



ORIGINAL

Polimorfismo C358A de la enzima «amida hidrolasa de ácidos grasos» y los niveles de adipocitoquinas en obesos mórbidos

Daniel A. De Luis*, Manuel González Sagrado, Rocío Aller, Olatz Izaola, Rosa Conde y Enrique Romero

Instituto de Endocrinología y Nutrición, Unidad de Investigación, Facultad de Medicina, Hospital Río Hortega, Universidad de Valladolid (RETICEF 056/0013), Valladolid, España

Recibido el 18 de octubre de 2009; aceptado el 4 de enero de 2010
Disponible en Internet el 1 de marzo de 2010

PALABRAS CLAVE

Adipocitoquinas;
Amida hidrolasa
ácidos grasos;
Obesidad mórbida;
Polimorfismos

Resumen

Introducción: Se ha demostrado que el polimorfismo C358A de la amida hidrolasa de ácidos grasos (AHAG) se relaciona con la obesidad. EL objetivo de nuestro estudio fue evaluar la relación entre el polimorfismo (cDNA 385C- > A) del gen de la amida hidrolasa de ácidos grasos parámetros antropométricos, factores de riesgo cardiovascular y niveles de adipocitoquinas en una muestra de pacientes con obesidad mórbida.

Material y métodos: Se analizó una muestra de 66 pacientes con obesidad mórbida. A todos los pacientes se les determinaron el peso, la presión arterial, glucemia en ayunas, lipoproteína (a), proteína C reactiva (PCR), insulina, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos y adipocitoquinas, así como el genotipo del polimorfismo C358A de AHAG.

Resultados: La edad de los pacientes fue de 48,0 (16,1) años, con un IMC de 44,4 (4,1), con un total de 17 varones (25,8%) y 49 mujeres (74,2%). Un total de 45 pacientes (8 varones/37 mujeres) (68,2%) presentaron un genotipo G358G (grupo salvaje) y 21 pacientes (4 varones/17 mujeres) G358A (31,8%) (grupo mutante). No se detectó ninguna diferencia significativa en los parámetros analizados entre ambos genotipos.

Conclusión: El polimorfismo de la AHAG no se relaciona con variables antropométricas, bioquímicas o concentraciones de adipocitoquinas en pacientes con obesidad mórbida.

© 2009 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: dadluis@yahoo.es (D.A. De Luis).

KEYWORDS

Adipocytokines;
Fatty acid amide
hydroxylase;
Morbid obesity;
Polymorphisms

C358A polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) and adipocytokine levels in the morbidly obese**Abstract**

Introduction: The 385 C/A polymorphism of fatty acid amide hydrolase (FAAH) has recently been demonstrated to be associated with overweight and obesity. The aim of our study was to investigate the association between missense polymorphism (cDNA 385 C->A) of the FAAH gene and anthropometric parameters, cardiovascular risk factors and adipocytokines in morbidly obese patients.

Material and methods: A sample of 66 morbidly obese patients was analyzed. In all patients, weight, blood pressure, fasting glycemia, lipoprotein(a), C-reactive protein, insulin, total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, triglyceride and adipocytokine levels, as well as the genotype of the C358A polymorphism of FAAH, were determined.

Results: The mean age was 48.0(16.1) years and the mean body mass index was 44.4 (4.1). There were 17 males (25.8%) and 49 females (74.2%). Forty-five patients (8 males/37 females) (68.2%) were G358G (wild genotype) and 21 patients (4 males/17 females) were G358A (31.8%) (mutant group). Biochemical, anthropometrical and adipocytokine levels showed no statistically significant differences between the two genotypes.

Conclusion: In patients with morbid obesity, the C358A polymorphism of FAAH was not associated with anthropometric parameters, biochemical markers or adipocytokine levels. © 2009 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La obesidad es un problema epidemiológico de primer orden, calculándose que en España, 2 tercios de la población presentan sobrepeso¹. Teniendo especial interés los pacientes con obesidad mórbida, donde el riesgo cardiovascular es mucho mayor. En estos momentos el tejido adiposo, que está en exceso en el paciente obeso, es considerado como un órgano activo, capaz de sintetizar multitud de moléculas (adipocitoquinas), que son capaces de modular el apetito, la sensibilidad a la insulina, el gasto energético, la inflamación y la inmunidad².

En este contexto, debemos recordar que la planta *Cannabis sativa* (marihuana) presenta múltiples efectos psicoactivos en los humanos, incluyendo un incremento del apetito y del peso corporal^{3,4}. En la actualidad es conocido que el sistema endocanabinoide es un importante modulador de la conducta humana⁵. Dentro de este sistema, el principal inactivador es un enzima, amida hidrolasa de ácidos grasos (AHAG)⁶. En algunos trabajos se ha demostrado cómo la actividad de este enzima puede regular el sistema endocanabinoide y, por tanto, los hábitos de la persona⁷.

En este sistema se ha descrito una mutación (cDNA 385C->A) que produce la sustitución de una treonina por una prolina en la posición 129 (P129T), habiéndose asociado con un mayor abuso de drogas⁸. Recientemente, Sipe et al⁹ han demostrado como los pacientes homocigotos AHAG 385A/A presentan más sobrepeso y obesidad. El grupo de Monteleone et al¹⁰ han confirmado estos hallazgos con una mayor expresión del alelo 38 A en los sujetos obesos. No obstante, en algunos trabajos no se ha conseguido demostrar esta asociación¹¹. Por tanto, teniendo en cuenta que el sistema endocanabinoide juega un papel importante en el control metabólico, de peso y comportamiento humano¹², nuestro grupo ha decidido valorar

la asociación de este polimorfismo de AHAG en parámetros relacionados con la obesidad. Nuestro diseño presenta especial interés al haber sido realizado en un grupo de obesos mórbidos, en los cuales todavía no se ha evaluado el papel de este polimorfismo.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la relación entre el polimorfismo (cDNA 385 C->A) del gen de la AHAG y parámetros antropométricos, factores de riesgo cardiovascular y niveles de adipocitoquinas en una muestra de pacientes con obesidad mórbida.

Pacientes y métodos**Pacientes**

Se analizó de manera prospectiva una muestra de 66 obesos mórbidos (IMC > 40 kg/m²) mediante un muestreo no probabilístico consecutivo en la Consulta de Nutrición. Los pacientes fueron evaluados en una Unidad de Nutrición Clínica y firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio, que había sido aprobado previamente por el Comité de Ensayos Clínicos del hospital. Los criterios de exclusión, para homogeneizar la muestra y evitar factores de confusión no controlados, fueron historia previa de patología isquémica cardiovascular o cerebral en los 36 meses previos, elevación del colesterol > 300 mg/dl, triglicéridos > 400 mg/dl, presión arterial > 140/90 mmHg, glucosa en ayunas > 110 mg/dl, así como la toma de cualquiera de las siguientes medicaciones: sulfonilurea, tiazolidindionas, insulina, glucocorticoides, inhibidores de enzima convertidora de la angiotensina y antagonistas del receptor II de la angiotensina.

Procedimiento

A todos los pacientes se les determinaron el peso, la presión arterial, glucemia en ayunas, lipoproteína (A), proteína C reactiva (PCR), insulina, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos y adipocitoquinas (leptina, adiponectina, resistina, tumor necrosis factor- α (TNF α), e interleukina 6).

Genotipado del receptor AHAG

Los cebadores (oligonucleotide primers) y las sondas para los experimentos fueron diseñados mediante el programa Beacon Designer 4.0 (Premier Biosoft International[®], LA, CA). La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se realizó con 50 ng DNA genómico, 0,5 μ l de primers (primer forward, 5'-CTA TCT GGC TGA CTG TGA GAC TC-3'; primer reverse, 5'-GAG GCA GAG CAT ACC TTG TAG G-3), y 0,25 μ l de cada sonda (sonda salvaje: 5'-Fam-CTG TCT CAG GCC CCA AGG CAG G-BHQ-1-3') y (sonda mutante: 5'-Hex- CTG TCT CAG GCC ACA AGG CAG G-BHQ-1-3') en un volumen final de 25 μ l (Termociclador iCycler IQ [Bio-Rad[®]], Hercules, CA). El ADN fue desnaturalizado a 95 °C durante 3 min; posteriormente, se realizaron 50 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y anillamiento a 59,3° durante 45 s. La RCP se realizó en un volumen final de 25 μ l que contenía 12,5 μ l de IQTM Supermix (Bio-Rad[®], Hercules, CA) con «hot start Taq DNA polymerase».

Determinaciones bioquímicas

Las concentraciones de colesterol y triglicéridos se determinaron mediante ensayos enzimocolorimétricos (Technicon Instruments, Ltd., Nueva York, EE.UU.). Las concentraciones de HDL colesterol se determinaron enzimáticamente en el sobrenadante tras precipitación con dextrano sulfato-magnésico.

Las concentraciones de glucosa se determinaron mediante un método automatizado de glucosa oxidasa (Glucose analyser 2, Beckman Instruments, Fullerton, CA). La insulina fue medida mediante un ensayo enzimocolorimétrico (Insulina, WAKO Pure-Chemical Industries, Osaka, Japón) y se determinó la resistencia a la insulina mediante el modelo «homeostasis model assessment for insulin sensitivity» (HOMA)¹³. La PCR se determinó mediante inmunoturbimetría (Roche Diagnostcis GmbH, Mannheim, Alemania), con unos límites de normalidad de (0–7 mg/dl) y una sensibilidad analítica de 0,25 mg/dl.

Adipocitoquinas

La resistina fue medida mediante ELISA (Biovendor Laboratory, Inc., Brno, República Checa) con una sensibilidad analítica de 0,2 ng/ml y unos límites de normalidad de 4–12 ng/ml. La leptina fue medida mediante ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,05 ng/ml y unos límites de normalidad de 10–100 ng/ml. La adiponectina fue determinada mediante ELISA (R&D systems, Inc., Mineapolis, EE.UU.) con una sensibilidad de 0,246 ng/ml y unos límites de normalidad de 8,65–21,43 ng/ml. La interleukina 6 y el TNF α fueron medidos por ELISA (R&D systems, Inc., MN, EE.UU.) con

una sensibilidad de 0,7 pg/ml y 0,5 pg/ml, respectivamente. Los valores de normalidad fueron para interleukina 6 de (1,12–12,5 pg/ml) y para TNF α (0,5–5,6 pg/ml).

Calorimetría indirecta

Para la determinación del gasto energético, los sujetos fueron evaluados en una Unidad Metabólica. Tras 12 h de ayuno y reposo, los pacientes fueron sometidos en condiciones homogéneas a una calorimetría mediante máscara ajustable (MedGem; Health Tech, Golden, EE.UU.). Se calcularon el gasto energético basal (kcal/día) y el consumo de oxígeno (ml/min)¹⁴.

Determinaciones antropométricas

El peso fue medido mediante una báscula con una precisión de 0,1 kg y el IMC se calculó con la fórmula (peso/talla²). Se determinó el perímetro de la cintura y de la cadera para calcular el índice cintura cadera (ICC). Se realizó una impedanciometría tetrapolar para determinar la composición corporal¹⁵ (Biodynamics Model 310e, Seattle, WA, EE.UU.). Se utilizaron la resistencia y la reactancia para calcular el agua corporal total, la grasa y la masa libre de grasa.

La presión arterial fue determinada 2 veces con el paciente en reposo mediante un esfigmomanómetro de mercurio y se realizó el promedio de las 2 determinaciones.

Ingesta dietética

Los pacientes fueron encuestados durante 3 días mediante un registro escrito de 24 h para evaluar su ingesta dietética. Los registros fueron evaluados por un dietista utilizando un software con bases de alimentos nacionales¹⁶. El ejercicio físico realizado por los pacientes fueron 3 sesiones de ejercicio aeróbico de 1 h a la semana.

Análisis estadístico

El tamaño muestral fue calculado para detectar una diferencia de peso de 3 kg con un poder del 90% y un error alfa del 5% (n=60). Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. La normalidad de las variables fue analizada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas con una distribución normal fueron analizadas con el test t de Student. Las variables no paramétricas fueron analizadas con los tests W-Wilcoxon y U de Mann Whitney. Las variables cualitativas fueron analizadas con el test de la chi-cuadrado, con la corrección de Yates, cuando fue necesario, y el test de Fisher. El análisis de correlación se realizó con el test de Pearson. El análisis estadístico fue realizado con la combinación de los genotipos (G385A y A385A como grupo mutante) y del genotipo G385G como grupo salvaje (modelo dominante). Se consideró estadísticamente significativa una p inferior a 0,05.

Resultados

Un total de 66 pacientes obesos mórbidos fueron reclutados. Los pacientes presentaban un peso estable en las 2 semanas previas a su inclusión. La edad de los pacientes fue de 48,0 (16,1) años con un IMC de 44,4 (4,1), con un total de 17 varones (25,8%) y 49 mujeres (74,2%).

Un total de 45 pacientes (8 varones/37 mujeres) (68,2%) presentaron un genotipo G358G (grupo salvaje) y 21 pacientes (4 varones/17 mujeres) G358A (31,8%) (grupo mutante).

La **tabla 1** muestra las variables antropométricas. El peso, IMC, masa grasa y magra, así como gasto energético y control tensional, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Por tanto, este polimorfismo no parece relacionarse con parámetros antropométricos generales como el peso y el IMC, ni con parámetros antropométricos compartimentales como la masa grasa o la magra.

La **tabla 2** muestra los factores de riesgo cardiovascular. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones lipídicas, glucosa, insulina, PCR o

Parámetros	C358C (n = 45)	(C358A o A358A) (n = 21)
IMC	44,7 (4,1)	43,9 (3,2)
Peso (kg)	112,8 (17,3)	115,9 (14,6)
MLG (kg)	52,5 (6,9)	53,8 (7,3)
MG (kg)	57,5 (15,1)	57,2 (13,8)
CC (cm)	125,2 (12,8)	124,4 (12,5)
ICC	0,93 (0,1)	0,92 (0,07)
TAS (mmHg)	137,8 (11,8)	136,7 (13,8)
TAD (mmHg)	86,9 (8,9)	89,5 (9,6)
GEB (kcal/día)	2259 (711)	2287 (412)

CC: circunferencia de la cintura; ICC: índice cintura cadera; IMC: índice de masa corporal; GEB: gasto energético basal; MG: masa grasa; MLG: masa libre de grasa; TAD: tensión arterial diastólica; TAS: tensión arterial sistólica.
No existieron diferencias estadísticamente significativas.

Parámetros	C358C (n = 45)	(C358A o A358A) (n = 21)
Glucosa (mg/dl)	105,6 (23,7)	100,6 (13,8)
Col-Total (mg/dl)	199,6 (34,6)	205,9 (40,4)
LDL-col. (mg/dl)	118,1 (26,6)	126,5 (46,4)
HDL-col. (mg/dl)	52,4 (10,1)	56,2 (11,1)
TG (mg/dl)	124,7 (59,9)	115,4 (49,3)
Insulina (mUI/L)	20,4 (16,8)	22,4 (17,1)
HOMA	5,61 (5,2)	5,65 (4,6)
PCR (mg/dl)	7,2 (4,6)	6,9 (4,9)
Lipoproteína-a (mg/dl)	35,8 (36,6)	43,4 (17,5)

Col: Colesterol total; HOMA: Homeostasis model assessment; TG: Triglicéridos; PCR: proteína C reactiva.

Parámetros	C358C (n = 45)	(C358A o A358A) (n = 21)
Energía (kcal/día)	1.748,1 (522)	1.722,9 (513)
CH (g/día)	173,8 (61,1)	175,4 (63,2)
Grasa (g/día)	74,9 (30,9)	73,2 (23,2)
Grasa-S (g/día)	21,3 (12)	21,1 (12,5)
Grasa-M (g/día)	35,6 (12,3)	34,2 (16,5)
Grasa-P (g/día)	7,5 (4,1)	7,3 (3,9)
Proteína (g/día)	85,1 (22,3)	83,8 (22,5)
Ejercicio (hs./semana)	1,43 (3,1)	1,35 (2,2)
Fibra dietética	14,2 (6,1)	14,1 (6,2)

CH: Carbohidrato; Grasa-S: grasa saturada; Grasa-M: grasa monoinsaturada; Grasa-P: grasa poliinsaturada.
No existieron diferencias estadísticamente significativas.

Parámetros	C358C (n = 45)	(C358A o A358A) (n = 21)
IL-6 (pg/ml)	3,9 (2,3)	3,5 (3,4)
TNF- α (pg/ml)	6,4 (5,4)	5,4 (4,2)
Adiponectina (ng/ml)	38,6 (36,8)	44,5 (46,8)
Resistina (ng/ml)	4,6 (2,4)	3,4 (1,7)
Leptina (ng/ml)	137,3 (78,9)	127,1 (90,8)

IL-6: interleukina-6.
No existieron diferencias estadísticamente significativas.

lipoproteína (A) y HOMA. Por tanto, este polimorfismo no parece asociarse ni con el perfil lipídico ni con el metabolismo de los glúcidos ni marcadores inflamatorios, como la PCR.

La **tabla 3** muestra la ingesta dietética de estos pacientes, siendo similar en ambos grupos.

En la **tabla 4** se muestran las concentraciones de adipocitoquinas, presentando ambos genotipos los mismos niveles de leptina, resistina, adiponectina, interleukina 6 y TNF α .

Discusión

En los últimos años se ha relacionado claramente la carga genética del paciente con la predisposición a la obesidad y la relación de estas con distintos factores de riesgo cardiovascular. Los estudios existentes en la literatura sobre el efecto del polimorfismo C358A del gen de la enzima AHAG son contradictorios⁸⁻¹¹. En nuestro estudio no existió ninguna relación entre este polimorfismo y los datos antropométricos, factores de riesgo cardiovascular o adipocitoquinas.

Con respecto a la prevalencia del polimorfismo en nuestra muestra, el genotipo AC representó el 31,8%, muy similar al descrito en otros trabajos realizados también en

pacientes caucásicos, pero con IMC entre 30–35; 28,1%⁹; 24,1%¹⁷ y 36,5%¹⁰.

La ausencia de relación de este polimorfismo con datos antropométricos en pacientes obesos se ha descrito en otros estudios. Los datos de nuestro trabajo están en consonancia con los obtenidos por Jensen et al¹¹ y Papazoglou et al¹⁷, estando en contraposición con los obtenidos por Sipe et al⁹. En este último estudio el IMC fue superior en los sujetos con el genotipo A385A⁹. Una posible explicación a esta relación es el efecto del alelo A en el aumento de la regulación de la ingesta de alimentos dulces y palatables relacionados con la obesidad. Esta hipótesis se sustenta teniendo en cuenta que el circuito mesolímbico se relaciona con el núcleo *accumbens*, presentando una alta expresión de la enzima AHAG y el receptor endocanabinoide CB1¹⁸. No obstante, la falta de relación de este polimorfismo con datos antropométricos, descrita en nuestro trabajo y en los de otros autores^{11–17}, muestra la complejidad de las relaciones entre el ambiente y la genética en los pacientes con obesidad. Por otra parte, es necesario tener en cuenta la posible existencia de sesgos no detectados en los estudios, de este modo nuestra población es una muestra de pacientes con obesidad mórbida, con las peculiaridades que conlleva este tipo de obesidad. En segundo lugar, el análisis de la ingesta es un parámetro importante ya que puede alterar los posibles nexos de unión descritos en algunos de los estudios realizados anteriormente¹⁸, en el cual no se realiza ningún análisis de la ingesta dietética de los pacientes en el que se compare si existen, por ejemplo, diferencias en el aporte calórico.

Con respecto a la posible influencia de este polimorfismo en factores de riesgo cardiovascular bioquímicos o en las concentraciones de adipocitoquinas, no encontramos ningún dato significativo. Solo existe un trabajo en la literatura que ha demostrado la relación de este polimorfismo con marcadores bioquímicos. Este trabajo de Aberle et al¹⁹, detecta que los pacientes obesos con un alelo A presentan un descenso superior a los pacientes con genotipo salvaje en las concentraciones de colesterol total y triglicéridos, tras recibir una dieta hipocalórica baja en grasas.

Puede que este polimorfismo produzca a nivel del sistema endocanabinoide una alteración en el balance energético y en la lipogénesis²⁰, habiéndose demostrado que los pacientes con este polimorfismo presentan un 50% menos de actividad en la enzima AHAG que los sujetos con genotipo salvaje. No obstante, esta relación entre el polimorfismo C358A de la AGHA y el perfil bioquímico solo ha sido detectada en este trabajo tras una intervención dietética¹⁹ y no ha sido detectado en ningún trabajo que haya analizado a los pacientes en condiciones basales. Este dato puede ser explicado por una relación de este polimorfismo con la respuesta posprandial de ácidos grasos libres, que pudiera alterar las concentraciones de lípidos en función del genotipo presente.

A pesar de las limitaciones del estudio por su bajo tamaño muestral y el estudio de un rango de obesidad muy extremo, podemos concluir que el polimorfismo de la AHAG, C358A, no se relaciona con variables antropométricas, bioquímicas o concentraciones de adipocitoquinas en pacientes con obesidad mórbida. No obstante, es necesario realizar nuevos diseños, incluso de intervención, para valorar el efecto del sistema endocanabinoide en la etiología y tratamiento de la obesidad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Aranceta J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L. Prevalencia de la obesidad en España: estudio SEEDO 97. *Med Clin (Barc)*. 1998;111:441–5.
2. Matsuzawa Y. Adipocytokines: Emerging therapeutic targets. *Curr Athero Rep*. 2005;7:58–62.
3. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*. 1999;58:315–48.
4. Brown SM, Warger- Miller J, Mackie K. Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Bioch Biophys Acta*. 2002;1576:255–64.
5. Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system an overview. *Pros Leuk Essent Fatty Acids*. 2002;66:221–33.
6. Deutch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH) 1. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2002;66:201–10.
7. Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:73–9.
8. Sipe JC, Chiang K, Gerber AL, Beutler E, Cravatt BF. A Missense mutation in human fatty acid amide hydroxylase associated with problem drug abuse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8394–9.
9. Sipe JC, Waalen J, Gerber A, Beutler E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Inte J Obes*. 2005;29:755–9.
10. Monteleone P, Tortorella A, Martiadis V, Filippo C, Canestrelli B, Maj M. The CDNA 385 C to A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is associated with overweight/obesity but not with binge eating disorder in overweight/obese women. *Psychoneuroendo*. 2008;33:546–50.
11. Jensen D, Andreasen C, Andersen M, Hansen L, Eiberg H, Borch-Johnsen K, et al. The functional pro129Thr variant of the FAAH gene is not associated with various fat accumulation phenotypes in a population-based cohort of 5801 whites. *J Mol Med*. 2007;85:445–9.
12. Harrold JA, Williams G. The cannabinoid system: a role in both the homeostatic and hedonic control of eating? *Br J Nutr*. 2003;90:729–34.
13. Mathews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–4.
14. Feurer ID, Mullen JL. Bedside measurement of resting energy expenditure and respiratory quotient via indirect calorimetry. *Nutr Clin Pract*. 1986;1:43–9.
15. Pichard C, Slosman D, Hirschel B, Kyle U. Bioimpedance analysis: an improved method for nutritional follow up. *Clin Res*. 1993;41:53.
16. Mataix J, Mañas M. Tablas de composición de alimentos españoles. Ed: University of Granada, 2003.
17. Papazoglou D, Panagopoulos I, Papanas N, Gioka T, Papadopoulos T, Papathanasiou P, et al. The FAAH Pro129Thr polymorphism is not associated with severe obesity in Greek Subjects. *Horm Metab Res*. 2008;40:907–10.
18. Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR. Comparative analysis of FAAH and CB1 cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide

- hydrolase in regulation of endocannabinoid signalling. *Neuroscience*. 2003;119:481–96.
19. Aberle J, Fedderwitz I, Klages N, George E, Beil FU. Genetic variation in two proteins of the endocannabinoid system and their influence on body mass index and metabolism under low fat diet. *Horm Metab Res*. 2007;39:395–7.
20. Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennatu V, Stalla GK, Pasqualli R, et al. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disor*. 2003;27:289–301.