

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Silvia Valim de Melo

**Avaliação da Influência de
Polimorfismos nos Genes dos
Receptores de Sabor *TAS1R2* e
TAS1R3 na Ingestão Alimentar e
Parâmetros Antropométricos de
Crianças.**

**Porto Alegre
2013**

Sílvia Valim de Melo

Avaliação da Influência de Polimorfismos nos Genes dos Receptores de Sabor TAS1R2 e TAS1R3 na Ingestão Alimentar e Parâmetros Antropométricos de Crianças.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvana de Almeida

**Porto Alegre
2013**

RESUMO

A prevalência mundial da obesidade infantil vem apresentando um rápido aumento nas últimas décadas, tendo dobrado de 1980 até os dias atuais, e sendo caracterizada como uma verdadeira epidemia mundial. O componente genético desempenha um papel importante na regulação do balanço energético e diferenças interindividuais do IMC podem ser explicadas por fatores genéticos. A percepção do sabor pode ser uma regra-chave na determinação da preferência por alimentos e hábitos alimentares e diferenças individuais na percepção dos sabores (doce, amargo, salgado, ácido e *umami*), interferindo no estado nutricional e no risco de doenças relacionadas a esse estado. Desta forma, a compreensão da heterogeneidade de fatores causais da obesidade pode auxiliar na escolha de tratamentos e medidas preventivas individualizadas. Considerando que os polimorfismos rs35874116 no gene *TAS1R2*, e rs35744813 no gene *TAS1R3* podem determinar diferenças na transcrição e na expressão dos receptores de sabor é possível que eles determinem diferenças de sensibilidade aos sabores doce e *umami*. Dessa forma, este estudo se propôs investigar a associação desses polimorfismos nos genes *TAS1R2* e *TAS1R3* com padrão de ingestão alimentar e parâmetros de adiposidade em crianças em três fases do desenvolvimento, um ano, aos três a quatro anos (325) e aos sete a oito anos de idade (353). Os polimorfismos foram analisados em equipamento de automação laboratorial pela metodologia de discriminação alélica Taq Man[®]. As variáveis foram comparadas entre os grupos por General Linear Model, por ANOVA, pelo teste U de Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis. As frequências genótípicas encontradas estão de acordo com estudos prévios e em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi observada nas crianças de um ano de idade que a presença do alelo A no polimorfismo rs35744813 no gene *TAS1R3* estava associado com a maior ingestão diária média de energia quando comparado com os homozigotos G/G ($p=0.037$). Observou-se aumento na ingestão de alimentos com alta densidade de açúcares em portadores do alelo T no polimorfismo rs37874116 no gene *TAS1R2* quando comparado com homozigotos C/C ($p=0,047$). E em crianças de sete a oito anos de idade, o polimorfismo rs37874116 no gene *TAS1R2* foi

associado à variação no IMC entre um e sete a oito anos de idade, as crianças homozigotos C/C ganharam mais peso que as portadoras do alelo T($p=0.009$).

Em crianças de 3 a 4 anos não houve diferenças significativas nas variáveis antropométricas para ambos os polimorfismos em genes *TAS1R3* e *TAS1R2*. As descobertas deste estudo são relevantes, principalmente por avaliarem o consumo alimentar e estado nutricional em diferentes fases da infância e a sua correlação com as variações genéticas em genes de receptores de sabor, isso pode abrir novas perspectivas para pesquisadores e colaborar com o estudo da obesidade infantil.

Palavras chave: Doce. Obesidade. Percepção Gustatória. Polimorfismo Genético. Variação Genética.

ABSTRACT

The worldwide prevalence of childhood obesity has shown a rapid increase in recent decades, doubling from 1980 to the present day, and is characterized as a global epidemic. The genetic component performs an important role in the regulation of energy balance and interindividual differences in BMI can be explained by genetic factors. Taste perception plays a key role in determining individual food preferences, and dietary habits and individual differences in the perception of flavors (sweet, bitter, salty, sour and umami), interfering with the nutritional status and the risk of diseases related to status. Thus, understanding the heterogeneity of causal factors of obesity may help in choosing individualized treatments and preventive measures. Considering that rs35874116 *TAS1R2* and, rs35744813 *TAS1R3* polymorphisms gene may lead to differences in the transcription and expression of taste receptors is possible that they determine differences in sensitivity to sweet and umami flavors. Thus, this study aimed to investigate the association of these polymorphisms in genes *TAS1R2* and *TAS1R3* with standard food intake and parameters adiposity in children at three different development phases: one year to three-to-four years (325) and seven-to-eight years (353). The polymorphisms were analyzed in laboratory automation equipment for the methodology of Taq Man[®] allelic discrimination. Variables were compared between groups by General Linear Model, by ANOVA, the U Mann-Whitney or Kruskal-Wallis. The genotypic frequencies found are consistent with previous studies and in Hardy-Weinberg equilibrium. Was observed in children at one year old, the *TAS1R3* rs35744813 *A allele presence were associated with higher average energy intake daily

when compared to the homozygous G/G ($p=0.037$). We observed an increased intake of Sugar density foods in *TAS1R2* rs37874116*T allele carriers when compared to C/C homozygotes ($p=0.047$). And in children at seven-to-eight years old, the *TAS1R2* rs37874116 polymorphism was associated with one from seven-to-eight years BMI variation percentage, children C/C homozygotes gained more weight than the *T allele carriers ($p=0.009$). In children at 3 to 4 years old there were no significant differences in anthropometric variables for both the polymorphisms in *TAS1R3* and *TAS1R2* genes. The findings of this study are relevant, mainly that evaluable association food intake and nutritional status at different stages of childhood with of genetic variations in taste receptor genes, this may open new perspectives to researchers and collaborate with the study of childhood obesity.

Key words: Genetic polymorphism. Genetic Variation. Obesity. Taste Perception. Sweet.

Agradecimento especial aos meus pais pela valorização da educação e incentivo aos estudos desde criança.

Agradecimentos à Professora Silvana Almeida pela oportunidade de aprendizado e compartilhamento de ideias durante esse estudo e aos demais membros da equipe de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pela parceria e colaboração.

Agradecimento às agências de fomento CNPq, FAPERGS e PRONEX pela possibilidade de realizar este estudo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	<u>99</u>
1.1 Obesidade.....	<u>99</u>
1.2 Genética e Obesidade	<u>111</u>
1.2.1 Determinantes da Ingestão Alimentar	<u>111</u>
1.2.2 Percepção dos sabores	<u>131</u>
1.2.3 Genética da percepção dos sabores.....	<u>131</u>
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<u>161</u>
3 JUSTIFICATIVA.....	<u>202</u>
4 OBJETIVO	<u>212</u>
4.1 Objetivos específicos	<u>212</u>
5 ARTIGO ORIGINAL	<u>222</u>
5.1 Título do artigo	<u>222</u>
<i>Evaluation of Genetic Variants of Taste Receptors T1R2 and T1R3 on Food Intake and Nutritional Status in Children.</i>	<u>222</u>
6 CONCLUSÃO.....	<u>424</u>
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética	<u>474</u>
ANEXO B – Normas da revista <i>Chemical Senses</i>.....	<u>484</u>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade infantil

A prevalência mundial da obesidade infantil vem apresentando um rápido aumento nas últimas décadas, tendo dobrado de 1980 até os dias atuais, e sendo caracterizada como uma verdadeira epidemia mundial e um dos grandes problemas de saúde pública deste século (OLIVEIRA e FISBERG, 2003; ALLISON et al., 2008; WHO, 2012). Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), estima-se que no mundo 40 milhões de crianças abaixo de cinco anos estejam na categoria de sobrepeso – conforme protocolo do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional são considerados com sobrepeso crianças com percentil > 97 e escore – Z do IMC (índice de massa corporal) $+2$ (BRASIL, 2008). Desde o primeiro *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) em 1971 a 1974 para o NHANES 2003 a 2006 a obesidade infantil cresceu de 5% para 12% nas idades de 2 a 5 anos, de 4 para 17% de 6 a 11 anos e de 6,1% para 17,6% entre os adolescentes até 19 anos. Mais de 30% das crianças norte americanas entre 2 a 19 anos estão acima do peso (RADOMINSKI, 2011).

No Brasil, conforme a Pesquisa sobre Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 (BRASIL, 2009) realizada pelo IBGE em parceria com o Ministério da Saúde mostrou que a obesidade e o sobrepeso têm aumentado rapidamente nos últimos anos. O aumento é mais evidente na faixa etária dos 5 a 9 anos. Em 2008, 34,8% dos meninos e 32% das meninas estavam com sobrepeso e 16,6 e 11,8% respectivamente, estavam obesos. Os maiores índices foram observados nas áreas urbanas, onde obesidade cresceu em média 20%, e nas classes de maior rendimento, passando de 25,8% para 46,2%. No entanto, os pesquisadores reportaram o grande aumento da frequência de excesso de peso nas crianças da população de menor renda, onde o percentual triplicou de 8,9% para 26,5% evidenciando uma transição nutricional.

Esses dados são preocupantes, pois a obesidade é um problema de saúde pública, elevando em pouco tempo os custos sócio-econômicos. Uma criança obesa tem risco muito maior de se tornar um adulto obeso e 80% dos

adolescentes obesos permanecem com excesso de peso quando adultos, além disso, as complicações da obesidade, que antes só apareciam tardiamente estão ocorrendo cada vez mais cedo (GUO e CHUMLEA, 1999; AMEMIYA et al., 2007). Há associação entre a obesidade e as alterações metabólicas, como a dislipidemia, a hipertensão e a intolerância à glicose, considerados fatores de risco para o diabetes melitus tipo 2 e as doenças cardiovasculares, atualmente já podem ser observadas frequentemente na faixa etária mais jovem (STYNE, 2001; BRAY, 2004).

As complicações ocasionadas pela obesidade em crianças e adolescentes podem determinar a morte mais precoce, conforme resultados do estudo realizado nos EUA, o qual demonstrou associação entre a morte prematura com obesidade, alterações metabólicas e hipertensão arterial (FRANKS et al., 2010). Há previsão de que, se o avanço da obesidade infantil permanecer nos índices atuais, as doenças cardiovasculares aumentarão em mais de 30% nos próximos 15 anos (BIBBINS-DOMINGO et al., 2007). Além das doenças metabólicas, as crianças obesas sofrem de outros males como asma, apneia do sono, falta de ar, complicações ortopédicas, puberdade precoce e síndrome de ovários policísticos (RADOMINSKI, 2011). Também estão relacionados à obesidade problemas sociais como, estigmatização, *bullying*, baixa autoestima e redução da qualidade de vida (ALLISON et al., 2008; EISENBERG e NEUMARK-SZTAINER, 2008; McLAREN, 2007).

Vários estudos têm sido realizados no Brasil demonstrando a associação entre o sobrepeso e a obesidade na infância com as modificações no padrão de dieta e atividade física (RADOMINSKI, 2011). Apesar de a obesidade ser o resultado final do desequilíbrio entre a ingestão e o gasto calóricos, outros fatores podem estar associados a sua causa embora a dimensão do efeito seja difícil estimar, como o diabetes e o tabagismo materno, o tamanho e crescimento infantil rápido, a não amamentação ou pouco tempo de amamentação, a duração curta do sono, a atividade física diária <30 min, o consumo de bebidas adoçadas com açúcar e assistir televisão por períodos prolongados. É difícil estabelecer uma associação causal entre possíveis determinantes e obesidade, bem como a importância relativa de cada determinante (MONASTA et al., 2010).

1.2 Genética e Obesidade

O componente genético desempenha um papel importante na regulação do balanço energético (BRAY, 2006), estima-se que entre 20 a 90% das diferenças interindividuais do IMC possam ser explicadas por fatores genéticos (LILLYCROP e BURDGE, 2010; MAES et al., 1997;). Além disso, a herdabilidade estimada na identificação de fatores inter-relacionados, como distribuição do tecido adiposo, síntese e degradação de lipídios, gasto energético, preferências alimentares, fome e saciedade é de 30% a 40% (HEBE BRAND et al., 2001; ROSENBAUM et al., 1997).

Alguns estudos recentes confirmam a herdabilidade como um componente importante na gênese da obesidade infantil. Quando os pais são magros a prevalência da obesidade infantil é de aproximadamente 5 a 6%, quando o pai tem $IMC > 30Kg/m^2$ esta prevalência é de 15 a 16%, quando a mãe é obesa a prevalência é de 24% e quando ambos são obesos a prevalência sobe para 45% (DEMERATH et al., 2007; GRIFFITHS et al., 2007).

1.2.1 Determinantes da Ingestão Alimentar

Segundo Reed e Knaapila (2010) comer pode ser perigoso, pois além de nutrientes os alimentos podem conter parasitas, bactérias ou produtos químicos. Por isso nosso paladar e olfato evoluíram para orientar a seleção de alimentos e nos alertar para o gosto amargo de venenos e o gosto azedo de alimentos estragados, por exemplo. Estes sistemas sensoriais ajudaram os seres humanos a comerem defensivamente e prevenir a ingestão de alimentos que são prejudiciais. No entanto, atualmente a escolha dos alimentos que serão ingeridos é menos influenciada para evitar os males descritos anteriormente, do que é influenciada pela busca do prazer ocasionado por alguns alimentos, como ocorre com a ingestão de alimentos gordurosos e doces. Porém, nem todos os indivíduos são igualmente capazes de perceber toxinas em alimentos ou apresentam grande motivação para a ingestão de alimentos com alto teor de gordura e açúcares. O que para algumas pessoas pode ser considerado palatável, para outros pode ser repulsivo. Essas

diferenças são uma questão de paladar, tanto no sentido biológico quanto uma opinião individual influenciada por aspectos culturais, de desenvolvimento e medicinais (COUNIHAN e ESTERIK, 2008; MENNELLA et al., 2005).

Entender os genes e as diferenças genéticas que influenciam na ingestão de alimentos podem trazer avanços no tratamento e prevenção da obesidade, permitindo que os cuidadores possam adequar as recomendações dietéticas ao perfil quimiosensorial de cada pessoa. Estudos genéticos em seres humanos e animais experimentais sugerem fortemente que a percepção ao açúcar e a gordura é dependente de características individuais determinadas pela genética, da mesma maneira que, a capacidade de detectar o sabor amargo e maus odores de comida deteriorada são altamente variáveis entre os indivíduos (REED e KNAAPILA, 2010).

A percepção do sabor pode ser uma regra-chave na determinação da preferência por alimentos e hábitos alimentares (GARCIA-BAILO et al., 2009). Diferenças individuais na percepção dos sabores (doce, amargo, salgado, ácido e *umami*¹) podem influenciar esses hábitos, interferindo no estado nutricional e no risco de doenças relacionadas a esse estado. As preferências alimentares dos indivíduos são baseadas em fatores fisiológicos, nutricionais, e também econômicos e socioculturais. Entretanto, a qualidade sensorial do alimento é crítica na escolha da dieta, e o sabor pode ser o maior determinante dessas escolhas (GARCIA-BAILO et al., 2009; LETERNE et al., 2008). Até mesmo recém-nascidos demonstram preferência por soluções doces em testes de degustação, ingerindo-as mais do que água (MALLER e TURNER, 1973).

Muito antes de se conhecer a identidade dos receptores do sabor os seres humanos descobriram métodos para alterar a percepção do doce. Conforme Bartoshuk (1974) o uso de frutas que transformam o sabor ácido em doce ou o uso do chá de *Gymnema Sylvestre* para tornar o gosto do açúcar insípido e inibir a ingestão de alimentos doces, é relatado por povos do Sul da Índia e África e datam de muito tempo (BARTOSHUK, 1974). Atualmente a ativação do receptor doce provoca um prazer que leva os indivíduos a gastarem aproximadamente 70 bilhões de dólares em refrigerantes, somente

¹Palavra de origem japonesa usada para descrever saboroso, delicioso. A principal substância relacionada a esse sabor é o L-glutamato, um aminoácido frequentemente encontrado nos alimentos como glutamato monossódico (SHIGEMURA et al 2009).

nos Estados Unidos (REED e MARGOLSKEE, 2010). A percepção do paladar doce é, portanto fonte tanto do prazer como de terríveis problemas de saúde pública.

1.2.2 Percepção dos sabores

A percepção do sabor ocorre quando moléculas químicas do alimento reagem com células receptoras do sabor (TRCs), que possuem em sua superfície prolongamentos finos como pelos, as microvilosidades. O sistema gustativo em mamíferos inclui TRCs organizadas em botões gustativos (poro gustativo, células gustativas, células basais, ligadas a axônios gustativos aferentes) dentro de papilas gustativas (GYTON, 1981). A maioria das papilas gustativas pertence a três tipos, fungiformes, filiares e valadas e estão localizadas na língua. Há também um número considerável de papilas gustativas no palato, orofaringe, laringe, epiglote, e parte superior do esôfago. As extremidades apicais das TRCs são expostas à cavidade oral e interagem com os estímulos de sabor, usualmente solúveis em água, os produtos químicos. Esta interação gera sinais que são transmitidos para o cérebro através de nervos cranianos (BACHMANOV e BEAUCHAMP, 2007).

O sabor doce, diferentemente do sabor amargo, é percebido pelos seres humanos como prazeroso, possivelmente reflexo de pressões evolutivas na seleção de alimentos com alto teor energético (HLADIK et al., 2002). Já está estabelecido que substâncias doces induzem uma fase de reflexos cefálicos e, consequentemente, os receptores do sabor doce, presentes na língua e no palato, podem ser importantes no início da resposta metabólica de pré-absorção ao consumo de alimentos (ZAFRA et al., 2006). Embora considerada uma característica inata, diferenças interindividuais na percepção do sabor doce têm sua existência conhecida há muito tempo, e as variações em genes candidatos podem contribuir para essas diferenças (BLAKEESLE e SALMON, 1935).

1.2.3 Genética da percepção dos sabores

Os estudos sobre a genética da percepção dos sabores iniciaram por Fuller em 1974, com a identificação do *Sac locus* (loco da sacarina), e vêm

evoluindo desde então. Atualmente são conhecidas a família de receptores do sabor T2R, associada ao sabor amargo, e uma pequena família T1R, associada à percepção dos sabores doce e *umami* (NELSON et al., 2001; ZHAO et al., 2003). A família de receptores T1R é formada pelos receptores T1R1, T1R2 e T1R3, os quais são acoplados a uma proteína G heterodimérica (HOOM et al., 1999; ZHAO et al., 2003). Os T1R combinam-se para gerar complexos de receptores heterodiméricos: T1R1-T1R3 sensível aos L-aminoácidos (percepção do sabor *umami*) e T1R2-T1R3 sensível a diversas moléculas de açúcares naturais e também adoçantes artificiais (percepção do sabor doce) (ZHAO et al., 2003). O complexo de receptores do doce T1R2-T1R3 é codificado, respectivamente, pelos genes *TAS1R2* e *TAS1R3*, localizados no cromossomo 1 (LIAO e SCHULTZ., 2003; FUSHAN et al., 2009). Embora os genes T1R sejam expressos em vários órgãos internos, os principais locais de expressão são as células gustativas (BACHMANOV et al, 2011).

Existem também evidências, a partir de estudos em camundongos, de que a percepção do sabor doce pode não estar limitada apenas aos mecanismos mediados pelos receptores T1R, pois o transportador de glicose 4 (GLUT4), o co-transportador sódio-glicose (SGLT1) e os ATP-*gated* K⁺ (canais KATP) são sensores metabólicos que estão presentes em células que expressam T1R3 e podem servir como mediadores do sabor doce T1R-independente (YEE et al., 2011). Naim et al. (2002) descreveram que alguns compostos com sabor doce podem penetrar a membrana de TRCs e agir em alvos intracelulares, e neste caso podem funcionar como receptores intracelulares de tais compostos.

O gene *TAS1R2* que codifica o receptor T1R2 é caracterizado por alta diversidade, a qual provavelmente resulta de vantagem seletiva mais do que de deriva genética natural. Embora altamente polimórfico, muitas variantes nesse gene ocorrem com frequência menor do que 1% na população ou são mutações sinônimas (KIM et al., 2006). No entanto, o polimorfismo rs35874116 (Ile191Val) ocasiona a alteração de uma isoleucina por uma valina na posição 191 da proteína, em um suposto domínio de ligação ao ligante, e o alelo menos frequente possui frequência superior a 10% em diversas etnias. Eny et al. (2010) descreveram uma associação entre esse polimorfismo e a ingestão de

açúcar em indivíduos com IMC maior que 25. Nesse estudo ficou evidente que a variação genética do *TAS1R2* afeta o consumo habitual de açúcares e pode contribuir para diferenças interindividuais em resposta ao aconselhamento dietético, além de contribuir para mudança de comportamento ao adotar um novo estilo de vida.

O gene *TAS1R3* codifica a subunidade T1R3 comum para ambos complexos de receptores do doce e *umami* (KIM et al., 2006). No estudo de Fushan et al. (2009), foi investigada a associação de polimorfismos nos genes *TAS1R2* e *TAS1R3* com a capacidade de 144 indivíduos em detectar várias concentrações de soluções de açúcar. Os autores identificaram *in vitro* variações no promotor que resultaram em menores quantidades de mRNA do *TAS1R3*, o polimorfismo de único nucleotídeo, *Single nucleotide polymorphism* (SNP) rs307355, localizado na posição -1572 C/T, e o SNP rs35744813, localizado na posição -1266 C/T, à jusante da sequência codificante do gene, os quais estão em forte desequilíbrio de ligação. Entretanto, o estudo foi realizado em células derivadas do duto biliar que expressam endogenamente o *TAS1R3*, é possível que as proteínas que interagem com a região promotora possam ser bastante diferentes em células gustativas, causando efeitos na mediação do *TAS1R3*. Os mesmos autores também sugeriram que estes polimorfismos explicariam 16% de variação da sensibilidade aos sabores doce e *umami* na população investigada. Naquele estudo, os indivíduos portadores do alelo T, para ambos os polimorfismos, apresentaram redução da percepção à sacarose comparada aos homozigotos C/C.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alisson DB, Downey M, Atkinson RL, Billington CJ, Bray GA, Eckel RH, et al. Obesity as a disease: A white paper on evidence and arguments commissioned by the council of the obesity society. *Obesity*. 2008. 16: 1161-1177.
- Amemiya S, Dobaski K, Urakami T. Metabolic syndrome in youths. *Pediatrics Diabetes*. 2007; 8: 48-54.
- Bachmanov AA, Beauchamp GK. Taste receptor genes. *Annu Rev Nutr*. 2007; 27: 389-414.
- Bachmanov AA, Bosak NP, Floriano WB, Inoue, M; Li X, Lin C, et al. Genetics of sweet taste preferences. *Flavour Fragr J*. 2011. 26(4): 286-294.
- Bartoshuk LM. Taste Illusions: some demonstrations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1974. 237: 279-285.
- Blakeslee AF, Salmon TN. Genetics of sensory thresholds: individual taste reactions for different substances. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1935; 21: 84-90.
- Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L. Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2007. 362: 485-93.
- Bray GA. Medical consequences of Obesity. *J Clin Endocrinol & Metabol*. 2004. 89 (6): 2483-2589.
- Bray GA. Obesity: the disease. *J Med Chem*. 2006. 49: 4001–4007.
- Brasil, Ministério da Saúde – Protocolo do SISVAN por fase de vida. 2008. Disponível em <http://www.fag.edu.br/sisvan.pdf>. Acessado em 13/12/2012
- Brasil, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE – Pesquisa do Orçamento Familiar. 2008-2009. Disponível em www.ibge.gov.br. Acessado em 13/12/2012
- Counihan C, Van Esterik P. Food and culture: a reader. 2nd edit. Routledge. New York. 2008
- Demerath EW, Choh AC, Czeiwinski SA., et al. Genetic and environmental influences on infant weight and weight Change: The best fels longitudinal study. *American Journal Human Biology*. 2007. 19:692-702.
- Eisenberg M, Neumark-Sztainer D. Peer harassment and disorderer eating. *Int J Adolescent Med Health*. 2008; 20 (2): 155-165.

Eny KM, Wolever TM, Corey PN, Sohemy, AE. Genetic variation in *TAS1R2* (ILE191Val) is associate with consumption of sugars in overweight and obese individuals in 2 distinct populations. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92: 1501-1510.

Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*. 2007; 298: 2028–2037.

Fushan AA, Simons CT, Slack JP, Manichaikul A, Drayna D. Allelic polymorphism within the *TAS1R3* promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Curr Biol*. 2009. 19 (15); 1288-1293.

Franks PW, Hanson LR, Knowler WC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors and premature death. *N Engl J Med*. 2010; 362:485-493

Garcia-Bailo B, Toguri C, Eny KM, El-Sohemy A. Genetic variation in taste and its influence on food selection. *A J Integr Bio*. 2009. 13 (1): 69-80.

Griffiths LJ, Dezateux C, Cole TJ. Differential parental weight and height contributions to offspring birth weight and weight gain in infancy. *Int J Epidemiol*. 2007; 36:104-107.

Guyton AC. *Fisiologia Humana*. 5ª ed., Rio de Janeiro, Ed. Interamericana, 1981

Guo SS and Chumlea WC. Tracking of body mass index in children in relation to overweight in adulthood. *Am J Clin Nutr* 1999. 70(suppl):145S–8S.

Hladik CM, Pasquet P, Simmen B. New perspectives on taste and primate evolution: dichotomy in gustatory coding for perspection of beneficent versus noxious substances as supported by correlation among human theresholds. *Am J Phys Anthropol*. 2002; 117: 342-348.

Hebebrand J, Sommerlad C, Geller F, Görg T, Hinney A. The genetics of obesity: practical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; 25 (suppl 1): S10–S18.

Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJP, Zuker CS. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*. 1999; 96: 541-551.

Institute of Medicine. Reporter brief. Bridging the Evidence Gap in Obesity Prevention: A Framework to Inform Decision Making. ngton, DC. 2010. Disponível em <<http://www.iom.edu/Reports/2010/Bridging-the-Evidence-Gap-in-Obesity.aspx>> Acessado em 14 novembro de 2010.

Kim UK, Wooding S, Riaz N, Jorde LB, Drayna D. Variation in the human *TAS1R* taste receptors genes. *Chem Senses*. 2006; 31: 599-611.

Leterne A, Brum L, Dittmar A, Robin O. Autonomic nervous system responses to sweet taste: evidence for habituation rather than pleasure. *Physiol Behav.* 2008. Mar 18; 93(4-5): 994-999.

Liao J, Schultz PG. Three sweet receptors genes are clustered in human Chromosome. *Mamm Genome.* 2003; 14: 291-301.

Lillicrop KA, Burdge GC. Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. *Int J Obes.* 2010. 1-12.

Maes HH, Neale MC, Eaves, L.J. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet.* 1997; 27: 325–351.

Malland JD, Matsunami H. Taste perception: how sweet it is (to be described by you). *Curr Biol.* 2009; 19 (15): R655-R656.

Maller O, Turner RE. Taste in acceptance of sugars by human infants. *J Comp Physiol Psychol.* 1973; 84: 496-501.

McLaren L. Socioeconomic status and obesity. *Epidemiol Rev.* 2007; 29: 29–48.

Mennella JA, Pepino MY, Reed DR. Genetic and environmental determinants of bitter perception and sweet preferences. *Pediatrics.* 2005. 115: e 216-22.

Monasta L, Batty GD, Cattaneo A. Early -life determinants of overweight and obesity: a review of systematic reviews. *Obes Rev.* 2010;1:1-15.

Naim M, Nir S, Spielman AI, Noble AC, Peri I, Rodin S, Samuelov-Zubare M. Hypothesis of receptor dependent and receptor-independent mechanisms for bitter and sweet taste transduction: implications for slow taste onset and lingering aftertaste. In *Chemistry of Taste: Mechanisms, Behaviors, and Mimics*, ACS symposium series 825. Given, P.; Parades,D., editors. American Chemical Society; Washington, DC: 2002.

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJP, Zucker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell.* 2001;106: 381-390.

Nie Y, Vignes S, Hobbs JR, Conn GL, Munger SD. Distinct Contributions of T1R2 e T1R3 Taste Receptor Subunits to the Detection of Sweet Stimuli. *Curr Biol.* 2005.15: 1948-1952

Oliveira CL, Fisberg M. Obesidade na infância e adolescência – Uma verdadeira epidemia. *Arq Bras Endocrinonol Metab.* 2003; 47:107-108.

Radominski RB. Aspectos epidemiológicos da obesidade infantil. *Revista da ABESO.* 2011. Edição 49, ano XI, nº49.

Reed DR, Knaapila A. Genetics of taste and smell: poisons and pleasures. *Prog Mol Biol Transl*. 2010. 94: 213-240.

Reed DR, Margolskee RF. Gustation Genetics: Sweet gustducin. *Chem Senses*. 2010; 35: 549-550

Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J. Obesity. *N Engl J Med*. 1997; 337: 396–407

Spiegel A, Nabel E, Volkow N, Landis S, Kai Li T. Obesity on the brain. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 552–553.

Styne DM. Childhood and adolescent obesity. Prevalence and significance. *Pediatr Clin North Am*. 2001; 48(4):823-854.

World Health Organization. Regional office for Europe. Obesity. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/diseases-and-conditions/obesity>. Acessado em: 12 dezembro de 2010.

Yee KK, Sukumaran SK, Kotha R, Gilbertson TA, Margolskee RF. Glucose Transporters and ATP-gated K^+ (K_{ATP}) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1R3)-expressing taste cells. *PNAS*. 2011. 108 (13): 5431-5436

Zafra MA, Molina F, Puerto A. The neural cephalic phase reflexes in the physiology of nutrition. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006; 30: 1032-1044.

Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJP and Zucker CS. The receptors of mammalian sweet and umami taste. *Cell*. 2003. 115:255-266.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que a prevalência da obesidade infantil tem aumentado nas últimas décadas (OLIVEIRA e FISBERG, 2003; INSTITUTE of MEDICINE, 2010) e que as estimativas de herdabilidade para a obesidade são altas, a identificação de fatores genéticos que influenciam na obesidade e de suas consequências para a saúde é de alta importância (SPIEGEL et al., 2005). Embora a obesidade ainda seja considerada uma doença única, ela é o fenótipo que pode ser consequência de diversas alterações fisiológicas e fator predisponente para diversas doenças (BRAY, 2004; FLEGAL et al., 2007). Desta forma, a compreensão da heterogeneidade de fatores causais pode auxiliar na escolha de tratamentos e medidas preventivas individualizadas.

Considerando também que os polimorfismos rs35874116 no gene TAS1R2, e rs35744813 no gene TAS1R3 determinam diferenças na transcrição e na expressão dos receptores de sabor (FUSHAN et al., 2009; ENY et al., 2010), eles podem determinar diferenças de sensibilidade aos sabores doce e umami. Dessa forma, o estudo da associação dos referidos polimorfismos com ingestão alimentar e parâmetros antropométricos é promissor, pois poderá auxiliar na compreensão da heterogeneidade da gênese da obesidade. Além disso, Eny et al. (2009) já sugeriram que essas variações genéticas podem influenciar no sucesso ou a na falha da mudança de comportamento de ingestão alimentar, em resposta ao aconselhamento, e podem contribuir para as diferenças interindividuais ao adotar um novo estilo de vida. Adicionalmente, sabe-se que as pesquisas sobre associações de variações genéticas dos receptores de sabores com padrão de ingestão alimentar e parâmetros antropométricos são ainda reduzidas, o que abre possibilidades de estudos ao pesquisador.

4 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é investigar a associação de polimorfismos nos genes *TAS1R2* e *TAS1R3* com padrão de ingestão alimentar e parâmetros de adiposidade em crianças em três fases do desenvolvimento: um ano, aos de três a quatro anos e aos sete a oitos anos de idade.

4.1 Objetivos específicos

- Determinar a frequência dos polimorfismos rs35874116 do gene *TAS1R2*, e rs35744813 do gene *TAS1R3* em uma amostra de crianças.
- Investigar se os polimorfismos previamente descritos estão associados às diferenças na ingestão alimentar nas dietas cotidianas dessas crianças.
- Investigar a associação entre polimorfismos e medidas antropométricas em crianças.

5 ARTIGO ORIGINAL

5.1 Título do artigo

Evaluation of Genetic Variants of Taste Receptors T1R2 and T1R3 on Food Intake and Nutritional Status in Children.

Este artigo será encaminhado na forma de *short communication* à revista *Chemical Senses* publicada pela *Oxford University Press*.

6 CONCLUSÃO

Analisando a evolução observou-se que as variações não foram apenas uma deriva genética neutra e sugerem que podem ter um papel na função do receptor (KIM et al., 2006). Então qual seria a vantagem seletiva de uma mudança na percepção do sabor? No estudo de Fushan et al. (2009) a variação étnica poderia ser uma pista, pois os alelos T associados com a diminuição da sensibilidade à sacarose são mais comuns na população sub-saarianos, enquanto o alelo C é a variante mais importante em todas as regiões geográficas, com exceção da África. Os autores sugerem que, em climas tropicais, onde as fontes de açúcar são mais abundantes, a capacidade para saborear uma pequena quantidade de açúcar era menos importante do que em climas frios, onde as fontes de açúcar são mais escassas (FUSHAN et al, 2009; MAILAND e MATSUNAMI, 2009). Outro aspecto importante dos achados de Fushan é que as alterações na região promotora foram encontradas no gene *TAS1R3*, que desempenha papel duplo codificando também uma subunidade do receptor *umami*. Já o gene *TAS1R2* é identificado apenas com a formação do complexo receptor doce, isto poderia levantar a hipótese de que as mesmas alterações que afetam a percepção do doce, também poderiam afetar a percepção *umami*.

Nos estudos de Bachmanov et al. (2011) com camundongos, foram observados que uma parte significativa da variação na preferencia por adoçantes depende de genes que não estão envolvidos no processo periférico de percepção do sabor doce, mas também de genes envolvidos nos mecanismos centrais de processamento do sabor, de recompensa e ou motivação. Segundo este autor a variação genética na percepção do doce não só influencia a escolha de alimentos, mas também está associada com o consumo de álcool, pois ambos os mecanismos periféricos e centrais da percepção do doce se correlacionam com o consumo de álcool em modelos animais e humanos (BACHMANOV et al., 2011).

Todos estes dados ilustram uma genética complexa na preferencia do sabor e seu impacto na nutrição e saúde humana. A identificação de genes responsáveis pela variação da percepção do sabor doce entre as espécies, fornecem ferramentas para o estudo da aceitação de alimentos. Em termos

genéticos, medições da preferência do gosto doce são considerados fenótipos, ou características. Fenótipo é definido como as características observáveis de um organismo determinado tanto pela composição genética e influências ambientais. O objetivo da análise genética é identificar os efeitos genéticos e ambientais sobre o fenótipo. (BACHMANOV et al, 2011).

Observamos em nosso estudo a associação entre o polimorfismo rs37874116 no gene *TAS1R2*, que codifica a subunidade T1R2 do receptor do doce, com diferenças no consumo habitual de alimentos ricos em açúcar em crianças de três a quatro anos de idade. Os portadores do alelo T ingeriram mais dos alimentos com alta densidade de açúcar do que os indivíduos homozigotos C/C, porém a ingestão aumentada desses alimentos não refletiu em ganho de peso, quando analisados o escore Z do IMC das crianças em todas as fases estudadas e a variação do IMC entre um e sete-oito anos. Observou-se que as crianças homozigotas C/C, é que aumentaram de peso, quando comparadas as portadoras do alelo T. O significado funcional do polimorfismo rs37874116 não é ainda totalmente conhecido e atualmente não existem informações disponíveis no banco de dados PolyPhen, sabe-se que esta variante está localizada em um domínio extracelular da proteína e é uma das regiões de ligação do receptor do sabor doce (LIAO e SCHULTZ, 2003; KIM et al., 2006) e especificamente uma região conservada da proteína (LIAO e SCHULTZ, 2003). Talvez essa variante Ile191Val possa não ser um polimorfismo que cause variação na expressão ou função da proteína, ou seja, um polimorfismo causal, mas em vez disso possa estar em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo causal (ENY et al., 2010). No estudo da Eny et al. (2010), com uma população diferente (adultos jovens e diabéticos), não foram observados efeitos do polimorfismo Ile191Val (rs35874116) nos indivíduos magros, porém em indivíduos com sobrepeso (IMC > 25) foi observada diminuição na ingestão de carboidratos nos portadores do alelo T em comparação com homozigotos C/C.

Na nossa investigação sobre *TAS1R3*, gene responsável pela codificação da subunidade do receptor doce e também umami, observou-se associação do polimorfismo rs35744813 com a ingestão média diária de energia. Os portadores do alelo A (G/A e A/A) ingeriram em média mais calorias do que os indivíduos homozigotos G/G. Isto pode ser explicado pelo

fato deste polimorfismo afetar a região promotora do gene *TAS1R3* influenciando a sua transcrição e também a modificando a formação do receptor de umami, pois a sub-unidade do receptor T1R3 compõe tanto o receptor doce quanto umami. O receptor doce T1R2-T1R3 responde à compostos de sabor doce, adoçantes de alta potência, e alguns D-amino ácidos, enquanto que o heteromero T1R1-T1R3 responde ao sabor umami, sendo sensível aos L aminoácidos (NELSON et al., 2001; NIE et al., 2005; ZHAO et al., 2003). A variação na população pode ser pequena em relação à percepção umami, o qual é controlado por uma forma principal do receptor, que é otimizado para a detecção de glutamato, mas pode variar muito mais no que diz respeito à percepção doce (KIM et al., 2006). Estudos associando polimorfismos no gene *TAS1R3* com variação de sensibilidade ao gosto doce em humanos são ainda muito restritos, no estudo de Fusham et al. (2009), com 144 indivíduos não aparentados que se identificaram como europeus, asiáticos ou africano observaram redução da sensibilidade ao doce, aproximadamente 25% para heterozigotos C/T e 50% para homozigotos T/T nos dois polimorfismos (rs307355 e rs35744813) confirmando a hipótese de que esses polimorfismos afetam a transcrição do gene *TAS1R3* e, assim, contribuam para as diferenças na percepção do gosto doce em diferentes populações.

Ampliando o conceito de como as células sensoriais identificam os sabores o estudo de Yee et al. (2011) apresentou evidências de receptores do doce T1R-independentes em ratos, em particular, para os açúcares e observou-se que a detecção de sabor doce também depende da ativação de canais de cátions dependentes de açúcar e/ou receptores de açúcar acoplados à proteína G que iniciam uma segunda cascata de mensagem. Neste mecanismo os açúcares provocam a despolarização de células que respondem ao sabor doce e transmitem os seus sinais para os nervos aferentes gustativos. Foi observado que os receptores doces T1R-independentes das células gustativas expressam transportadores de glucose (GLUTs) e sensores metabólicos que servem como sensores de açúcar em outros tecidos, como intestino, pâncreas, coração, músculo esquelético e cérebro. Foram observados que muitos GLUTs, um co-transportador de sódio-glucose (SGLT1), e dois componentes de K ATP-gated + (KATP) sensor metabólico (receptor de sulfonilureia 1 - SUR1) foram seletivamente expressos

em células gustativas T1r3-positivas e desempenham um papel importante na homeostase da glicose e metabolismo por todo o corpo, e em muitos órgãos específicos, porém a presença e função destas proteínas nas células gustativas não são ainda totalmente conhecidas (YEE et al., 2011).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a teoria de que as variações genéticas no heterodímero T1R2-T1R3 do receptor de sabor doce podem ser responsáveis pelas diferenças interindividuais na ingestão de açúcar e alimentos com sabor umami e podem contribuir para a pesquisa na área da genética da percepção do sabor e do sucesso ou insucesso da mudança da ingestão alimentar em resposta ao aconselhamento nutricional. Nosso estudo tem algumas limitações, entre eles as análises de apenas um polimorfismo de cada gene, apesar destes polimorfismos terem sido escolhidos pela funcionalidade observada em estudos anteriores. Outra característica relevante do nosso estudo que pode ter influenciado os resultados é a idade das crianças, pois talvez elas ainda não tenham tido a liberdade de escolha dos alimentos, porém é possível, que apesar de parecer uma limitação, este possa ser um ponto forte do estudo, visto que com grande oferta de alimentos palatáveis para os adultos e crianças maiores, todos acabem ingerindo mais alimentos doces, independentemente da maior sensibilidade ou não. Mais uma limitação apresentada pelo nosso estudo é a que, os grupos de alimentos analisados (SDF e LDF) pode não refletir, necessariamente, a questão da palatabilidade e gosto doce. O desenho deste estudo é transversal aninhado em estudo de coorte. Por suas características não é conclusivo sobre a causalidade nas associações observadas, uma vez que apenas um estudo longitudinal permitiria este tipo de conclusão. Porém este estudo permite gerar hipóteses para outros estudos futuros.

Ao final deste trabalho podemos concluir, que das variantes genéticas estudadas, o polimorfismo rs37874116 no gene *TAS1R2* foi associado com diferenças na ingestão habitual de alimentos ricos em açúcar em crianças de três a quatro anos de idade, porém ao contrário do inicialmente esperado não detectamos associação deste polimorfismo com a ingestão diferencial de alimentos com sabor doce em outras faixas etárias e também com parâmetros antropométricos. O outro polimorfismo investigado rs35744813 no gene *TAS1R3* foi associado com a ingestão média diária de energia, no entanto, esta

associação também não se refletiu nas medidas antropométricas das crianças. De um modo geral, os resultados deste estudo, indicam que os polimorfismos analisados não apresentam um grande efeito na determinação da ingestão de alimentos e do status nutricional de crianças nas três fases de desenvolvimento investigadas. .

As descobertas deste estudo são relevantes, principalmente por avaliarem o consumo alimentar e estado nutricional em diferentes fases da infância e a sua correlação com as variações genéticas em genes de receptores de sabor, isso pode abrir novas perspectivas para pesquisadores e colaborar com o estudo da ingestão alimentar e obesidade infantil.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
APROVADO PELA CARTA Nº 880/2004-CONEP/CNS/MS
RUA SARMENTO LEITE, 245 – FONE: (51) 3224.8822
CEP 90050-170 – PORTO ALEGRE – RS - cep@fffcempa.edu.br

Of. 349/06-CEP

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2006.

Ilma. Sra.

Profa. Márcia Regina Vitolo

Nesta Faculdade

Senhora Professora

Informamos que seu adendo “Incidência de Obesidade e Anemia em Uma Coorte de Nascimento Acompanhada Até 4 Anos de Idade: Avaliação do Componente Genético.”, Processo 143/06, do projeto nº 061/05, intitulado “Investigação dos fatores de risco para obesidade precoce e anemia em uma coorte de crianças submetidas a um programa de intervenção nutricional no primeiro ano de vida.”, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, na reunião de 18 de dezembro de 2006, sendo o adendo aprovado, conforme parecer consubstanciado nº 286/06, em anexo.

Outrossim, informamos que de acordo com o Art. 4º, letra c, do Regulamento do CEP, V. Sa. deverá nos encaminhar relatórios semestrais do desenvolvimento do projeto.

Atenciosamente,

José Geraldo Vernet Taborda
Coordenador do CEP/FFFCMPA

ANEXO B – Normas da revista *Chemical Senses*

CHEMICAL SENSES INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Please note that the journal now encourages authors to complete their copyright licence to publish form online.

For NIH grantees: Publishing in this journal is fully compliant with the National Institute of Health (NIH) Public Access policy. Oxford Journals automatically deposits all NIH-funded papers into PubMed Central, provided NIH is acknowledged by the author as a funding source (please refer to the Funding section below). Oxford Journals also automatically deposits open access papers into PubMed Central on your behalf. Please see the journal's [self archiving policy](#) for more details.

Authors may submit images to be considered for the cover of *Chemical Senses* ([see below](#)).

Authors may opt to publish color figures online and black and white in print free of charge. If doing so please ensure that the figure caption works for both colour and black and white versions.

Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper is as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to reject manuscripts that are not in accordance with these instructions.

All material to be considered for publication in *Chemical Senses* should be submitted in electronic form via the journal's online submission system. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, instructions on how to submit your manuscript online can be found by [clicking here](#).

SCOPE

Chemical Senses publishes original research on all aspects of chemosensory biology, including taste, smell, vomeronasal, and trigeminal chemoreception in both vertebrates and invertebrates. Approaches can range from molecular to behavioral to ecological, and papers integrating multiple approaches are encouraged. Papers on the development of new methodology for investigating the chemical senses are welcomed, but should include experimental evidence that validates the new technology. Papers on clinical and applied research are also welcomed, but should have a fundamental concept in the chemical senses as their primary focus.

LETTER TO THE EDITOR

Letters commenting on the scientific content of papers which have been published in *Chemical Senses* are considered for publication. The author(s) of the paper are normally asked to respond to the comments. Letters and responses may be edited before publication. Normal scientific terminology, and *Chemical Senses* citation procedures, should be followed.

BOOKS FOR REVIEW

Publishers submitting books for review should send them to the Editor-in-Chief:

Wolfgang Meyerhof
German Institute of Human Nutrition
Potsdam-Rehbruecke
Department of Molecular Genetics
Arthur-Scheunert-Allee 114-116
D-14558 Nuthetal
Germany

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

The Editors welcome electronic submission of manuscripts through the journal's online submission system. To submit online, please visit our online submission system [here](#).

Submission of a paper implies that it reports unpublished work and that it is not under consideration for publication elsewhere. If previously published tables, illustrations or more than 200 words of text are to be included, then the copyright holder's written permission must be obtained. Copies of any such permission letters should be enclosed with the paper.

All submissions must be accompanied by a cover letter that explains the major findings of the manuscript and why the authors want to have their work published in *Chemical Senses*.

To contact the editorial office, please send an [email](#).

REVIEW OF MANUSCRIPTS

Manuscripts submitted are reviewed and those not meeting the journal's scientific standards or other requirements are rejected.

Submitted manuscripts are assessed for their general suitability by the editor-in-chief. Thereafter the submission is assigned to the executive editor closest to the field of study who is responsible for its evaluation. The executive editor's recommendation is based on the reports of expert reviewers which will be transmitted to the authors. Authors will be notified about the final editorial decision within about 4-5 weeks. The status of a manuscript during the editorial process can be followed online at <http://mc.manuscriptcentral/chemsens>.

Manuscripts regarded by the Editors as of special interest may be reviewed and published on a fast track.

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted within three months of the author's receipt of the referees' reports. Revised manuscripts returned after three months will be considered as new

submissions subject to re-review. Authors should notify the editorial office as soon as possible if revisions will require longer than three months.

AUTHORSHIP

All persons designated as authors should qualify for authorship. The order of authorship should be a joint decision of the co-authors. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. Authorship credit should be based on substantial contribution to conception and design, execution, or analysis and interpretation of data. All authors should be involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and must have read and approved the final version of the manuscript. Assurance that all authors of the paper have fulfilled these criteria for authorship should be given in the covering letter.

LICENCE TO PUBLISH

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

OPEN ACCESS OPTION FOR AUTHORS

Chemical Senses authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open](#) initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. Open access charges can be viewed [here](#) in detail; discounted rates are available for authors based in some developing countries (click [here](#) for a list of qualifying countries). Please note that these charges are in addition to any color charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please

provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

OFFPRINTS

The publishers supply a free url. Offprints can be ordered using the Oxford Journals Author Services site. Late orders submitted after the journal is printed are subject to increased prices.

CONFLICT OF INTEREST

At the point of submission, *Chemical Senses*' policy requires that each author reveal any financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications, or opinions stated - including pertinent commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships, or direct academic competition. When considering whether you should declare a conflicting interest or connection please consider the conflict of interest test: Is there any arrangement that would embarrass you or any of your co-authors if it was to emerge after publication and you had not declared it?

As an integral part of the online submission process, Corresponding authors are required to confirm whether they or their co-authors have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these. If the Corresponding author is unable to confirm this information on behalf of all co-authors, the authors in question will then be required to submit a completed [Conflict of Interest form](#) to the Editorial Office. It is the Corresponding author's responsibility to ensure that all authors adhere to this policy.

If the manuscript is published, Conflict of Interest information will be communicated in a statement in the published paper.

PROOFS

Manuscripts should be in their final form when they are submitted so that proofs will require only correction of typographical errors. Authors are sent page proofs by the publisher. Please provide an e-mail address to enable page proofs to be sent as PDF files via e-mail. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately for typographic errors and returned to the production office by fax or e-mail within 48 hours. Essential changes of an extensive nature may be made only by insertion of a Note Added in Proof. Page charges are *not* levied. Authors are, however, charged for extensive changes made in proof and for special items such as color plates.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be in their final form when they are submitted so that proofs will require only correction of typographical errors.

Sections of the manuscript

Regular full-length papers should be divided into the following sequence of headed sections: Abstract (100-200 words), Introduction, Materials and methods (or Experimental), Results (or Observations), Discussion (or Conclusion), Acknowledgements, and References.

General format

Prepare your manuscript text using a Word processing package (save in .doc or .rtf format). Use double spacing (space between lines of type not less than 6 mm) throughout the manuscript and leave margins of 25 mm (1 inch) at the top, bottom and sides of each page. Number each page. Please avoid footnotes; use instead, and as sparingly as possible, parenthesis within brackets. Enter text in the style and order of the journal. Type references in the correct order and style of the journal. Type unjustified, without hyphenation, except for compound words. Type headings in the style of the journal. Use the TAB key once for paragraph indents. Where possible use Times for the text font and Symbol for the Greek and special characters.

Use the word processing formatting features to indicate **Bold**, *Italic*, Greek, Maths, ^{Superscript} and _{Subscript} characters. Clearly identify unusual symbols and Greek letters. Differentiate between the letter O and zero, and the letters l and I and the number 1. Mark the approximate position of each figure and table.

Check the final copy of your paper carefully, as any spelling mistakes and errors may be translated into the typeset version.

Commentaries

Chemical Senses publishes commentaries on particularly topical papers. Authors of commentaries are invited by the Editors of *Chemical Senses*, and the commentary and original paper are published in the same issue of the journal. Authors should include a clear reference to the original paper in their commentary, e.g. 'In this issue of *Chemical Senses*, Yoshikawa and Touhara (Yoshikawa and Touhara, 2008) show that...'. A reference to the original paper should be included in the reference list of the commentary.

Corresponding author

The name and address (postal and email) of the author to whom all correspondence is to be addressed should be placed on the title page and identified as:

Correspondence to be sent to: John Smith, Department of Pathology, University of Somewhere, Anytown, USA. email: john.smith@somewhere.com

Telephone and fax numbers are no required.

Abstract

The first page of the manuscript should begin with the abstract, which should be a concise summary of the paper. Abbreviations and reference citations should be avoided.

Key words

Up to six key words should be given below the abstract. Key words facilitate retrieval of articles by search engines, web directories and indexes; therefore, terms that are too general should be avoided. The selected key words should not repeat words given in the title since this is covered by most search systems. The aim is to assist potential readers to find the article by clearly and specifically describing its subject matter, including aspects of methodology or the theoretical framework.

References & Style

Please refer to the downloadable [CHEMSE mini style list](#).

Please note that Chemical Senses follows CSE style for numbers, whereby all numbers are provided as Arabic numerals/digits (including numbers under 10; follow CSE chapter 12).

Authors are responsible for the accuracy of the references. Published articles and those in the press (state the journal which has accepted them) may be included.

In-text references should be cited by author and date. Do not place text other than the author and date within the parenthesis. No more than two authors may be cited per reference; if there are more than two authors use et al. For example: (Smith 2010)(Smith and Jones 2010)(Smith et al. 2010).

At the end of the manuscript the citations should be typed in a reference list in alphabetical order, with the authors' names, year, paper title, journal, volume number, inclusive page numbers, and name and address of publisher (for books only). In the reference list all authors should be cited (to a maximum of 10; if more than 10 authors please use et al.). The name of the journal should be abbreviated according to the *World List of Scientific Periodicals*.

References should therefore be listed as follows:

- Cagan RH, Rhein LD. 1980. Biochemical basis of recognition of taste and olfactory stimuli. In: van der Starre H, editor. Olfaction and Taste VII. Oxford: IRL Press. p. 35-44.
- Marshall DA, Moulton DG. 1981. Olfactory sensitivity to alpha-ionone in humans and dogs. Chem Senses. 6:53-61.
- van der Starre H, editor. 1980. Olfaction and Taste VII. Oxford: IRL Press.

Personal communications (Smith J, personal communication) should be authorized in writing by those involved, and unpublished data should be cited as (unpublished data). Both should be used sparingly.

Tables

Tables should be typed on separate sheets and numbered consecutively with Roman numerals. They must be in an editable format (e.g. not pdf or other image file) so that they can be typeset correctly. They should be self-explanatory and include a brief descriptive title. They should be of such a size that they fit easily onto a journal page, the type area of which is 234 (height) x 185

mm (double column width) or 89 mm (single column width). Footnotes to tables indicated by lower case letters are acceptable, but they should not include extensive experimental details.

A text reference in the text should be used to indicate approximately where a table should be inserted in the text.

Illustrations

All illustrations (line drawings and photographs) must be referred to in the text (as Figure 1 etc.) and should be abbreviated to 'Fig. 1.' only in the figure legend. For online submission, you will be required to submit images electronically in one of the following formats: .jpg, .pdf, .ppt, .gif, .tif, or .eps.

[Please note, we can receive figures as .pdf format but not tables or the main text.]

In the manuscript indicate the most appropriate position for the figure.

There is a special charge for the inclusion of color plates in the print version of *Chemical Senses*. The cost is £350/\$600/€525 *per figure*. AChemS, ECRO, and JASTS members are eligible for a 50% discount on these color charges. Color versions of figures can also be published online-only (at no charge) - for more details see our [Flexible Color Option](#) here. **Please note: Authors who opt to publish black and white in print should submit just one figure legend that works for both color and grayscale as the print version must match the online version exactly.**

If the box in the ScholarOne submission system for color fees has been ticked, all figures submitted in color will be typeset in color. As noted in the e-mail that you receive with your proofs, you are responsible for ensuring that all figures correctly appear in black and white or in color.

Line drawings: Please provide these as clear, sharp images, suitable for reproduction when submitted. No additional artwork, redrawing or typesetting will be done. Faint and grey shading or stippling will be lost upon reproduction and should be avoided. Where various shadings are used within one figure please ensure that it is easy to differentiate between them, using standard shadings (see the hard copy of the journal for examples). There should be sufficient white space between lines and dots to ensure the areas will not fill in and look grey. If stippling is used, this should be made up of clear black dots with visible white space between them. Ensure that the size of the lettering is in proportion with the overall dimensions of the drawing.

Electronic submission of figures: Figures must be saved at a resolution of at least 300 pixels per inch at the final printed size for color figures and photographs, and 600 pixels per inch for black and white line drawings. Digital color art should be submitted in CMYK rather than RGB format, as the printing process requires colors to be separated into CMYK and this conversion can alter the intensity and brightness of colors. Therefore authors should be satisfied with the colors in CMYK (both on screen and when printed) before submission. Please also keep in mind that

colors can appear differently on different screens and printers. Failure to follow these guides could result in complications and delays. For useful information on preparing your figures for publication, go to <http://cpc.cadmus.com/da>.

Figure legends: These should be included at the end of the manuscript text. Define all symbols and abbreviations used in the figure. Common abbreviations and others in the preceding text need not be redefined in the legend.

CONVENTIONS

In general, the journal follows the conventions of the *CSE Style Manual* (Council of Science Editors, Reston, VA, 2006, 7th ed.). Please refer to the [CHEMSE mini style list](#) for more detailed information on CHEMSE reference and general style points.

Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on the Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units.

Genotypes should be italicized; phenotypes should not be italicized.

ABBREVIATIONS

Try to restrict the use of abbreviations to SI symbols and those recommended by the IUPAC-IUB. Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

PERMISSIONS FOR ILLUSTRATIONS AND FIGURES

Permission to reproduce copyright material, for print and online publication in perpetuity, must be cleared and if necessary paid for by the author; this includes applications and payments to DACS, ARS, and similar licensing agencies where appropriate. Evidence in writing that such permissions have been secured from the rights-holder must be made available to the editors. It is also the author's responsibility to include acknowledgements as stipulated by the particular institutions. Oxford Journals can offer information and documentation to assist authors in securing print and online permissions: please see the [Guidelines for Authors](#) section.

Information on permissions contacts for a number of main galleries and museums can also be provided. Should you require copies of this, please contact the editorial office of the journal in question or the [Oxford Journals Rights](#) department.

CHEMICAL FORMULAE AND MATHEMATICAL EQUATIONS

Wherever possible, write mathematical equations and chemical formulae on a single line. Submit complicated chemical structures as artwork.

COLOR FIGURES

Chemical Senses uses a flexible color model for figures. All figures submitted to the journal in color will be published in color online at no cost (unless the author specifically requests that their figures be in black and white online). Authors may choose to also publish their figures in color in the print journal for £350/\$600/€525 per figure: you will be asked to approve this cost in an e-mail after your article is accepted for publication. You will be issued an invoice at the time of print publication.

Please note: Authors who opt to publish figures in color online and black and white in print should submit just one figure legend that works for both color and grayscale as the print version must match the online version exactly.

COVER IMAGES

Chemical Senses is pleased to receive suggestions for cover images for the journal. Authors should indicate (ideally upon submission) whether they feel that an image associated with their manuscript would be suitable as a cover image.

AUTHOR SELF-ARCHIVING/PUBLIC ACCESS POLICY FROM MAY 2005

For information about this journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy](#) page.

FUNDING

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'
- The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH' ([full RIN-approved list of UK funding agencies](#))
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: '[grant number ABX CDXXXXXX]'
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See http://www.oxfordjournals.org/for_authors/repositories.html for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

ETHICS GUIDELINES

In order to guarantee a consistent policy of review and publication, *Chemical Senses* endorses the Ethics Guidelines offered by the Society for Neuroscience. These guidelines describe the responsibilities and expected conduct not only of authors of scientific articles, but also of the editors and reviewers. We encourage our readers to take a few minutes to download and look over these guidelines at <http://sfn.org/index.aspx?pagename=guidelinesPolicies>.

A hard copy can be obtained by contacting any of the Executive Editors.

HUMAN AND ANIMAL EXPERIMENTS

All work with humans must comply with the *Declaration of Helsinki* for Medical Research involving Human Subjects: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> and have been approved by the local ethical committee.

When reporting experiments on animals, authors must indicate that the institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed and that the institutional internal review board has approved the work.

Authors must include the ethics statement in the Methods section of their paper.

LANGUAGE EDITING

Particularly if English is not your first language, before submitting your manuscript you may wish to have it edited for language. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. If you would like information about one such service please click [here](#). There are other specialist language editing companies that offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.