos, o qual poderia ser responsável pela diferença no nível sérico dos lipídios [4,5,7,10,11]. Estudos de intervenção vêm mostrando uma diferente resposta à gordura dietética nos portadores do polimorfismo Ala54Thr [12-15].

Considerando as inconclusivas relações entre o polimorfismo Ala54Thr do gene FABP-2, o objetivo deste estudo foi avaliar a possível associação entre o alelo Thr54 com o perfil antropométrico e lipídico de pacientes obesos graves candidatos à cirurgia bariátrica

levando em consideração o consumo alimentar dos pacientes. Os pacientes foram divididos de acordo com a presença do alelo Thr54.

## *MÉTODOS*

Estudo transversal envolvendo 89 pacientes obesos graves ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) com indicação de cirurgia bariátrica segundo o consenso brasileiro de cirurgia bariátrica e metabólica [16]. De forma consecutiva, estes foram atendidos nos Ambulatórios de Cirurgia Bariátrica e de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de março de 2010 a maio de 2013. Foram excluídos aqueles com triglicérides  $\geq 400 \text{ mg/dl}$ . O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### Avaliação antropométrica

Todas as aferições seguiram as recomendações do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional do Ministério da Saúde [17]. O peso (kg) foi aferido em balança antropométrica digital (Filizolla, Brasil), com sensibilidade de 0,1 kg, com roupas leves e sem calçados. A estatura (m) foi medida em estadiômetro de parede (Sanny, Brasil), com o paciente em ortostatismo e a cabeça na posição de Frankfurt. Através do peso e da estatura foi determinado o IMC, peso dividido pelo quadrado da estatura. Com fita métrica de fibra de vidro (Wiso, Brasil), a circunferência do braço, da cintura e do quadril foram aferidas. A primeira, aferida no ponto médio entre o acrômio e o olécrano na face posterior do braço não dominante relaxado. A circunferência abdominal (cm), medida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca; a circunferência do quadril (cm), medida no local de maior proeminência da região glútea, em uma linha horizontal até a região anterior do quadril. Assim, foi calculado o índice de adiposidade corporal (IAC) através da seguinte fórmula:  $[\text{Circunferência Quadril}/(\text{altura} \times \sqrt{\text{altura}})] - 18$ . A Razão Cintura-Quadril (RCQ) também foi calculada. A atividade física foi analisada através do questionário Questionário Internacional de Atividade Física-versão curta (IPAQ) [18].

### Consumo alimentar

A avaliação do consumo alimentar incluiu registros alimentares de 24 horas durante 3 dias aleatórios. Foram fornecidos balanças domésticas digitais (com escalas graduadas a partir de 1g) e copos graduados (a partir de 25 ml). Os pacientes receberam instruções pelo nutricionista para o manuseio de balanças domésticas digitais e de copo graduado, utilizados para pesar e medir todos os alimentos consumidos durante os 3 dias em formulários apropriados. Posteriormente, revisavam-se essas anotações, complementando-se dados incompletos ou corrigindo-se os erros cometidos. A partir dos registros, foi calculado uma média dos alimentos consumidos nos 3 dias, obtendo-se assim o registro da média das calorias, macronutrientes, micronutrientes e fibras ingeridas habitualmente, os cálculos nutricionais foram realizados através do software Nutribase versão 7.0 (Empresa, EUA). A taxa metabólica basal (TMB) foi calculada com base nas fórmulas para adultos com excesso de peso, para homens e para mulheres [19].

### Avaliação genética

Para detecção dos polimorfismos do gene FABP-2 e sua descrição genotípica foram realizadas uma técnica de amplificação de DNA em tempo real previamente validada (Ensaio ID C\_30090620\_10; *Applied Biosystems*, Foster City, CA; *TaqMan® SNP genotyping Assays*, *Applied Biosystems*, CA, USA). Para tal, foi utilizado o equipamento *ABI PRISM 7000 Real-Time PCR system*. As reações foram realizadas utilizando o seguinte protocolo de amplificação: um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, e um ciclo final de 60°C por 1,5 minutos. Após a amplificação, a interpretação dos dados e a leitura do genótipo foram realizadas através do *software SDS 1.1*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA.

### Avaliação clínica e laboratorial

A confirmação das comorbidades associadas foi realizada através da história clínica, medicações em uso e dados de prontuário. A avaliação metabólica consistiu em dosagens de triglicérides (TG), colesterol total (CT) (ambos por método enzimático colorimétrico,

Hitachi 917, Roche, Brasil); colesterol HDL (HDL-c) (método enzimático colorimétrico homogêneo, Hitachi 917, Roche, Brasil); o colesterol LDL (LDL-c) foi estimado através da fórmula de Friedewald [20]; a glicose sérica foi medida por método enzimático colorimétrico oxidase (Hitachi 917, Roche, Brasil); hemoglobina glicada (A1c%), por cromatografia líquida de alta precisão (aparelho Tosoh 2.2 Plus Hb A1c; Tosoh Corporation, Tokio Japão imunoturbidimetria); insulina, TSH, T4 por eletro-quimioluminescência (ECLIA) (Modular E-170, Roche, Brasil); proteína C reativa (PCR) por Nefelometria (Nefelômetro BNII, DSP, Brasil) e cálcio sérico total por Cresolftaleína (Hitachi 917 Roche, Brasil). Todos os exames foram realizados no Serviço de Patologia Clínica do HCPA.

#### Análise estatística

A análise estatística foi realizada no *software* Spss v.20 (Empresa, EUA). Foram calculadas as médias, os desvios padrões (DP) e os percentuais dos dados coletados. Foram realizados testes *t* de uma amostra, teste *t* para amostras independentes e teste U de Mann-Whitney e  $X^2$ . Para remover influências do consumo alimentar no perfil lipídico dos pacientes, fez-se uma análise de covariância (ANCOVA). Como a frequência do genótipo homozigoto Thr é baixa, combinamos o grupo Ala54Thr e Thr54Thr como um grupo e o grupo selvagem Ala54Ala como um segundo grupo. Os resultados foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

#### RESULTADOS

Foram avaliados 89 pacientes, com predominância do sexo feminino (78,7%). A idade foi similar entre os grupos, com média de  $45,27 \pm 11,76$  (DP) anos. A escolaridade dos pacientes foi de  $8,71 \pm 4,08$  (DP) anos. Dos pacientes avaliados, 40,5% (36 pacientes) possuem o alelo Thr (32,6% Ala54Thr e 7,9% Thr54Thr) e 59,5% (53 pacientes) possuem o genótipo Ala54Ala (grupo selvagem).

Com relação às características clínicas, 75,3% dos pacientes possuem Hipertensão Arterial Sistêmica, 43,8% possuem Síndrome da Apnéia/Hipopnéia Obstrutiva do Sono,



33,7% Diabetes Mellitus tipo 2 e 18% dislipidemia. Não há diferença entre os grupos selvagem e mutante.

Conforme Tabela 1, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação aos parâmetros antropométricos. O peso médio  $\pm$  DP dos pacientes foi de  $127,65 \pm 26,99$  kg e o IMC foi  $47,79 \pm 8,32$  kg/m<sup>2</sup>. A circunferência abdominal e a circunferência do quadril médias  $\pm$  DP,  $135,12 \pm 17,21$  cm e  $138,92 \pm 16,83$ , respectivamente, também foram similares entre os grupos. Na Tabela 2 encontram-se a média dos dados apresentados pelo registro alimentar de 24h pesado e registrado num período de 3 dias aleatórios. Os pacientes tiveram um consumo médio  $\pm$  (DP) de  $2692,4 \pm 1097,77$  kcal/dia,  $100,51$  (30,6-788,45) g/dia de lipídeos e  $270,94$  ( $33,57 \pm 958,1$ ) mg/dia de colesterol. A única diferença significativa foi na razão do consumo de ômega 3/ômega 6, maior nos indivíduos portadores do genótipo selvagem ( $0,14 \pm 0,08$  vs  $0,11 \pm 0,02$ ;  $p=0,003$ ). O exercício aeróbico foi similar em ambos os grupos ( $p=0,072$ ).

Referente aos parâmetros bioquímicos percebe-se uma diferença significativa no colesterol total ( $175,33 \pm 34,9$  Ala54Thr e Thr54Thr vs  $197,02 \pm 34,71$  mg/dL Ala54Ala;  $p=0,007$ ) e no HDL-c ( $38,5 \pm 7,6$  Ala54Thr e Thr54Thr vs  $43,3 \pm 11,1$  mg/dL Ala54Ala;  $p=0,034$ ), conforme Tabela 3. Os triglicerídeos também foram menores nos portadores do alelo Thr do que no grupo selvagem, mas o resultado não foi significativo ( $140,5 \pm 65,5$  vs  $184,3 \pm 115,0$  mg/dL;  $p=0,055$ ). No entanto, após uma análise de covariância, controlada pelo consumo de AG poliinsaturados ômega 3/ômega 3, não houve diferença significativa nos valores de CT ( $p=0,227$ ) e HDL-c ( $p=0,365$ ) entre os grupos.

## *DISCUSSÃO*

Menores níveis de CT e HDL-c foram encontrados nos portadores do alelo Thr. No entanto, a razão ômega3/ômega 6 também foi menor nesses pacientes. Quando controlado pelo consumo de ômega 3/ômega 6, não houve associação do alelo Thr do gene FABP-2 com valores lipídicos.

A frequência do polimorfismo Ala54Thr foi de 32,6% e, 7,9% do homocigoto Thr, menor do que o encontrado em um estudo anterior com indivíduos obesos graves (43,7%

Ala54Thr e 3,6 Thr54Thr) [21], mas semelhante à frequência estimada para a população geral (30%) [22]. Por outro lado, um estudo brasileiro com 493 indivíduos diabéticos tipo 2 encontrou uma frequência menor, de 25% do alelo Thr [23].

Estudos mostram claramente a importância e envolvimento do componente genético no desenvolvimento da obesidade. Em relação ao IMC, uma metanálise encontrou herdabilidade de 40 a 60% [24]. O polimorfismo Ala54Thr já foi associado ao IMC [4-6], todavia os resultados são controversos [7,25-27]. Neste estudo, associações com parâmetros antropométricos não foram encontradas. Presume-se que o sexo, idade e raça podem contribuir para as diferenças em estudos de associação entre o polimorfismo Ala54Thr e obesidade [28].

Nosso estudo encontrou um menor consumo de ômega 3/ômega 6 nos portadores Thr54. Não há estudos que justifiquem essa diferença no consumo alimentar. A maioria suporta a idéia de que a absorção de AG seja diferente entre os grupos. A hipótese era de que o alelo Thr aumentasse a absorção de AG dietéticos pelo intestino, a concentração lipídica plasmática e, assim, a oxidação de gordura [3,29]. Todavia, um estudo mostrou que o polimorfismo está associado com o aumento da oxidação de gordura e hiperinsulinemia, mas que estes efeitos não são mediados por um aumento na absorção de AG intestinal [30].

Reforçando nossos achados, um único estudo associou o polimorfismo com menor CT e LDL-c (n=1022) [31]. Por outro lado, alguns estudos mostram que portadores do alelo Thr54 têm lipídios séricos mais elevados do que os portadores do homocigoto Ala54; no entanto, estes achados não foram controlados pelo consumo alimentar dos indivíduos, o qual poderia ser responsável pela diferença no nível sérico dos lipídios [4,5,7,10,11,31]. Uma metanálise com 30 estudos (14.401 indivíduos) também mostrou uma associação do polimorfismo com níveis aumentados de CT e LDL-c, e valores diminuídos de HDL-c [32]. O *Framingham Offspring Study* (n=1930) [10] concluiu que portadores Thr54 possuem uma maior absorção de lipídios pelos enterócitos, levando a um aumento na secreção de quilomícrons, já que encontrou valores aumentados de LDL-c e apolipoproteína B (Apo B) em homens Thr54, e de CT e HDL-c em mulheres Thr54.

Neste estudo a diferença de TG entre os grupos não foi significativa; diferente do encontrado em pacientes com DM2, em que a presença do polimorfismo Ala54Thr foi associada a valores elevados de TG [23]. Além disso, após sobrecarga lipídica, um aumento

nos TG foi observado em pacientes homozigotos Thr54 quando comparado aos pacientes homozigotos Ala54 [33].

Estudos de intervenção mostraram uma diferente resposta à gordura dietética [12-15]. Hegele e colaboradores [34] mostraram que os portadores do alelo Thr54 apresentaram uma diminuição significativa do CT, LDL-c e apo-B após uma dieta rica em fibras solúveis. Em dieta rica em gordura saturada e gordura trans, estes apresentam menores níveis de HDL-c, maior CT, LDL-c e TG [12]. Em outro estudo, portadores do polimorfismo apresentaram uma redução na sensibilidade periférica à ação da insulina e maiores valores de AG livres séricos, quando consumiram uma dieta rica em AG saturados [14]. O aumento da absorção de ômega-3 melhora a sensibilidade à insulina, diferente da absorção aumentada de AG saturados. Assim, o polimorfismo Ala54Thr do FABP-2 pode ser potencialmente mais prejudicial em indivíduos que consomem uma dieta rica em gordura saturada, por isso a importância do controle do consumo alimentar neste tipo estudo.

Os efeitos do menor consumo de ômega 3/ômega 6 dos portadores Thr54 podem explicar o menor CT e HDL-c encontrado. Os AG ômega-3 exercem inúmeros efeitos sobre aspectos fisiológicos e metabólicos, tais como função antiinflamatória, diminuição da agregação plaquetária e melhora da função endotelial. O efeito sobre trigliceridemia se deve à ação na redução da síntese de apo-B e aumento do seu catabolismo simultaneamente pode acelerar o catabolismo dos quilomícrons por estimular a atividade da enzima lipase lipoproteica. Em teoria, o aumento da ingestão de ômega-6 poderia elevar a geração de mediadores inflamatórios. A relação ômega-3/ômega-6 com o risco cardiovascular tem sido questionada. Ambos têm sido associados a efeitos benéficos para a saúde cardiovascular. Entretanto, a importância desta relação fundamenta-se na competição existente entre os ácidos linoléico (ômega-6) e linolênico (ômega-3) pela ação da enzima delta-6-desaturase, que os converte em diferentes subespécies. O consumo elevado de ômega 6 pode limitar os benefícios do ômega-3. Por outro, a afinidade maior da enzima delta-6-desaturase pelo ômega-3 pode fazer que os metabólitos essenciais derivados da bioconversão do ácido linoléico não sejam produzidos de forma satisfatória [35].

Este foi o único estudo encontrado em que o consumo alimentar dos pacientes foi pesado com uma balança digital de cozinha. Os valores do registro alimentar são uma média de 3 dias aleatórios, aumentando a fidedignidade dos resultados. Por outro lado, o estudo possui limitações que devem ser observadas. Este não foi ajustado para o tratamento

medicamentoso dos participantes, que pode ter um impacto sobre o metabolismo de AG e levar a resultados divergentes, assim como a ausência de controle de adesão ao instrumento de avaliação da dieta. O número de participantes também é relativamente baixo, podendo afetar as conclusões finais do estudo.

Concluindo, quando ajustado pelo consumo alimentar, não foram encontradas diferenças significativas no perfil lipídico de pacientes candidatos à cirurgia bariátrica com e sem o alelo Thr do gene FABP-2.

### *AGRADECIMENTOS*

Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e recebeu bolsas de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### *CONFLITO DE INTERESSES*

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

- 1 Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*, 14(4):529-644
- 2 Loos, Ruth JF (2012). Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26(2):211-26. doi: 10.1016/j.beem
- 3 Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H (1995) An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J. Clin. Invest* 95:1281-1287
- 4 Hegele RA, Robert A, Hegele F, Harris SB, Hanley AJG et al (1996) Genetic variation of intestinal fatty acid-binding protein associated with variation in body mass in aboriginal Canadians. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4334-4337
- 5 Nakanishi S, Yamane K, Kamei N, Okubo M, Kohno N (2004) The effect of polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein 2 gene on fat metabolism is associated with gender and obesity amongst non-diabetic Japanese-Americans. *J Diabetes Obes Metab* 6(1):45-9
- 6 Tavridou A, Arvanitidis KI, Tiptiri-Kourpeti A et al (2009) Thr54 allele of fatty-acid binding protein 2 gene is associated with obesity but not type 2 diabetes mellitus in a Caucasian population. *Diabetes Res Clin Pract* 84(2):132-7
- 7 Vimalaswaran KS, Radha V, Mohan V (2006) Thr54 allele carriers of the Ala54Thr variant of FABP2 gene have associations with metabolic syndrome and hypertriglyceridemia in urban South Indians. *Metabolism* 55(9):1222-6
- 8 Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WKL (1972) A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, and other tissues. *Science* 177(4043):56-8. doi: 10.1126
- 9 Storch J, Thumser AE (2010) Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *J Biol Chem* 285(43):32679-83. doi: 10.1074/jbc.R110.135210
- 10 Galluzzi JR, Cupples LA, Otvos JD, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM (2001) Association of the A/T54 polymorphism in the intestinal fatty acid binding protein with variations in plasma lipids in the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis* 159(2):417-24
- 11 de Luis DA, Sagrado MG, Izaola O, Terroba MC, Cuellar L, Conde R, Martin T (2008) Influence of Ala54Thr polymorphism of fatty acid-binding protein-2 on clinical results of biliopancreatic diversion. *Nutrition* 24(4):300-4. doi: 10.1016/j.nut.2007.12.009
- 12 Carlsson M, Orho-Melander M, Hedenbro J, Almgren P, Groop LC (2000) The T 54 allele of the intestinal fatty acid-binding protein 2 is associated with a parental history of stroke. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8):2801-4

- 13 Lefevre M, Lovejoy JC, Smith SR, Delany JP et al (2005) Comparison of the acute response to meals enriched with cis- or trans-fatty acids on glucose and lipids in overweight individuals with differing FABP2 genotypes. *Metabolism* 54(12):1652-8
- 14 Marín C, Pérez-Jiménez F, Gómez P, Delgado J et al (2005) The ala54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with a change in insulin sensitivity after a change in the type of dietary fat. *Am J Clin Nutr.* 82(1):196-200
- 15 Martinez-Lopez E, Garcia-Garcia MR, Gonzalez-Avalos JM et al (2012) Effect of Ala54Thr polymorphism of FABP2 on anthropometric and biochemical variables in response to a moderate-fat diet. *Nutrition* 29(1):46-51. doi: 10.1016/j.nut.2012.03.002
- 16 Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (2006) Consenso Brasileiro Multissocietário em cirurgia da obesidade. <http://www.sbc.org.br/default.asp>. Acesso em 10 Junho 2013
- 17 Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - Sisvan: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde. Brasília; Disponível em: <http://nutricao.saude.gov.br>. Acesso em Junho de 2013
- 18 Pardini R, Matsudo SM, Araújo T et al (2001) Validação do questionário internacional de nível de atividade física (IPAQ - versão 6): estudo piloto em adultos jovens brasileiros. *Rev. Bras. Ciên. e Mov.* 9 (3): 45-51
- 19 Institute of Medicine (IOM) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes (2002-2005) Dietary Reference Intakes (DRI) For Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. [www.nap.edu](http://www.nap.edu). Acesso em 10 de Junho de 2012
- 20 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin. Chem* 18:499-502
- 21 de Luis DA, Sagrado MG, Aller R, Izaola O, Conde R, Romero E (2009) Ala54Thr polymorphism of fatty acid binding protein 2, role on insulin resistance and cardiovascular risk factors in presurgical morbid obesity patients. *Obes Surg.* 19(12):1691-6. doi: 10.1007/s11695-009-9859-x
- 22 de Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R (2006) Influence of ALA54THR Polymorphism of Fatty Acid Binding Protein 2 on Lifestyle Modification Response in Obese Subjects. *Ann Nutr Metab.* 50(4):354-60
- 23 Canani LH, Capp C, Ng DP et al (2005) The fatty acid-binding protein-2 A54T polymorphism is associated with renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54(11):3326-30
- 24 Katzmarzyk PT, Malina RM, Pérusse L, Rice T, Province MA, Rao DC, Bouchard C (2000) Familial Resemblance in Fatness and Fat Distribution. *Am J of Human Biology* 12(3):395-404. doi:10.1002/(SICI)1520-6300(200005/06)12:3<395

- 25 Zhao T, Zhao J, Lv J, Nzekebaloudou M (2010) Meta-analysis on the effect of the Ala54Thr polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene on body mass index. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 21(10):823-9. doi: 10.1016/j.numecd.2010.02.020
- 26 Yamada K, Yuan X, Ishiyama S et al (1997) Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. *Diabetologia* 40(6):706-10
- 27 Sipiläinen R, Uusitupa M, Heikkinen S, Rissanen A, Laakso M (1997) Variants in the human intestinal fatty acid binding protein 2 gene in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 82(8):2629-32
- 28 Takakura Y, Yoshioka K, Umekawa T, Kogure A, Toda H, Yoshikawa T, Yoshida T (2005) Thr54 allele of the FABP2 gene affects resting metabolic rate and visceral obesity. *Diabetes Res Clin Pract* 67(1):36-42
- 29 Carlsson M, Orho-Melander M, Hedenbro J, Almgren P, Groop LC (2000) The T 54 allele of the intestinal fatty acid-binding protein 2 is associated with a parental history of stroke. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8):2801-4
- 30 Kim CH, Yun SK, Byun DW, Yoo MH, Lee KU, Suh KI (2001) Codon 54 polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene is associated with increased fat oxidation and hyperinsulinemia, but not with intestinal fatty acid absorption in Korean men. *Metabolism* 50(4):473-6
- 31 Duarte NL, Colagiuri S, Palu T, Wang XL, Wilcken DE (2003) Obesity, Type II diabetes and the Ala54Thr polymorphism of fatty acid binding protein 2 in the Tongan population. *Mol Genet Metab* 79(3):183-8
- 32 Zhao T, Nzekebaloudou M, Lv J (2010) Ala54Thr polymorphism of fatty acid-binding protein 2 gene and fasting bloodlipids: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 210(2):461-6. doi: 10.1016/j
- 33 Georgopoulos A, Aras O, Tsai MY (2000) Codon-54 polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene is associated with elevation of fasting and postprandial triglyceride in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9):3155-60
- 34 Hegele RA, Wolever TM, Story JA, Connelly PW, Jenkins DJ (1997) Intestinal fatty acid-binding protein variation associated with variation in the response of plasma lipoproteins to dietary fibre. *Eur J Clin Invest* 27(10):857-62
- 35 Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R, Lottenberg AM et al (2013) Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol* 100(1Supl.3):1-40

## TABELAS

**Tabela 1.** Características antropométricas dos pacientes obesos graves de acordo com o polimorfismo no códon 54 do gene FABP-2

	<b>Toda amostra (n=89)</b>	<b>Ala54/Ala54 (n=53)</b>	<b>Ala54/Thr54 e Thr54/Thr54 (n=36)</b>	<b>P<sup>a</sup></b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	47,79 ± 8,32	47,43 ± 9,2	48,33 ± 6,9	0,623 <sup>1</sup>
<b>Peso (kg)</b>	127,65 ± 26,99	126,75 ± 29,57	128,99 ± 28,98	0,706 <sup>1</sup>
<b>CB (cm)</b>	42,7 ± 6,6	42,39 ± 7,6	43,15 ± 4,8	0,586 <sup>1</sup>
<b>CP (cm)</b>	41,16 ± 4,91	41,38 ± 4,35	40,76 ± 6,3	0,722 <sup>1</sup>
<b>IAC</b>	49,2 ± 19,38	49,04 ± 10,16	49,44 ± 8,22	0,848 <sup>1</sup>
<b>RCQ</b>	0,97 ± 0,08	0,97 ± 0,08	0,97 ± 0,09	0,820 <sup>1</sup>
<b>TMB (Kcal/dia)</b>	2156,5 ± 319,06	2142,55 ± 344,8	2177,37 ± 279,9	0,621 <sup>1</sup>

IMC: Índice de massa corporal; CB: Circunferência do braço; CP: Circunferência do pescoço; IAC: Índice de adiposidade corporal; RCQ: Razão cintura-quadril; TMB: Taxa metabólica basal. Dados descritos como média ± desvio padrão; mediana (amplitude interquartil). <sup>1</sup>Teste *t* para amostras independentes. <sup>a</sup> (diferenças entre grupos com e sem o alelo Thr)



**Tabela 2.** Análise da média do Registro Alimentar de 3 dias dos pacientes de acordo com o polimorfismo no códon 54 do gene FABP-2

	<b>Toda amostra (n=89)</b>	<b>Aala54/Ala54 (n=53)</b>	<b>Ala54/Thr54 e Thr54/Thr54 (n=36)</b>	<b>P<sup>a</sup></b>
<b>Kcal Total</b>	2692,4 ± 1097,77	2665,61 ± 1173,76	2731,81 ± 991,29	0,788 <sup>1</sup>
<b>PTN (g/dia)</b>	120,98 ± 55,3	123,26 ± 54,8	117,62 ± 56,6	0,649 <sup>1</sup>
<b>PTN (g/kg/dia)</b>	0,96 (0,26-2,5)	0,98 (0,26-1,73)	0,92 (0,32-2,5)	0,553 <sup>2</sup>
<b>CHO (g/dia)</b>	254,92 ± 160,3	351,6 ± 174,1	359,8 ± 139,8	0,820 <sup>1</sup>
<b>LIP (g/dia)</b>	100,51 (30,6-788,4)	106,0 (30,6-788,4)	92,3 (37,8-235)	0,494 <sup>2</sup>
<b>LIP TRANS</b>	0,47 (0,0-11,42)	0,61 (0,0-11,42)	0,27 (0,0-2,1)	0,278 <sup>2</sup>
<b>LIPSAT(g/dia)</b>	25,85 (7,95-71,64)	25,61 (7,95-71,64)	26,2 (9,2-69,3)	0,848 <sup>2</sup>
<b>LIPINS(g/dia)</b>	56,38 (15,01-211,1)	56,21 (18,2-211,1)	56,63 (15,01-162,4)	0,956 <sup>2</sup>
<b>LIPMONO(g/dia)</b>	32,1 (9,62-108,3)	31,86 (9,62-108,3)	32,44 (11,1-100,7)	0,899 <sup>2</sup>
<b>LIPPOLI(g/dia)</b>	24,5 (4,14-102,8)	24,38 (4,1-102,8)	24,65 (6,28-61,7)	0,936 <sup>2</sup>
<b>Ômega 3</b>	2,45 (0,42-11,76)	2,63 (0,42-11,76)	2,19 (0,44-5,21)	0,252 <sup>2</sup>
<b>Ômega 6</b>	18,95 ± 8,72	19,94 ± 9,95	18,27 ± 7,81	0,392 <sup>2</sup>
<b>ω3/ω6 (g/dia)</b>	0,13 ± 0,07	0,14 ± 0,08	0,11 ± 0,02	0,031 <sup>*</sup>
<b>Fibra(g/dia)</b>	26,46 (5,73-72,67)	26,58 (5,7-72,6)	26,28 (8,3-46,3)	0,915 <sup>2</sup>
<b>Col (mg/dia)</b>	270,94 (33,5-958,1)	280,6 (64,5-958)	256,72 (33,5-722,8)	0,518 <sup>2</sup>
<b>Ca (mg/dia)</b>	913,1 (105,8-5647)	860,68 (194,1-2773)	990,2 (105,8 –5647)	0,460 <sup>2</sup>
<b>Fe (mg/dia)</b>	18,14 (5,03-53,8)	17,87 (5,3-53,8)	18,54 (5,03-39,2)	0,737 <sup>2</sup>
<b>Zn (mg/dia)</b>	16,87 (4,65-49,9)	16,9 (4,65-49,9)	16,81 (6,28-38)	0,963 <sup>2</sup>
<b>Na (mg/dia)</b>	5133,7 (483-14750)	5012 (2776,7-14750)	5312,54 (483-13269)	0,590 <sup>2</sup>
<b>K (mg/dia)</b>	3251,8 (58-14851)	3298,62 (58-14851)	3183,1 (1594-11551)	0,812 <sup>2</sup>
<b>B12 (µg/ dia)</b>	6,66 (0,71-67,15)	7,48 (0,71 – 67,1)	5,45 (1,69 – 18,67)	0,244 <sup>2</sup>
<b>B6 (mg/dia)</b>	2,14 (0,61-5,42)	2,23 (0,61-5,42)	2,01 (0,7-5,22)	0,309 <sup>2</sup>
<b>Vit. A (µg/ dia)</b>	882,21 (84,4-9912)	1607,86 (95-9912)	889,21 (84,4-8217)	0,06 <sup>2</sup>
<b>Vit. D(µg/ dia)</b>	1,61 (0,0-33,4)	1,06 (0,0 – 8,27)	2,41 (0,0 – 33,4)	0,224 <sup>2</sup>
<b>Vit. E(mg/dia)</b>	5,78 (0,0-20,09)	5,88 (0,0-20,09)	5,62 (0-11,33)	0,727 <sup>2</sup>

Kcal Total: Valor calórico total; PTN: Proteína; CHO: Carboidrato; LIP: Lipídios; LIP TRANS: Ácidos Graxos Trans; Lipídios LIP SAT: Lipídios saturados; LIP INS: Lipídios insaturados; LIP MONO: Lipídios monoinsaturados; LIP POLI: Lipídios poliinsaturados; ω3/ ω6: Razão Ácidos Graxos Ômega 3 e Ácidos Graxos Ômega 6; Col: colesterol dietético; Ca: cálcio dietético; Fe: ferro dietético; Zn: zinco dietético; Na: sódio dietético; K: potássio dietético; B12: Vitamina B12 dietética; B6: Vitamina B6 dietética; Vit.A: vitamina A dietética; Vit. D: Vitamina D dietética; Vit. E: vitamina E dietética. <sup>1</sup>Teste *t* para amostras independentes. <sup>a</sup> (diferenças entre grupos com e sem o alelo Thr). <sup>2</sup> Teste U de Mann-Whitney. α=0,05

**Tabela 3.** Parâmetros bioquímicos dos pacientes de acordo com o polimorfismo no códon 54 do gene FABP-2

	<b>Toda Amostra (n=89)</b>	<b>Ala54/Ala54 (n=53)</b>	<b>Ala54/Thr54 e Thr54/Thr54 (n=36)</b>	<b>P<sup>a</sup></b>
<b>Col. T (mg/dL)</b>	188,29 ± 36,19	197,02 ± 34,71	175,33 ± 34,9	0,007 <sup>1*</sup>
<b>HDLc (mg/dL)</b>	41,44 ± 10,12	43,38 ± 11,14	38,57 ± 7,66	0,034 <sup>1*</sup>
<b>LDLc (mg/dL)</b>	114,42 ± 31,41	118,49 ± 30,97	108,5 ± 31,56	0,161 <sup>1</sup>
<b>TG (mg/dL)</b>	155,67 ± 69,87	167,87 ± 75,96	140,56 ± 65,57	0,055 <sup>1</sup>
<b>PCR (mg/L)</b>	12,15 (4 - 52)	11,37 (4,0-30,0)	13,35 (4,0-52,0)	0,313 <sup>2</sup>
<b>Glicose (mg/dL)</b>	123,1 ± 35,59	125 ± 35,3	120,27 ± 36,28	0,559 <sup>1</sup>
<b>Cálcio T. (mg/dL)</b>	8,9 ± 0,40	9,0 ± 0,41	8,75 ± 0,35	0,08 <sup>1</sup>
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	1,73 (0,49 - 69)	2,36 (0,49-69)	0,811 (0,51-2,6)	0,415 <sup>2</sup>
<b>A1C%</b>	6,87 ± 1,63	6,88 ± 1,52	6,85 ± 1,82	0,936 <sup>1</sup>
<b>Insulina (uU/ml)</b>	32,53 (4,55-122,1)	29,62 (9,4-97,5)	36,94 (4,5-122,1)	0,171 <sup>2</sup>
<b>T4 (ug/dL)</b>	9,23 ± 1,96	9,08 ± 2,08	9,48 ± 1,76	0,385 <sup>1</sup>
<b>T4 livre (mg/dL)</b>	1,08 ± 0,16	1,07 ± 0,15	1,11 ± 0,18	0,260 <sup>1</sup>
<b>TSH (uUI/mL)</b>	3,57 (0,12-14,98)	3,42 (0,6-10,5)	3,81 (0,1-14,9)	0,501 <sup>2</sup>

Col. T: Colesterol Total; HDLc: Colesterol HDL; LDLc: Colesterol LDL; TG: Triglicerídeos; PCR: Proteína C reativa; Cálcio T.: Cálcio sérico total. A1C%: Hemoglobina glicada. Dados descritos como média ± desvio padrão; mediana (amplitude interquartil). <sup>1</sup>Teste *t* para amostras independentes <sup>2</sup> Teste U de Mann-Whitney. a (diferenças entre grupos com e sem o alelo Thr).

**ANEXOS**

## **ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título:** Associação do Polimorfismo Ala54Thr do gene FABP-2 e de padrões de consumo alimentar ao perfil lipídico e proteína C reativa em pacientes obesos graves candidatos à cirurgia bariátrica

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa científica. A pesquisa tem por objetivo avaliar se há uma associação de alterações genéticas ao perfil lipídico e inflamatório em pacientes com obesidade grave. Além disso, pretende avaliar o consumo alimentar usual dos pacientes, através do preenchimento de questionários sobre sua alimentação e pesagem de alimentos consumidos em casa.

Você será acompanhado no Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em data previamente marcada. Serão preenchidos questionários sobre qualidade alimentar, classificação sócio-econômico e atividade física. Também serão coletados os dados antropométricos, como peso, altura, circunferência do braço, da cintura e do quadril. Você também receberá instrução para o preenchimento do recordatório alimentar de 3 dias e coleta de urina de 24h; qualquer dúvida que surgir será esclarecida. Em uma próxima consulta, coletará uma amostra de urina de 24 horas e uma amostra de 10ml de sangue. Os procedimentos descritos acima não implicam risco para a vida ou a integridade física dos participantes. Exigem apenas a dedicação para a pesagem e preenchimento dos registros alimentares e para a coleta de urina. O único desconforto previsto é o da picada da agulha para retirada do sangue, que poderá deixar mancha roxa e/ou leve dolorimento (passageiro) no local. O sangue coletado será usado para realizar os exames laboratoriais e para analisar possíveis alterações (polimorfismos) nos genes (DNA). Além disso, uma amostra de sangue será armazenada para realizar possíveis análises futuras relacionadas a outros polimorfismos associados com a obesidade, alterações metabólicas ou a fatores alimentares. No entanto, qualquer nova pesquisa com o material armazenado será aprovada pelo Comitê de Ética deste hospital.

Não haverá benefícios pessoais com os resultados, no entanto, poderemos entender melhor a etiologia da obesidade, que tem se mostrado tão importante em nosso meio. Além disso, espera-se que este estudo sirva como suporte científico para maiores investigações na área.

Você poderá desistir da pesquisa a qualquer momento, mesmo após ter começado, e isso não vai lhe trazer prejuízo à continuidade do tratamento prestado pela equipe de saúde desse hospital. Para participar da pesquisa não será necessário receber nenhum tipo de medicação e não haverá despesas pessoais, incluindo exames e consultas. Os resultados obtidos com este estudo serão usados para publicações, e lhe garantimos, que estes dados serão utilizados sem a identificação, preservando e mantendo o seu anonimato. Alertamos que não são conhecidos riscos envolvidos neste estudo.

Este documento foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa desta instituição. Uma via deste documento deve ficar com você.

Contato dos pesquisadores responsáveis por este projeto de pesquisa:

Prof. Dr<sup>o</sup> Rogério Friedman: (51) 33598127

Nutricionista Jaqueline Horvath: (51) 94159474

Acadêmica de nutrição Natália Luiza Kops: (51) 98580844

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Endocrinologia.

Rua Ramiro Barcelos 2350, prédio 12, 4º andar Bom Fim

90035-903 - Porto Alegre, RS – Brasil. Telefone: (51) 33598127

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa: Localizada no 2º andar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sala 2227. Fone/Fax: 51 3359-7640.

A minha assinatura, neste termo de consentimento informado, dará autorização aos pesquisadores envolvidos para utilizar os dados obtidos quando de fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a minha identificação. Se o (a) Sr. (a) concordar em participar deste estudo assine abaixo:

---

**Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.**

**ANEXO B – FICHA DE 1ª CONSULTA****FICHA DE 1ª CONSULTA**

Data preenchimento ficha: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

END: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Fone(s): \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) F ( ) M

Escolaridade: \_\_\_\_\_ Escolaridade (anos): \_\_\_\_\_

Atualmente você está trabalhando? ( ) Sim ( ) Não \* Se SIM, qual é o seu trabalho? \_\_\_\_\_

Quais são as suas atividades diárias? \_\_\_\_\_

Dentre as opções qual você enquadra: ( ) Branco ( ) Preto ( ) Mulato ( ) Oriental ( ) Índio ( ) Outros

Classificação Econômica: ( ) A1 ( ) A2 ( ) B1 ( ) B2 ( ) C ( ) D ( ) E

Tabagismo: ( ) Nunca fumou ( ) Sou fumante há \_\_\_\_\_ anos, e fumo em média \_\_\_\_\_ cigarros por dia.

( ) Sou ex-fumante. Parei de fumar há \_\_\_\_\_ meses/anos, fumei por \_\_\_\_\_ anos, em média \_\_\_\_\_ cigarros/dia.

Acompanhamento clínico: \_\_\_\_\_

Contato médico assistente? \_\_\_\_\_

Diagnósticos Prévios: \_\_\_\_\_

Medicação em uso: \_\_\_\_\_

História de medicações anorexígenas: ( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

História de dietas prévias: ( ) Sim ( ) Não Orientadas? \_\_\_\_\_

Hábito Intestinal: \_\_\_\_\_ Consumo de água: \_\_\_\_\_

**AVALIAÇÕES ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA**Peso (kg) = \_\_\_\_\_ Altura (cm) = \_\_\_\_\_ IMC (kg/m<sup>2</sup>) = \_\_\_\_\_ Circ. Braço (cm) = \_\_\_\_\_

Cintura (cm) = \_\_\_\_\_ Quadril (cm) = \_\_\_\_\_

Pressão Arterial (mmHg): \_\_\_/\_\_\_ - \_\_\_/\_\_\_ - \_\_\_/\_\_\_ FC (bpm) = \_\_\_\_\_

Pressão Arterial-Média (mmHg): \_\_\_/\_\_\_

**ANEXO C - REGISTRO ALIMENTAR**

REGISTRO ALIMENTAR		
Nome:		Data:
Dia da semana: ( ) segunda ( ) terça ( ) quarta ( ) quinta ( ) sexta ( ) sábado ( ) domingo		
	NOME DO ALIMENTO	MEDIDA CASEIRA (Quantidade)
CAFÉ DA MANHÃ		
COLAÇÃO		
ALMOÇO		
LANCHE DA TARDE		
JANTAR		
CEIA		
Observações:		

## ANEXO D – QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA

### QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA – VERSÃO CURTA (CELAFICS)

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na ÚLTIMA semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo.

Para responder as questões lembre que:

- Atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal;
- Atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza por pelo menos 10 minutos contínuos de cada vez:

1a) Em quantos dias da última semana você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

Dias \_\_\_\_ por SEMANA      ( ) Nenhum

1b) Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando por dia?

Horas: \_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_

2a) Em quantos dias da última semana, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA)

Dias \_\_\_\_ por SEMANA      ( ) Nenhum

2b) Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

Horas: \_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_

3a) Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração.

Dias \_\_\_\_ por SEMANA      ( ) Nenhum

3b) Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

Horas: \_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_



## **ANEXO E – NORMAS DA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION**

### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### **Online Submission**

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **Title Page**

The title page should include: The name(s) of the author(s); A concise and informative title; The affiliation(s) and address(es) of the author(s); The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

### **Abstract**

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections: Purpose (stating the main purposes and research question), Methods, Results, Conclusions

### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes

### **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### **Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### **Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

### **Citation**

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### **Reference list**

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. The entries in the list should be numbered consecutively.

#### Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

### **Ethical standards**

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have

therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

### **Conflict of interest**

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest