

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES  
SÉRICOS E SALIVARES E DO POLIMORFISMO DO GENE  
DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) NA  
OBESIDADE ADULTO JOVEM**

**TESE DE DOUTORADO**

**Eduardo Ottobelli Chielle**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES  
SÉRICOS E SALIVARES E DO POLIMORFISMO DO GENE  
DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) NA  
OBESIDADE ADULTO JOVEM**

**Eduardo Ottobelli Chielle**

Tese de doutorado apresentada ao curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador(a): Profa. Dra. Maria Beatriz Moretto  
Co-orientador(a): Prof. Dr. Rafael Noal Moresco**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES  
SÉRICOS E SALIVARES E DO POLIMORFISMO DO GENE  
DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) NA  
OBESIDADE ADULTO JOVEM**

elaborado por  
Eduardo Ottobelli Chielle

como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Farmacêuticas

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Maria Beatriz Moretto, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Carlos Eduardo Blanco Linares, Dr.**  
(URI) (Examinador)

**Fábio Vasconcellos Comim, Dr.**  
(UFSM) (Examinador)

**Michel Mansur Machado, Dr.**  
(UNIPAMPA) (Examinador)

**José Antônio Mainardi de Carvalho, Dr.**  
(UFSM) (Examinador)

Santa Maria, 20 de novembro de 2015.

*Dedico este trabalho a minha família, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho meu crescimento pessoal e profissional. Aos amigos, alunos e voluntários que fizeram parte desta caminhada e a Eliseu pelo companheirismo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar força interior para superar as dificuldades, me amparar nos momentos difíceis e me proporcionar esta trajetória, me mostrando o caminho nas horas incertas e me suprindo em todas as minhas necessidades.

A minha família, em especial mãe, pai, irmã, sobrinha os quais amo com todas as minhas forças. Obrigado por estarem sempre ao meu lado me incentivando e apoiando em minhas escolhas, sem vocês minha felicidade não seria completa.

As minhas alunas Ellen, Thaís, Jaíne, Katy, Ângela, Anna, Débora por me ajudarem no desenvolvimento do trabalho, vocês foram muito importantes.

As colegas do laboratório 1207 Gabriela, Karine, Thainã, Paula, Lariane e Raphaela pela imensa contribuição que me forneceram na execução deste projeto, sem vocês não existiriam resultados.

A Eliseu pelo apoio incondicional, carinho, conversas, descontração e ajuda em todos os momentos, tu és uma pessoa muito especial.

Aos demais amigos que fazem parte da minha vida, proporcionando momentos de companhia, descontração e alegria.

A UNOESC - Universidade do Oeste de Santa Catarina por me apoiar e me liberar das minhas atividades para que eu pudesse cumprir a carga horária exigida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e do Pós em Farmacologia pelos conhecimentos transmitidos.

A Universidade Federal de Santa Maria - UFSM e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar um grande sonho.

Ao Paulo Ricardo e Gustavo, funcionários do PPGCF, pela colaboração, pela paciência, dedicação e disposição em ajudar.

A professora Maria Beatriz e ao professor Rafael Noal Moresco, que dedicaram seu tempo, seus conhecimentos, suas experiências para que eu conseguisse executar o projeto. A vocês fica um muito obrigado especial, pois foram grandes mestres conduzindo este trabalho com dedicação, empenho, me espelho em seus exemplos para conduzir meus trabalhos como professor.

A todos os voluntários desta pesquisa que gentilmente cederam seu tempo, amostras biológicas para a confecção deste estudo. Vocês foram essenciais e são merecedores do meu muito obrigado

Enfim, a todos que de uma forma outra contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho deixo do fundo do meu coração o meu MUITO OBRIGADO.

Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

(Cora Carolina)

## RESUMO

Tese de doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES SÉRICOS E SALIVARES E DO POLIMORFISMO DO GENE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) NA OBESIDADE ADULTO JOVEM**

AUTOR: Eduardo Ottobelli Chielle

ORIENTADORA: Maria Beatriz Moretto

CO-ORIENTADOR: Rafael Noal Moresco

DATA E LOCAL DE DEFESA: Santa Maria, 20 de novembro de 2015.

A obesidade e o excesso de peso são complexas síndromes clínicas responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, pois são fatores de risco para o desenvolvimento de Síndrome Metabólica, Diabetes mellitus, dislipidemia, aterosclerose, hipertensão arterial, resistência à insulina, câncer entre outros. Vários mecanismos podem contribuir para o excesso de peso e obesidade, incluindo uma produção anormal de adipocinas, o estresse oxidativo, respostas pró-inflamatórias e inflamatórias, polimorfismos, fatores ambientais e emocionais. O objetivo deste estudo foi investigar potenciais biomarcadores séricos e salivares e o polimorfismo do gene da Glutathione-S-Transferase P1 (GSTP1) na obesidade adulto jovem. Através de um delineamento transversal foram selecionados 149 adultos jovens entre 18 e 30 anos de ambos os sexos (54 de peso normal, 27 com sobrepeso e 68 obesos). A antropometria e parâmetros bioquímicos, inflamatórios, oxidativos séricos e salivares foram avaliados assim como a frequência do polimorfismo Ile<sup>105</sup>Val do gene do GSTP1. Os indivíduos obesos apresentaram níveis séricos mais baixos de antioxidantes, adiponectina, HDL-c e níveis mais elevados de marcadores inflamatórios (PCR-us, IL-6, resistina, RBP-4, ADA, DPP-IV), peroxidação lipídica e de parâmetros bioquímicos. A atividade salivar da ADA, DPP-IV, a peroxidação lipídica foram maiores nos pacientes obesos quando comparados com o grupo de peso normal. Níveis elevados de resistina, RBP-4, IL-6, ADA, DPP-IV, peroxidação lipídica e níveis reduzidos de adiponectina e antioxidantes podem favorecer a inflamação e o estresse oxidativo em organismos obesos e contribuir para a diminuição da sensibilidade insulínica, aterosclerose e outras consequências cardiometabólicas. A atividade da ADA e da DPP-IV, bem como, a peroxidação lipídica salivar podem estar relacionados com a regulação do metabolismo da glicose e inflamação na obesidade, uma vez que estes sistemas enzimáticos podem interferir em funções do tecido adiposo, através da ação lipolítica e da redução dos níveis de adenosina. A associação positiva entre o polimorfismo do GSTP1 e obesidade foi observada, onde o genótipo GG foi encontrado apenas no grupo obeso e portadores de pelo menos um alelo G apresentaram 2,4 vezes mais chance de obesidade quando comparados com o genótipo AA, indicando que o polimorfismo do gene GSTP1 pode desempenhar um papel significativo no aumento da susceptibilidade e risco de obesidade. Assim, conclui-se que os biomarcadores estudados e o polimorfismo do GSTP1 possam ser ferramentas úteis na identificação de alterações envolvidas nos processos inflamatórios e na resistência insulínica presente nos grupos estudados, cuja relevância clínica é de extrema importância na prevenção da obesidade da população jovem brasileira.

**Palavras-chave:** Obesidade. Inflamação. Saliva. Polimorfismo. Biomarcadores. Adulto-Jovem.



## **ABSTRACT**

Doctoral thesis  
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **EVALUATION OF POTENTIAL BIOMARKERS SERUM AND SALIVARY AND POLYMORPHISM GENE OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) IN YOUNG ADULT OBESITY**

AUTHOR: Eduardo Ottobelli Chielle

ADVISOR: Maria Beatriz Moretto

CO- ADVISOR: Rafael Noal Moresco

PLACE AND DATE: Santa Maria, November 20, 2015.

Obesity and overweight are complex clinical syndromes responsible for high morbidity and mortality throughout the world, as they are risk factors for the development of Metabolic Syndrome, diabetes mellitus, dyslipidemia, atherosclerosis, hypertension, insulin resistance, cancer among others. Various mechanisms may contribute to excessive weight and obesity, including an abnormal production of adipokines, oxidative stress, pro-inflammatory and inflammatory responses, polymorphisms, emotional and environmental factors. The objective of this study was to investigate potential serum biomarkers and salivary and gene polymorphism of glutathione-S-transferase P1 (GSTP1) in young adult obesity. Through a cross-sectional study were selected 149 young adults between 18 and 30 years of both sexes (54 of normal weight, 27 overweight and 68 obese). The anthropometric and biochemical parameters, inflammatory, oxidative serum and saliva were evaluated as Ile<sup>105</sup>Val the frequency of the polymorphism of the GSTP1 gene. Obese subjects had lower serum levels of antioxidants, adiponectin, HDL-C and increased levels of inflammatory markers (CRP, IL-6, resistin, RBP-4, ADA, DPP-IV), lipid peroxidation and biochemical parameters. Salivary activity of ADA and DPP-IV, as well as lipid peroxidation were higher in obese patients when compared with the normal weight group. High levels of resistin, RBP-4, IL-6, ADA, DPP-IV, lipid peroxidation and reduced levels of adiponectin and antioxidants can promote inflammation and oxidative stress in obese bodies and contribute to a decrease in insulin sensitivity, atherosclerosis and other cardiometabolic consequences. The activity of ADA and DPP-IV, as well as salivary lipid peroxidation may be related to the regulation of glucose and inflammation in obesity metabolism, since these enzyme systems may interfere with the adipose tissue functions by lipolytic action and reduction of adenosine levels. The positive association between the polymorphism of GSTP1 and obesity was observed, the GG genotype was found only in the obese group and those with at least one G allele had 2.4 times greater risk of obesity compared with the AA genotype. The results indicate that the polymorphism of the GSTP1 gene may play a significant role in increasing the susceptibility to and risk of obesity. It concludes that the studied biomarkers and polymorphisms of GSTP1 can be used to identify changes involved in inflammation and insulin resistance which the clinical relevance is extremely important in preventing obesity of young Brazilian population.

**Keywords:** Obesity. Inflammation. Saliva. Polymorphism. Biomarkers. Young-Adult.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – Adenosina deaminase  
Adipo 1 - Adiponectina 1  
Adipo 2 - Adiponectina 2  
Ado - Adenosina  
AGL - Ácidos Graxos livres  
AIDS - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
ALT - Alanina aminotransferase  
AMP – Adenosina Monofosfato  
ATP - Adenosina trifosfato  
AST - Aspartato aminotransferase  
AVC - Acidente Vascular Cerebral  
BPDE - Benzopireno Diol Epóxido  
CA - Circunferência Abdominal  
CC - Relação cintura quadril  
CD4<sup>+</sup> - Linfócitos CD4  
CD8<sup>+</sup> - Linfócitos CD8  
CP - Circunferência do pescoço  
DAC - Doença Aterial Coronariana  
DCV - Doença Cardiovascular  
DHGNA- Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica  
DM - Diabetes *mellitus*  
DM2 - Diabetes *mellitus* Tipo 2  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DPP-IV - Dipeptidil Peptidase IV  
ET-1 - Endotélio 1  
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio  
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio  
FCG - Fluído Crevicular Gengival  
Fe<sup>++</sup> - Íons Ferroso  
GIP - Peptídeo Inibitório Gástrico  
GLUT-4 - Transportador de Glicose 4  
GMe - Glicemia Média Estimada  
GSH - Glutathiona  
GSSG - Glutathiona reduzida  
GST - Glutathiona S-Transferase  
GSTM1 – Glutathiona S-Transferase Mu 1  
GSTP1 – Glutathiona S-Transferase Pi 1  
GSTT1 – Glutathiona S-Transferase Teta 1  
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
HbA<sub>1c</sub> – Hemoglobina Glicada  
HDL-c - Lipoproteína de alta densidade  
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana  
HOMA - Modelo de avaliação da Homeostase da Resistência Insulínica  
HNO<sub>2</sub> - Ácido Nitroso  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IgA - Imunoglobulina A

IL-1 - Interleucina 1  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta  
IL-6 - Interleucina 6  
IMC - Índice de Massa Corporal  
IR - Receptor de Insulina  
IRS1 - Substrato de Receptor de Insulina 1  
kDa - Quilodaltons  
LDL-c - Lipoproteína de baixa densidade  
MDA – Malondialdeído  
NF $\kappa$  $\beta$  - Fator Nuclear Kappa Beta  
N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido Nitroso  
NO<sup>-</sup> - Óxido Nítrico  
NO<sub>2</sub> - Nitritos  
NO<sub>3</sub> - Nitratos  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Oxigênio  
OH<sup>-</sup> - Hidroxila superóxido  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
ONOO - Peroxinitritos  
PAI-1 - Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1  
PAd - Pressão Arterial Diastólica  
PAs - Pressão Arterial Sistólica  
PCR - Proteína C Reativa  
PIK3 - Fosfatidilinositol-3-quinase  
PKC - Proteína quinase C  
QUICK - Índice de Verificação Quantitativa da Sensibilidade à insulina  
RBP4 - Proteína de ligação com o Retinol 4  
RI - Resistência Insulínica  
RO<sup>-</sup> - Alcoxila  
ROO<sup>-</sup> - Peroxila  
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio  
SI - Sensibilidade Insulínica  
SH – Grupamentos sulfrídricas  
SM – Síndrome Metabólica  
TAB - Tecido Adiposo Branco  
TAM - Tecido Adiposo Marrom  
TBARS – Espécies Reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TFN- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa  
VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico  
5'NT - 5'nucleotidase  
 $\gamma$ -GT - Gama-glutamyltransferase

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Gráfico 1 - Estimativa do excesso de peso e obesidade por gênero no Brasil.	21
Figura 1 - Via de sinalização insulínica .....	23
Figura 2 - Quadro conceitual da patogenia da obesidade na etiologia do diabetes .....	25
Figura 3 - Principais ações metabólicas da adiponectina .....	27
Figura 4 - Mecanismo proposto para a relação entre adiponectina e aterosclerose .....	28
Figura 5 - Mecanismo de ação da RBP4 derivada do tecido adiposo no fluxo da glicose no músculo e no fígado .....	31
Figura 6 - Principais adipocinas e suas categorias funcionais .....	32
Figura 7 - Adipocitocinas e componentes celulares do tecido adiposo .....	33
Figura 8 - Vias de produção, metabolismo e transporte de adenosina .....	36
Figura 9 - A) Estrutura da ADA. B) Estrutura Tridimensional da enzima, com o sítio ativo no centro da estrutura, e as cadeias laterais polares e não polares em rosa e amarelo, respectivamente .....	36
Figura 10 - Catabolismo dos nucleotídeos purínicos .....	37
Figura 11 - O gene da GSTP1 constituído de 7 exons. O polimorfismo ocorre através da troca do nucleotídeo adenina (A) pela guanina (G) no exon 5, resultando na substituição do aminoácido isoleucina por valina na posição 105 .....	45
Figura 12 - Principais componentes da saliva total .....	47

### ARTIGO 1

Figure 1 - Salivary analysis in the population studied. A: Salivary ADA activity; B: Salivary DPP-IV activity; C: Salivary lipid peroxidation .....	62
---	----

### MANUSCRITO 1

Figure 1 - TBARS levels in the groups studied .....	81
Figure 2 - SH groups levels in the groups studied .....	81
Figure 3 - GSTP1 gene polymorphism in obeses and non obeses subjects. Genotyping of GSTP1 Ile <sup>105</sup> Val by PCR on 1.5% agarose gel, which distinguishes between the GSTP1 genotypes: AA (Ile/Ile) – lines 1,2,5 and 7 (176 bp); AG (Ile/Val) – lines 3 and 4 (176, 91 and 85 bp); GG (Val/Val) – line 6 .....	82
Figure 4 - GSTP1 gene polymorphism in obeses and non obeses subjects. Frequency distribution of genotypes in the population studied ...	82

### MANUSCRITO 2

Figure 1A - Plasma levels of Adiponectin .....	103
Figure 1B - Plasma levels of Resistin .....	104
Figure 1C - Plasma levels of RBP-4 .....	104

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Biomarcadores identificados na saliva e suas potenciais utilizações .....	52
--	----

### ARTIGO 1

Table 1 - Baseline characteristics of study participants .....	61
Table 2 - Biochemical characteristics of the experimental groups .....	63

### MANUSCRITO 1

Table 1 - Baseline characteristics of study participants .....	82
Table 2 - Biochemical profiles of study participants .....	84
Table 3 - Anthropometric variables comparison between study groups with different Ile <sup>105</sup> Val polymorphism of the GSTP1gene .....	84
Table 4 - Biochemical variables comparison between study groups with different Ile <sup>105</sup> Val polymorphism of the GSTP1gene .....	85

### MANUSCRITO 2

Table 1 - Baseline characteristics of study participants .....	105
Table 2 - Biochemical characteristics of the experimental groups .....	106

## SUMÁRIO

	<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	Obesidade: Considerações Gerais .....	19
1.2	Complicações da Obesidade .....	21
1.3	Obesidade e Resistência insulínica.....	22
1.4	Adipocinas e Obesidade .....	26
1.4.1	Adiponectina .....	26
1.4.2	Resistina .....	28
1.4.3	Proteína de ligação ao retinol tipo 4 (RBP4) .....	30
1.5	Obesidade e Inflamação .....	32
1.6	Interleucina-6 e Proteína C reativa na obesidade .....	33
1.7	Sistema Purinérgico .....	35
1.7.1	Adenosina deaminase (ADA) .....	36
1.7.2	Dipeptidil Dipeptidase IV (DPP-IV) .....	39
1.8	Obesidade e Estresse Oxidativo .....	39
1.8.1	Defesas Antioxidantes .....	41
1.8.1.1	Glutathiona S-Transferase (GST) .....	42
1.9	Genética e Obesidade .....	43
1.10	Gene da Glutathiona S-Transferase P1 e seu polimorfismo .....	44
1.11	Saliva .....	46
1.11.1	Fatores que interferem no fluxo salivar e na sua composição .....	48
1.12	Funções da Saliva .....	49
1.12.1	Saliva como amostra biológica para diagnóstico .....	51
1.12.2	ADA e DPP-IV salivar .....	53
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
2.1	Objetivo Geral .....	56
2.2	Objetivos Específicos .....	56
<b>3.</b>	<b>ARTIGO E MANUSCRITOS .....</b>	<b>57</b>
3.1	Artigo 1.....	58
3.2	Manuscrito 1 .....	66
3.3	Manuscrito 2 .....	86
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>107</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>112</b>

## **APRESENTAÇÃO**

O presente trabalho consiste na apresentação dos resultados obtidos para fins de defesa de Tese de Doutorado. Tais resultados são apresentados na forma de um artigo e dois manuscritos. O artigo 1 publicado na revista *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, o manuscrito 1 submetido a revista *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* e o manuscrito 2 submetido a revista *Clinical Biochemistry*.

Este estudo encontra-se organizado da seguinte forma: a primeira parte refere-se à Introdução, Revisão da Literatura e Objetivos, sendo seguida pelas seções Artigo e Manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas são apresentadas no artigo e nos próprios manuscritos. Na sequência, os itens Discussão e Conclusão comentam os resultados obtidos.

As referências bibliográficas utilizadas para as citações dos itens Introdução, Revisão da Literatura e Discussão finalizam o presente trabalho.





Nos últimos anos, ocorreu uma modificação dos hábitos de vida da população, especialmente nos países em desenvolvimento. A industrialização, o tipo de alimentação ingerida, o sedentarismo e a diminuição do gasto energético, bem como, as modificações no estilo de vida potencializaram o aumento da obesidade em todas as faixas etárias (ROSENBAUM; LEIBEL, 2008).

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada pela deposição de gordura anormal ou excessiva no tecido adiposo. Esta característica tem sido identificada como uma situação a ser prevenida, principalmente por estar associada ao desenvolvimento de outras doenças crônicas, como as cardiovasculares, as dislipidemias, a hipertensão arterial sistêmica (HAS), a resistência insulínica (RI), o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e alguns tipos de neoplasias malignas (ACADEMIA AMERICANA DE PEDIATRIA, 2000; MELO, 2011).

A obesidade é uma condição inflamatória crônica subclínica associada com disfunção do sistema imune e aumento do estresse oxidativo (COTTAM et al., 2003; UZUN et al., 2004). Com o aumento do número de adipócitos que possuem atividade secretora ocorre uma produção elevada de adipocinas que promovem a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), componentes do sistema complemento e proliferação leucocitária (MINER, 2004; COSTA; DUARTE, 2006). Estas substâncias após liberadas, estimulam a liberação de outros mediadores como o óxido nítrico (NO) e a Proteína C reativa (PCR). O tecido adiposo expressa e/ou secreta diversas substâncias bioativas, tais como a resistina, a adiponectina, a proteína de ligação do retinol 4 (RBP4) que estão envolvidas em processos metabólicos, imunes e neuroendócrinos especialmente na RI e no desenvolvimento de doenças crônicas (KERSHAW, 2004; TILG, 2006).

Cerca de 50% dos adolescentes obesos tornam-se adultos obesos e cerca de 1/3 dos adultos obesos já o eram quando crianças (ROMERO e ZANESCO, 2006). Estudos realizados em algumas cidades brasileiras mostraram que o sobrepeso e a obesidade já atingem 30% ou mais das crianças e adolescentes. Estimativas indicam que nos próximos anos o Brasil será o quinto país no mundo a ter problemas de obesidade em sua população (WHO, 2012).

O Ministério da Saúde e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgaram dois grandes levantamentos dos números do excesso de peso e obesidade no Brasil, um deles o VIGITEL Brasil 2014 (Vigilância de Fatores de Risco

e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), mostrou que 52.5% dos brasileiros estão acima do peso ideal e 17,9% são obesos. A frequência de excesso de peso é maior entre homens (56,5%) do que entre mulheres (43,5%). O aumento foi maior entre as faixas etárias de 35-44 e 45-54 anos para o sobre peso e entre as faixas etárias de 35-44 e 55-64 anos para obesidade, sendo que quanto menor a escolaridade maiores os índices de sobre peso e obesidade. O outro estudo o POF (Programa da Organização Familiar) 2008-2009, evidenciou que entre os adultos a Região Sul foi a que apresentou as maiores frequências, tanto de excesso de peso (56,8% de homens, 51,6% de mulheres), quanto de obesidade (15,9% de homens e 19,6% de mulheres) (IBGE, 2009; Ministério da Saúde, 2014).

As complicações da obesidade surgiam apenas em idades avançadas, porém, nas últimas décadas têm-se observado cada vez mais precocemente. Um exemplo é o DM2, que está sendo diagnosticado em crianças e adolescentes, associado ao crescimento da obesidade infantil, ao aumento da gordura visceral e a menor massa muscular (SHIM et al., 2010).

Evidências sugerem que polimorfismos nos genes da Glutathione-S-transferase, enzima que pertence a um grupo de multigenes produtores de enzimas detoxificadoras que defendem as células contra uma ampla variedade de insultos tóxicos, como produtos químicos e estresse oxidativo, podem contribuir para o desenvolvimento de DM2. Variações individuais nestes genes podem alterar a eliminação de intermediários tóxicos para DNA, podendo aumentar a susceptibilidade de danos oxidativos nas células  $\beta$  pancreáticas. Um destes polimorfismos pode ocorrer com o GSTP1 (Glutathione S-Transferase P1) onde o alelo A é substituído pelo alelo G no éxon 5, códon 105, levando a substituições de aminoácidos, e reduzindo desta forma a capacidade da glutathione conjugar espécies reativas favorecendo a sensibilização das células e o dano celular (WANG et al., 2006; MAHMOUD et al., 2012).

Diante do aumento descontrolado da obesidade e do sobrepeso e o surgimento de comorbidades cada vez mais precoces decorrentes destes distúrbios, o objetivo deste estudo foi investigar potenciais biomarcadores séricos e salivares e o polimorfismo de gene da GSTP1 na obesidade adulto jovem.

## 1.1 Obesidade: considerações gerais

A obesidade é definida como um excesso de tecido adiposo em relação a massa magra, que pode ocorrer de modo regional ou generalizado. Esta doença está cada vez mais comum e sua prevalência atinge proporções epidêmicas. A obesidade pode ser calculada pelo IMC (Índice de Massa Corporal). No adulto, os valores do IMC para sobrepeso se situam entre 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> e para obesidade, maiores ou iguais a 30 kg/m<sup>2</sup> (NIH, 1998). Essas estimativas foram definidas a partir da relação entre o IMC e a morbimortalidade, o que não pode ser aplicado facilmente em crianças, porque as complicações da obesidade infanto-juvenil são manifestadas com maior frequência na vida adulta (WHO, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A etiologia da obesidade é multifatorial. Os avanços tecnológicos que ocorreram após a Revolução Industrial potencializaram o sedentarismo. Além da diminuição das atividades físicas diárias (BOREHAM, 2001), afetaram também a qualidade e a quantidade da alimentação (BRADY et al., 2000), tanto em crianças e adolescentes como nos adultos, contribuindo para o aumento na prevalência da obesidade da população mundial (SLYPER, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a obesidade está fortemente associada a um risco maior de desfechos negativos, sejam cardiovasculares, câncer ou mortalidade. No estudo National Health and Nutrition Examination Study III (NHANES III), que envolveu mais de 16 mil participantes, a obesidade foi associada a um aumento da prevalência de DM2, doença da vesícula biliar, doença arterial coronariana (DAC), HAS, osteoartrose e dislipidemia (MELO, 2011).

Condições crônicas, como doença renal, osteoartrose, câncer, DM2, apneia do sono, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), HAS e, Doença Cardiovascular (DCV), estão diretamente relacionadas com incapacidade funcional e com a obesidade. A obesidade acarreta redução da qualidade e na expectativa de vida e aumento da mortalidade (BOREHAM, 2001).

Outro fator importante associado a obesidade é a Síndrome metabólica (SM) que tem sido objeto crescente de preocupação em todo o mundo, uma vez que está relacionada com o aumento do risco de doenças cardiovasculares (LAKKA et al., 2002). Tal síndrome é caracterizada pela presença concomitante de dislipidemia, distúrbio da tolerância à glicose, hipertensão arterial, excesso de peso ou obesidade

abdominal, além de outras anormalidades (SBH, 2004). A resistência à insulina parece ser o elo entre as alterações presentes na SM a qual pode estar vinculada ao aumento da deposição de gordura visceral (ECKEL, 2005)

O excesso de gordura abdominal é uma parte fundamental da constelação de fatores de risco para SM e está fortemente associada ao risco de DM2. Uma análise realizada pelo Dallas Heart Study mostrou que o IMC aumentado está significativamente associado à SM em pacientes diabéticos. Estudos em pacientes com aterosclerose mostraram que a obesidade abdominal foi o componente mais fortemente associado ao risco do DM2 e dados de estudos europeus determinaram a associação entre SM e adiposidade abdominal sendo observado que os pacientes com SM eram os mais obesos e tinham maior prevalência de DM2 do que os participantes não obesos (MELO, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, 1,5 bilhão de adultos, com 20 anos ou mais estavam acima do peso ( $IMC >25 \text{ kg/m}^2$ ). Destes, mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres foram classificados como obesos ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ). As projeções para 2025 são de aproximadamente 2,3 bilhões de adultos apresentem sobrepeso e 700 milhões com obesidade (WHO, 2012).

O levantamento mais recente do Ministério da Saúde revela novamente que cresce o número de pessoas com excesso de peso e de obesidade no Brasil, conforme mostra o gráfico 1, mais da metade da população apresenta-se com excesso de peso e 17,9% são obesos e que nos últimos nove anos ocorreu um aumento de 23% no excesso de peso e obesidade. Dados indicam que a escolaridade se mostra um forte fator de proteção entre o público, pois o percentual de excesso de peso em pessoas com até oito anos de estudo é de 58,9%, caindo para 45% nas pessoas com escolaridade de no mínimo 12 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Um estudo que acompanhou 6.502 dinamarqueses adultos jovens por 33 anos revelou que adultos jovens obesos têm um risco duas vezes maior de morrer antes de completar 55 anos, em comparação aos que têm um peso normal. De acordo com a pesquisa, a obesidade está diretamente relacionada a eventos cardiometabólicos antes dos 55 anos, incluindo trombose venosa. Os homens jovens e obesos tiveram ainda riscos quase 30% mais elevados de desenvolver DM2 e de morrer por problemas cardiovasculares. A obesidade foi associada a riscos 28%

maiores para problemas de saúde. Os riscos para DM2 foram oito vezes maiores, quatro vezes maiores para tromboembolismo e duas vezes maiores para hipertensão, infarto do miocárdio e morte. O estudo iniciou quando os pacientes possuíam 22 anos e antes de completar 55 anos de idade, 48% dos homens que tinham sido diagnosticados como obesos aos 22 anos de idade desenvolveram algum tipo de patologia, como DM2, hipertensão, infarto do miocárdio, derrame, trombose venosa ou haviam morrido. Em comparação com os homens de peso normal, os jovens obesos tinham 28% mais riscos de algum problema de saúde. Cada ponto a mais do IMC correspondeu a um risco 5% maior de infarto, 10% maior de hipertensão ou presença de coágulos nas veias e 20% maior de diabetes tipo 2. (SCHMIDT et al., 2013)

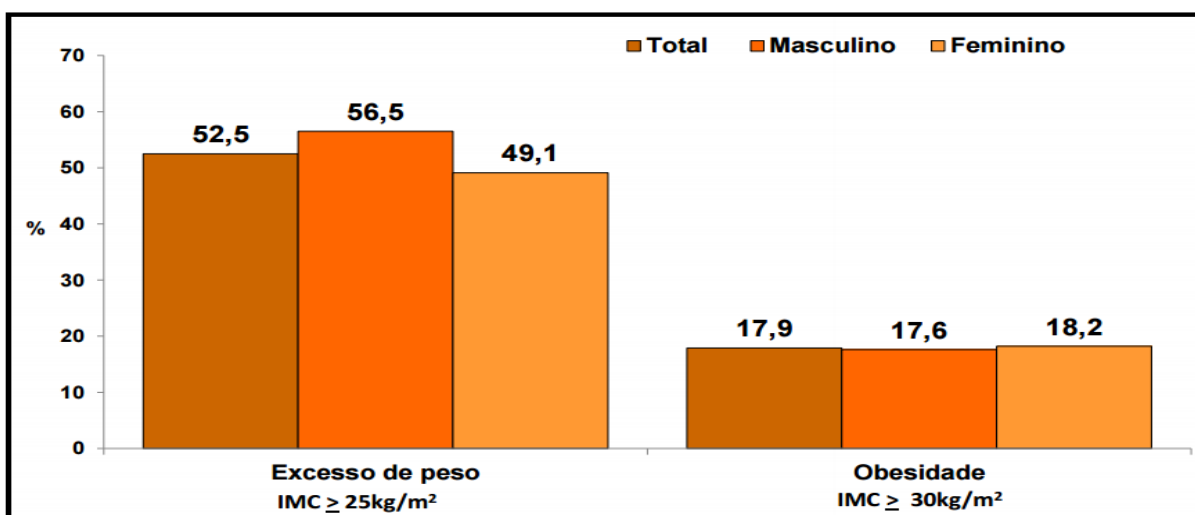


Gráfico 1: Estimativa do excesso de peso e obesidade por gênero no Brasil. Fonte: Vigitel 2014, Ministério da Saúde (2015).

## 1.2 Complicações da obesidade

A obesidade adulto jovem é considerada um problema de saúde pública porque pode estar associada a doenças crônicas que podem ocorrer já na juventude tendendo a persistir na vida adulta, ou então manifestar-se na vida adulta, com grande morbidade e alta mortalidade (LI et al., 2004; LISSAU et al., 2004).

Em obesos, as manifestações cardiovasculares mais frequentes são a HAS, encontrada em 11 a 35% dos indivíduos, as dislipidemias, em 40 a 60% dos casos, a RI, em 30 a 55% dos obesos (FUJIMURA, 2002; LIMA et al., 2004; SOROF et al., 2004), a intolerância à glicose, em 20 a 25 % e o DM2, em 4% dos obesos (SINHA et al., 2002). Alterações no metabolismo da glicose, dos lipídios, o aumento da

resistência e a diminuição da sensibilidade à insulina, assim como doenças cardiovasculares, apresentam forte relação com a distribuição central de tecido adiposo nos adultos (LARSON et al., 1984; KELLEY et al., 2000). De forma semelhante essa relação pode ser observada em crianças e adolescentes que também apresentam distribuição de gordura do tipo central (BJÖMTORP, 1991).

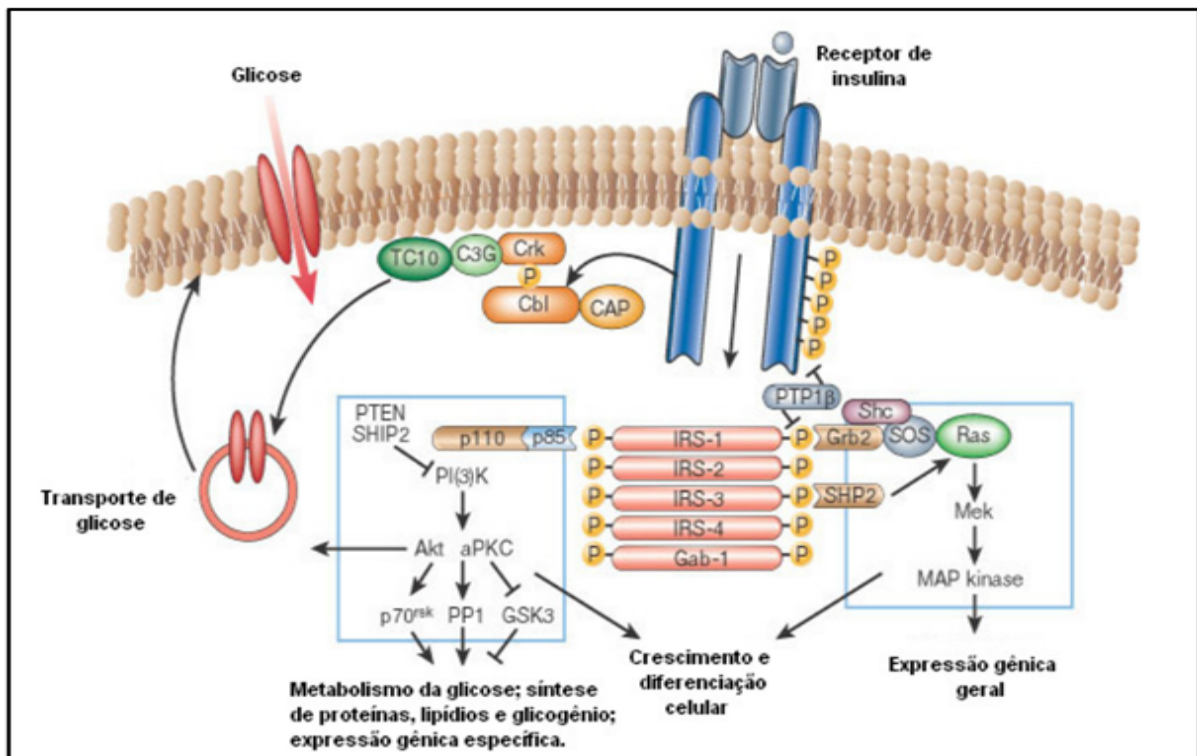
A obesidade é uma condição que altera a diversidade da microbiota intestinal e, conseqüentemente e sabe-se que a microbiota intestinal desempenha um importante papel na modulação dos sistemas digestivo, endócrino e imunológico (DE SOUZA et al., 2015). A evidência de que a composição da microbiota intestinal pode ser diferente em humanos magros e obesos levou à especulação de que a microbiota intestinal pode participar na fisiopatologia da obesidade e por isso diferentes mecanismos foram propostos para tentar explicar a correlação entre a microbiota intestinal e obesidade. De modo geral foram propostos três mecanismos sendo primeiro que consiste no papel da microbiota intestinal na extração de energia de polissacarídeos não digeríveis, o segundo envolve a modulação dos níveis de lipopolissacarídeo pela microbiota intestinal, o que desencadeia uma inflamação crônica subclínica que acarreta obesidade e diabetes e o terceiro mecanismo propõe que a microbiota intestinal pode induzir a regulação de genes do hospedeiro que modulam como a energia é gasta armazenada (TSUKUMO et al., 2013)

Estudos como o de Ley et al., (2005) têm associado a microbiota intestinal com a obesidade, neste estudo foi demonstrado que camundongos *ob/ob* tinham em sua microbiota 50% menos bacteroidetes e maior proporção de firmicutes quando comparados a camundongos magros. Quando estes eram submetidos a dieta para perda de peso, a sua microbiota se tornava muito similar à dos camundongos magros. Em um estudo posterior se observou comportamento semelhante em humanos (LEY et al., 2006).

### **1.3 Obesidade e Resistência insulínica**

A insulina participa de vários processos celulares como o metabolismo da glicose, proteínas e lipídios, crescimento e diferenciação celular, dentre outros. Uma das ações da insulina é aumentar o transporte de glicose nos tecidos muscular e adiposo, promovendo a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4). A

sinalização intracelular da insulina inicia-se com a sua ligação ao receptor de insulina (IR). O IR apresenta atividade tirosina quinase intrínseca e é autofosforilado quando ligado à insulina. Em sequência, o IR fosforila resíduos de tirosina de vários substratos proteicos, incluindo resíduos de tirosina do receptor IRS-1 (PESSIN; SALTIEL, 2000). O IRS-1 fosforilado associa-se com a Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e esta interação resulta na formação do segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato que ativa a proteína quinase B (Akt/PKB) que fosforila e inibe uma proteína que apresenta um domínio GAP (GTPases activating protein), induzindo a reorganização do citoesqueleto e a translocação do GLUT-4 para a membrana da célula, aumentando assim a captação de glicose pelas células dos tecidos adiposo e muscular, conforme mostra a figura 1 (BAUMANN et al., 2000; WATSON e PESSIN, 2007).



**Figura 1:** Via de sinalização insulínica. Fonte: Adaptado de Taniguchi et al., (2006).

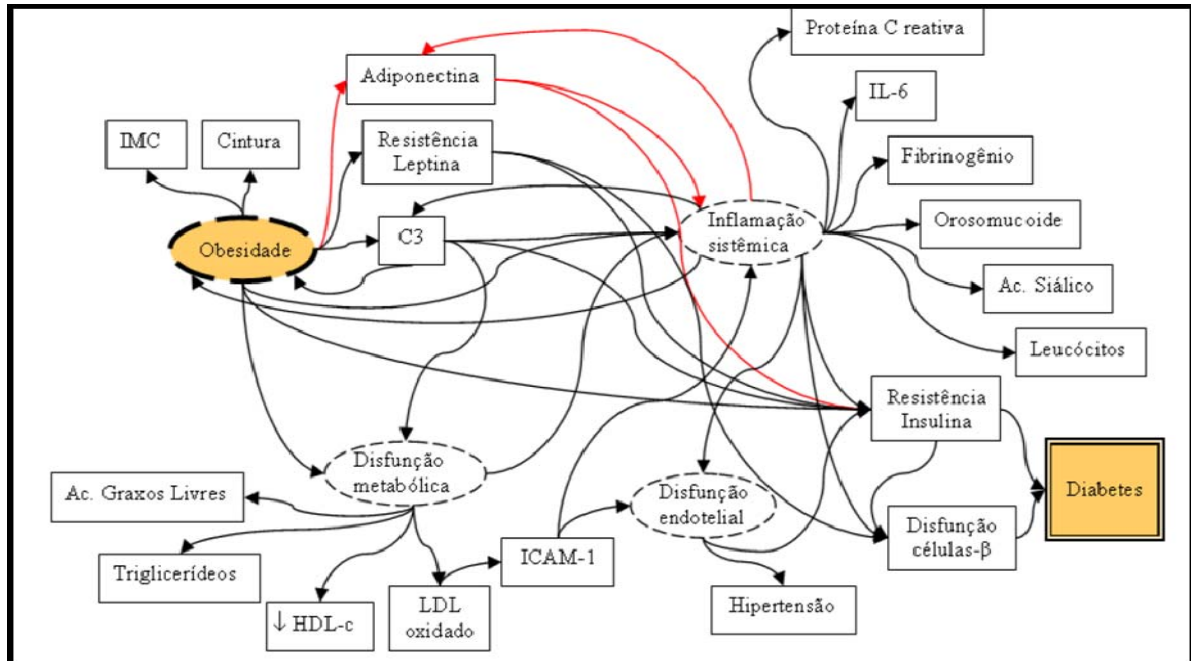
A obesidade pode induzir um estado de RI, que é clinicamente definida como a redução da capacidade de insulina no processo de absorção de glicose plasmática pelas células alvos (adipócitos, músculo estriado e fígado) (BUSE, 2006). A RI induz um processo crônico de hiperglicemia e hiperinsulinemia, os quais contribuem para hipertensão, doenças renais, cardiovasculares e DM2 (BUSE, 2006; HOEHN et al., 2009).

As concentrações plasmáticas dos ácidos graxos livres (AGL) que transitam da veia porta para o fígado modulam a sensibilidade insulínica (SI) e a produção hepática de glicose (CARVALHEIRA et al., 2002). A maior disponibilidade de AGL, decorrente da maior ingestão de lipídios e da lipólise visceral, provoca a competição dos ácidos graxos e da glicose para serem utilizados pelas células musculares. Dessa forma, as células utilizam os AGL como substrato preferencial, produzindo um feedback negativo sobre as glicogenólises muscular e hepática, resultando em uma menor necessidade de utilizar e de estocar a glicose. O excesso intramuscular de ácidos graxos também diminui a ativação da enzima PI3K, alterando a sinalização insulínica e provocando a RI (VIRKAMÄKI et al., 2001). Existem também diferenças genéticas, raciais e de sexo que podem interferir na secreção e sensibilidade à insulina (GOLDEN et al., 2012).

O tecido adiposo regula o metabolismo corpóreo liberando AGL e adipocinas, como a leptina, resistina e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-6 (KAHN et al., 2006). Na obesidade a produção desses metabólitos está alterada associada a um quadro crônico de inflamação de baixo grau, que leva a um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e de produtos adicionais de macrófagos infiltrados no tecido adiposo de indivíduos obesos (KARALIS et al., 2009) (Figura 2). O aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 em adipócitos está associada à diminuição da expressão do receptor de insulina IRS-1 e do transportador de glicose GLUT-4 (ROTTER et al., 2003).

Existem duas hipóteses principais para explicar o desenvolvimento da RI, no músculo esquelético, induzida pela obesidade: a inflamação de baixo grau e a sobrecarga lipídica. Ambos os mecanismos promovem a fosforilação inibitória de IRS-1, através da ação de quinases, desencadeando a RI. Na hipótese da obesidade associada à inflamação de baixo grau, citocinas inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 podem se ligar a receptores específicos na membrana muscular resultando na diminuição da entrada de glicose nas células musculares (TAUBES, 2009). Alguns estudos demonstram essa relação entre adipocinas/citocinas e miócitos e o desenvolvimento da RI (KAMEI et al. 2006; SELL et al., 2009).





**Figura 2:** Quadro conceitual da patogênese da obesidade na etiologia do diabetes. Em vermelho efeito inibitório. Fonte: KARALIS (2009).

Quanto à sobrecarga lipídica, a não inibição da lipólise que acontece no tecido adiposo resistente a insulina, aumenta a taxa de ácidos graxos plasmáticos livres. A maior disponibilidade de ácidos graxos livres pode aumentar a quantidade de gordura ectópica em outros locais que não o tecido adiposo, como no músculo esquelético, e os metabólitos desses lipídios estariam envolvidos com o desenvolvimento da RI nesse tecido (UNGER e ORCI, 2000; MATOS, 2012). Esses depósitos de lipídios geram metabólitos bioativos como o diacilglicerol e as ceramidas, que podem ativar a PKC e outras quinases (ITANI et al., 2005). Yu et al., (2004) a partir de estudos *in vitro* e com animais, demonstraram que o aumento das concentrações de ácidos graxos plasmáticos resultou em aumento das concentrações de acil-CoA e diacilglicerol, desencadeando a ativação da PKC e consequente fosforilação inibitória do IRS-1.

Além disso, maior quantidade de ácidos graxos livres e de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas presentes na obesidade, podem desencadear a RI, pela fosforilação inibitória do IRS-1, via ativação de quinases relacionadas ao estresse. De fato, em obesos, a RI correlaciona-se com alterações do sistema imune (MATOS, 2012).

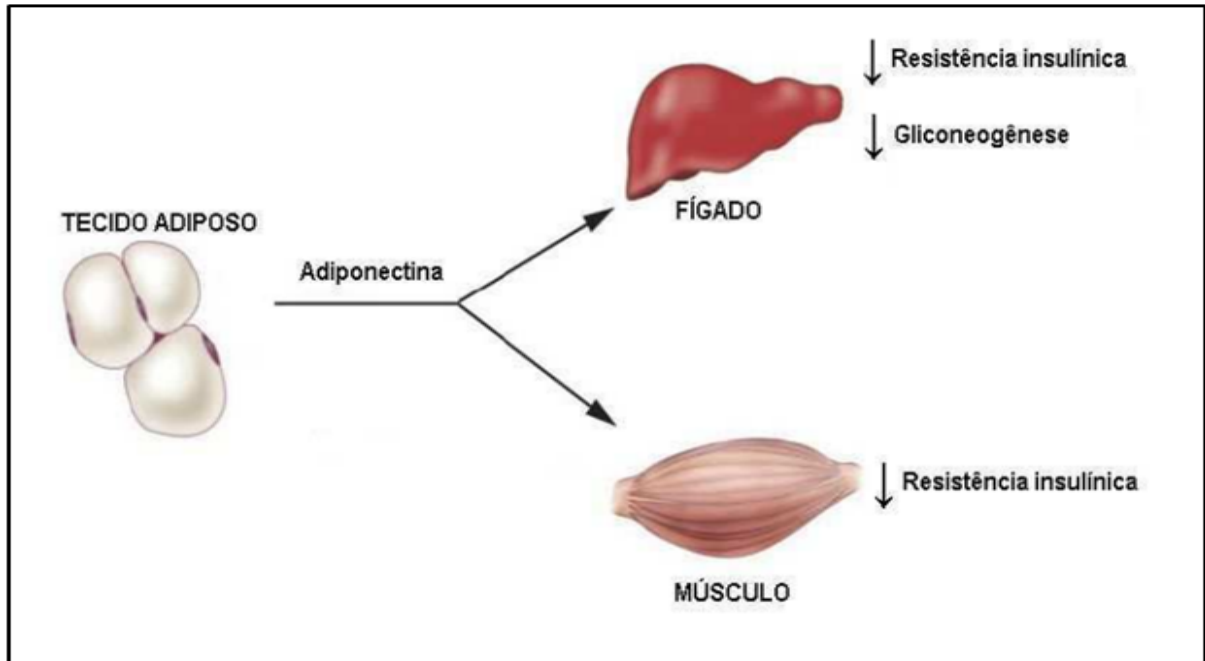
## 1.4 Adipocinas e obesidade

Os adipócitos sintetizam e secretam proteínas chamadas adipocinas. Estas adipocinas são capazes de atuar sobre diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos e sua produção pode ser regulada por estímulos inflamatórios e mediante condições de hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, encontrando-se alterada em quadros de obesidade e síndrome metabólica (GUIMARÃES et al., 2007).

### 1.4.1 Adiponectina

A adiponectina é uma proteína de 244 aminoácidos sintetizada a partir de um gene localizado no cromossoma 3 (3q27), secretada por adipócitos e que circula no plasma (KONDO et al., 2002; BLUHER et al., 2007). Ela representa a proteína mais abundante secretada pelo tecido adiposo branco (RABE et al., 2008). Seus efeitos benéficos são mediados principalmente por dois receptores celulares de membrana, os receptores tipo 1 (AdipoR1) e 2 (AdipoR2). Apesar dos receptores da adiponectina serem encontrados sistemicamente, a importância da expressão de seus subtipos varia conforme o tecido estudado, o que também regula a ação do hormônio (BLUHER et al., 2007; KOS et al., 2010).

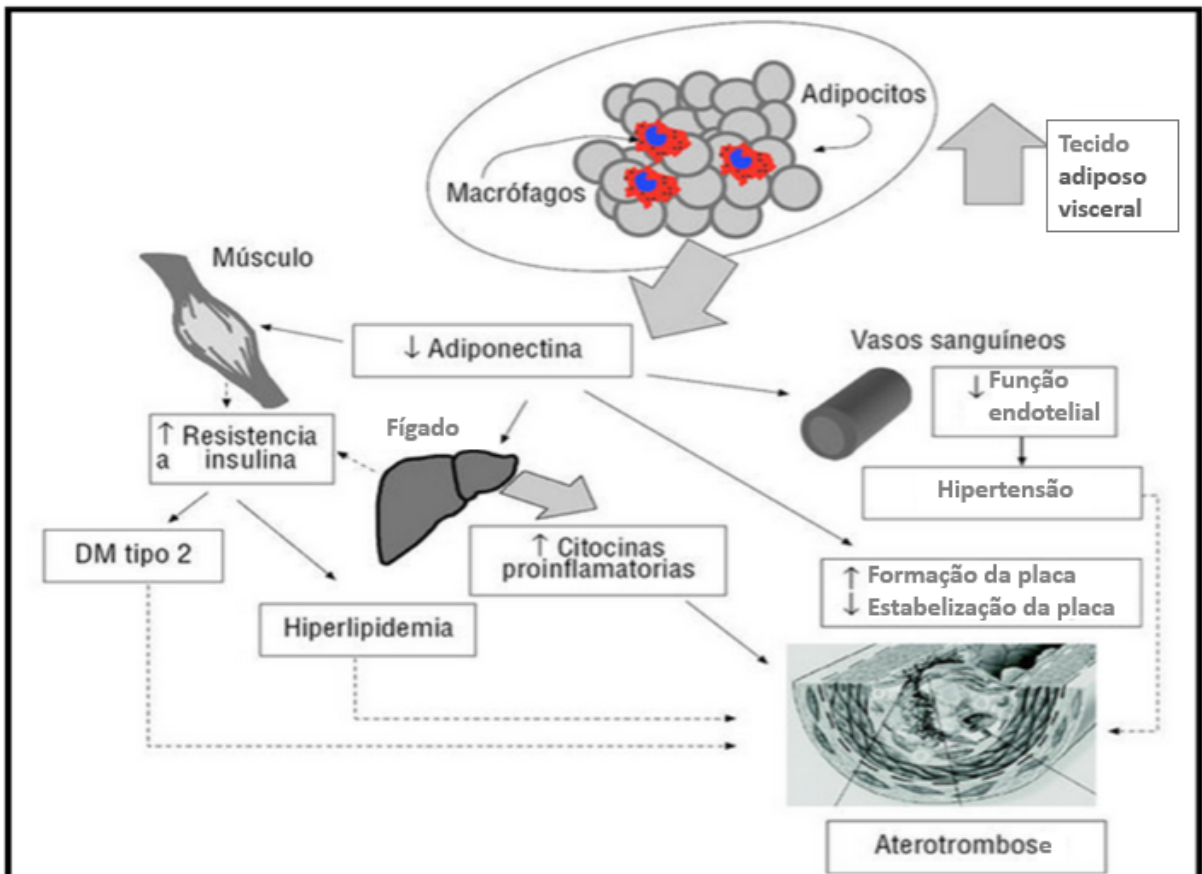
A adiponectina é sintetizada também por miócitos cardíacos e células musculares esqueléticas e endoteliais. É importante salientar que a adiponectina estimula a sensibilidade à insulina e inibe várias etapas do processo inflamatório (TILG et al., 2006). No fígado, ela inibe a expressão das enzimas gliconeogênicas e a taxa de produção endógena de glicose, enquanto, no músculo, aumenta o transporte de glicose e estimula a oxidação dos ácidos graxos, contribuindo em ambos os tecidos para um aumento da sensibilidade insulínica (XU et al., 2003) (Figura 3).



**Figura 3:** Principais ações metabólicas da adiponectina. Fonte: Xu et al., 2003.

Esta adipocina também estimula a degradação de ácidos graxos e o consumo de energia, em parte via ativação do receptor nuclear alfa ativado pelo proliferador de peroxissomo, o que leva a uma diminuição do conteúdo de triglicerídeos dos músculos esqueléticos e fígado, e conseqüentemente a um aumento da sensibilidade à ação da insulina *in vivo* (KADOWAKI et al., 2006). A administração de adiponectina recombinante em roedores resultou em um aumento da captação de glicose, e na oxidação de ácidos graxos no músculo, redução da produção de glicose hepática e uma maior sensibilidade à ação da insulina sistemicamente (RABE et al., 2008).

Os níveis basais baixos de adiponectina são fortes preditores do aparecimento futuro de DM, mesmo após o ajuste para o peso corporal (MATHER et al., 2008; LI et al., 2009). Além disso, os baixos níveis plasmáticos de adiponectina são um dos mais consistentes preditores da progressão, em curto prazo, de doença coronariana aterosclerótica em homens e mulheres assintomáticos como mostra na figura 4 (MAAHS et al., 2005).



**Figura 4:** Mecanismo proposto para a relação entre adiponectina e aterosclerose. Fonte: Adaptado de Vidal e Gomis (2008).

O tecido adiposo, especialmente o visceral, expressa numerosos genes para proteínas secretadas na circulação, entre elas o fator inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), que funciona como um regulador do sistema fibrinolítico. Em modelos animais de obesidade, a expressão do gene relacionado ao PAI-1 encontra-se aumentada. A expansão do tecido adiposo visceral levaria à diminuição da adiponectina circulante e também aumentaria os níveis plasmáticos do PAI-1, assim favorecendo os eventos trombóticos (FUNAHASHI et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2007).

#### 1.4.2 Resistina

A resistina pertence à família de proteínas ricas em cisteína encontradas nos locais de inflamação (STEPPAN et al., 2001). A resistina possui 108 aminoácidos, peso molecular de 12.5 kDa e suas principais fontes produtoras no ser humano são os monócitos e os adipócitos (HEERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; GUIMARÃES et

al., 2007). Esta adipocina é expressa, especialmente no tecido adiposo branco e sua secreção está fortemente relacionada à resistência insulínica (CARVALHO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2007). Realmente, estudos tem demonstrado que em humanos a expressão desta adipocina é reduzida nos adipócitos e elevada nos macrófagos e monócitos, sugerindo um papel inflamatório importante (FANTUZZI, 2005; COSTA, 2006). De fato, o tecido adiposo visceral expressa 15 vezes mais resistina que o subcutâneo abdominal e glúteo-femoral (HEERMSDORFF et al., 2006).

Na obesidade de origem genética e/ou induzida por dieta foi observado níveis aumentados de resistina, caracterizando a associação de ambas com a resistência insulínica (HEERMSDORFF et al., 2006). Estudos realizados com roedores demonstraram que a administração de anticorpos antiresistina diminuem a glicemia e melhoram a sensibilidade insulínica. Por outro lado, a administração desta adipocina em roedores resultou em efeitos contrários, como resistência à insulina e diminuição do transporte de glicose induzido pela insulina (JANKE et al., 2002).

Não foi identificada a expressão genética da resistina em humanos magros, enquanto que, em alguns estudos com obesos, ela foi identificada, porém não foi verificada nenhuma correlação com a massa corporal, adiposidade e resistência à insulina (AZUMA et al., 2003; IQBAL et al., 2005). Outros estudos, no entanto, demonstram correlação positiva entre níveis de resistina circulante e o IMC (AZUMA et al., 2003; DEGAWA-YAMAUCHI et al., 2003).

Níveis elevados de resistina, especialmente quando na presença de diabetes ou hipertensão, parecem ser um fator de risco independente para Acidente Vascular Cerebral (AVC) (OSAWA et al., 2009). Variações na concentração de resistina não parecem estar diretamente ligadas a susceptibilidade para o desenvolvimento de DM2. Porém, a resistina parece desempenhar um papel na patogênese da obesidade e da RI, podendo ambas contribuírem de forma indireta para a DM2 (GHARIBEH et al., 2010). A resistina parece apresentar efeitos pró-diabéticos, como inibição da atividade dos transportadores de glicose (MOON et al., 2003), supressão da expressão ou translocação do GLUT-4, bloqueio dos sinais de transdução da insulina (SHENG et al., 2008), estimulação da produção hepática de glicose e liberação de AGL do tecido adiposo (PRAVENEK et al., 2006).

A resistina possui grande ação aterogênica pelo aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular e antivasculares em células endoteliais vasculares e

também pelo aumento da atividade do fator NF- $\kappa$ B, sinalizador para indução de adesão destas moléculas (HERMSDORFF, 2004)

Primeiramente a resistina foi postulada como contribuinte para a RI, no entanto, estudos indicam, também, que esta adipocina está envolvida no processo inflamatório, sendo que, agentes pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6 e lipopolissacarídeos podem regular a expressão do gene da resistina (PANG, 2006).

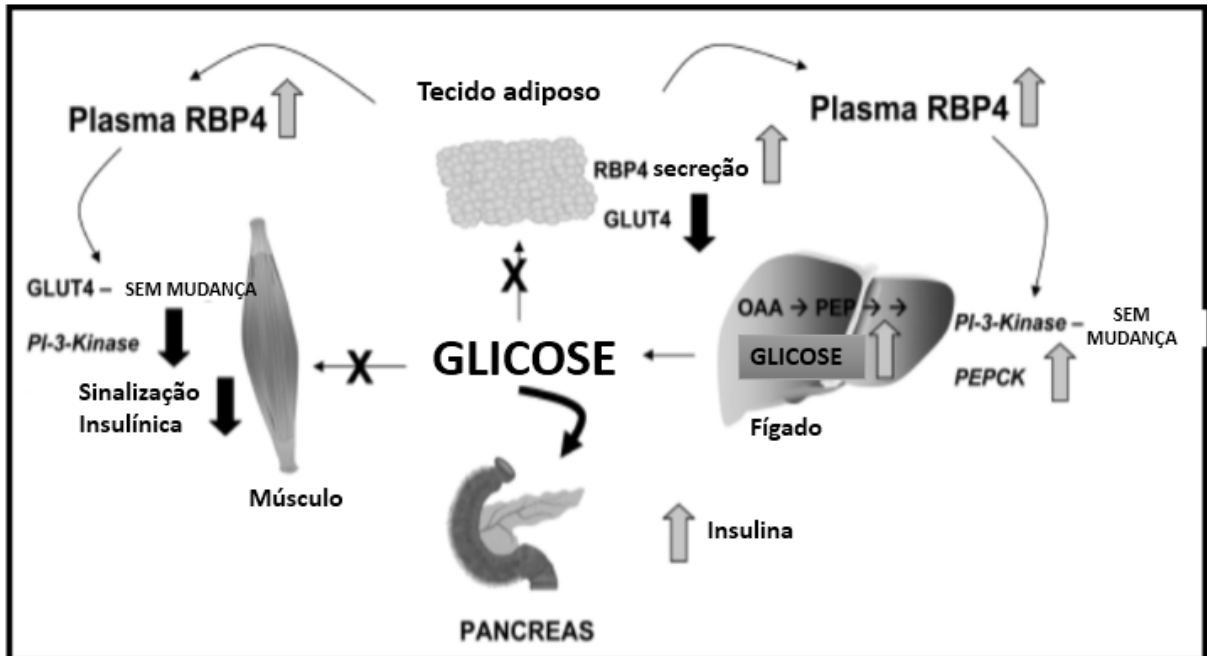
Kunarri et al., (2006) demonstraram que fatores inflamatórios são mais importantes na determinação da concentração plasmática de resistina do que valores de glicose e insulina. Além disso, níveis plasmáticos de resistina foram associados com vários marcadores inflamatórios em condições patológicas (DEGAWA-YAMAUCHI et al., 2003). Quando compara-se indivíduos saudáveis, com indivíduos com sinais severos de inflamação observa-se que estes apresentam níveis significativamente superiores de resistina, sendo encontrada uma correlação positiva entre resistina e outros marcadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-6, bem como, com calcificação de artéria coronariana, sugerindo que a resistina pode representar um elo entre os sinais metabólicos, inflamação e aterosclerose (REILLY et al., 2004). Ideia também proposta por Ohmori et al., (2005), que encontraram associação entre níveis séricos de resistina e a presença e severidade de doença arterial coronariana e também com resistência insulínica.

#### 1.4.3 Proteína de ligação ao retinol tipo 4 (RBP4)

A RBP4, membro da família das lipocalinas, é secretado pelos adipócitos, fígado e macrófagos e, além de transportar retinol para o interior dos tecidos (BROCH et al., 2010), foi demonstrado que níveis elevados de RBP4 podem induzir à RI através da alteração do transportador GLUT-4, da inibição da sinalização da insulina ao nível do tecido muscular e do aumento da liberação de glicose pelo fígado (YANG et al., 2005), bem como pela inibição do IRS-1 ao nível do tecido adiposo (OST et al., 2007).

Como mostra a figura 5 a secreção de RBP4 pelo tecido adiposo desempenha um papel importante na homeostase da glicose. O aumento da RBP4 derivada do tecido adiposo na circulação reduz a entrada de glicose dependente da insulina pelo tecido muscular mediante a atenuação da sinalização da insulina nas células musculares por meio da redução da atividade da PKC e fosforilação do

substrato 1 do receptor da insulina. Em contrapartida, no fígado, a RBP4 não afeta a PKC, mas atua aumentando a expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase, que resulta no aumento da saída da glicose hepática que eleva a glicose plasmática (WOLF e PHIL, 2007).



**Figura 5:** Mecanismo de ação da RBP4 derivada do tecido adiposo no fluxo da glicose no músculo e no fígado. Fonte: Adaptado de Wolf e Phil, 2007.

ULGEN et al, 2010, evidenciou uma correlação positiva entre os níveis de RBP4 com a insulino-resistência em pessoas obesas, com intolerância á glicose e DM2. Enquanto que Shim et al., 2010, não encontraram correlação entre o RBP4 e o índice de RI . Em doentes submetidos a cirurgia bariátrica, verificou-se uma redução acentuada dos níveis de RBP4, o que se correlacionou com a redução de gordura visceral (TSCHONER et al., 2008).

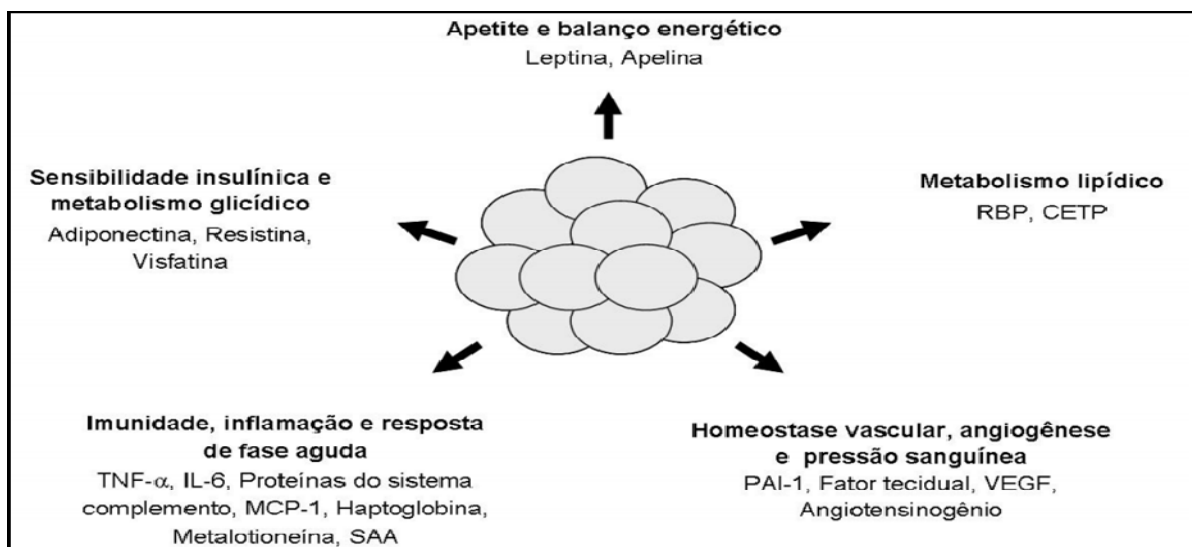
Foi documentada uma correlação positiva entre os níveis desta adipocitocina e o dos triglicéridos (BROCH et al., 2010) e uma associação negativa com o valor de colesterol-HDL (SHIM et al., 2010). A administração de fibratos parece diminuir a expressão de RBP4 no tecido adiposo em pacientes com dislipidemia (WU et al., 2009), podendo justificar a melhoria da insulino-sensibilidade quando da administração deste fármaco.

## 1.5 Obesidade e inflamação

O tecido adiposo humano é subdividido em tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM). O TAB, localizado periféricamente nas regiões subcutânea e visceral, armazena energia na forma de triglicerídeos e participa da regulação do balanço energético mediante processos de lipogênese e lipólise. Histologicamente, ele é composto por adipócitos, células do sistema imune, tecido conjuntivo, nervoso e vascular. O TAM, localizado no sistema nervoso central, apresenta função termogênica, é mais vascularizado, possui maior número de mitocôndrias e diminui com a idade (FONSECA et al., 2006).

Na obesidade ocorre um processo inflamatório de baixo grau no TAB (TRAYHURN, 2004), detectado por duas evidências científicas, a elevação de marcadores e citocinas inflamatórias, bem como, a presença de macrófagos infiltrados neste tecido em indivíduos obesos (BULLÓ et al., 2003; CANCELLO, 2006).

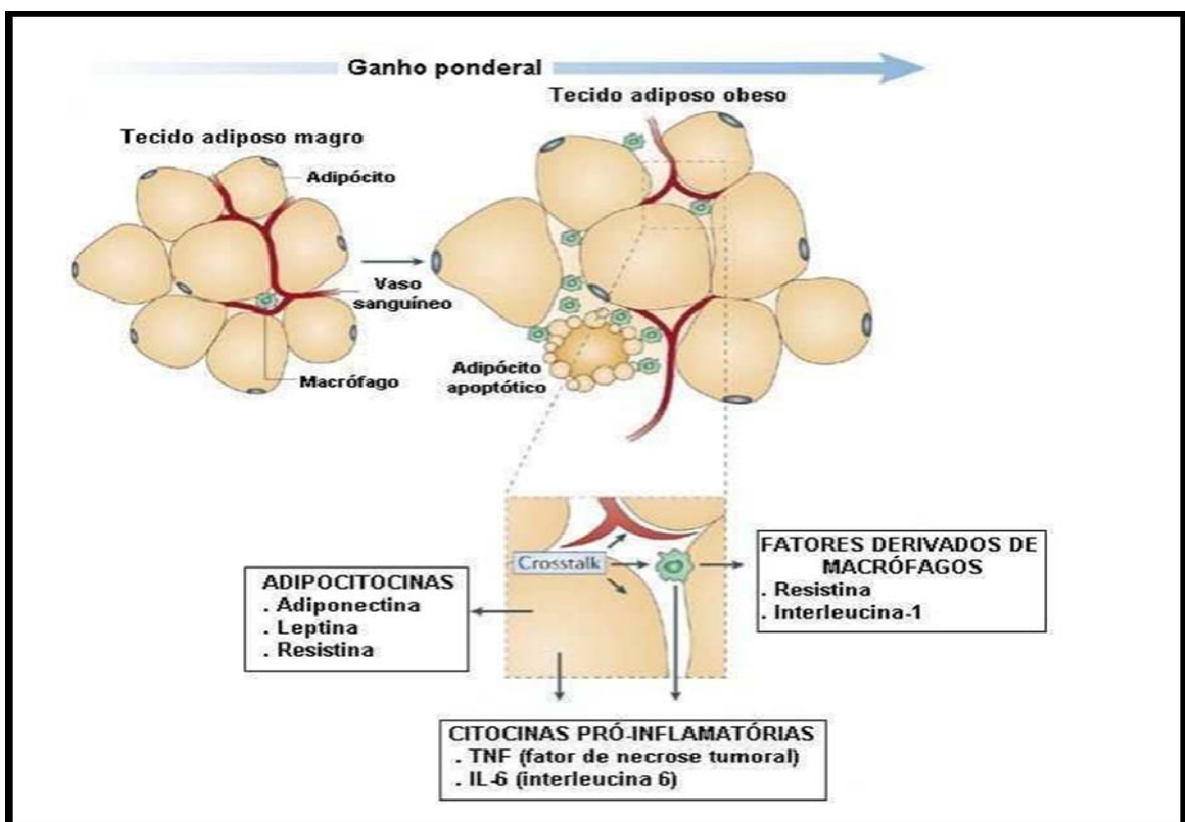
Atualmente, mais de 50 adipocinas foram identificadas, algumas delas são agrupadas em categorias funcionais distintas (Figura 6), mas suas ações ocorrem de forma integrada, ocasionando a participação do TAB na homeostase energética, na imunidade, na resposta inflamatória, na sensibilidade insulínica, na angiogênese e na pressão sanguínea (TRAYHURN; WOOD, 2004; TILG; MOSCHEN, 2006; FONSECA et al., 2006).



**Figura 6:** Principais adipocinas e suas categorias funcionais. TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose tumoral alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimioatrativa de monócitos e macrófagos; SAA: Proteína amiloide A sérica; RBP: Proteína ligadora de retinol; CETP: Proteína de transferência de éster de colesterol; PAI-1: Inibidor da ativação de plasminogênio; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular. Fonte: LEITE, et al., 2009.



A elevação dos marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6, PCR) observados na obesidade, seria proveniente da produção destes pelos próprios adipócitos e pelos macrófagos infiltrados em resposta à hipóxia, como mostra na figura 7. De igual modo, há também liberação de marcadores inflamatórios em outros órgãos, muitas vezes com produção estimulada por fatores secretados no TAB. Como exemplo, a IL-6, estimula a produção da PCR no fígado (TRAYHURN; WOOD, 2004; KERSHAW; FLIER, 2004). Entretanto, a inflamação tecidual aparece como resposta não só a hipóxia, mas também ao estresse oxidativo (VENDRELL et al., 2010).



**Figura 7.** Adipocitocinas e componentes celulares do tecido adiposo. Adaptado de Tilg; Moschen, (2006).

### 1.6 Interleucina-6 e Proteína C reativa na obesidade

A IL-6 é uma citocina com múltiplas atividades biológicas produzida por diversos tipos celulares como linfócitos T e B ativados, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e adipócitos. O tecido adiposo é uma importante fonte de IL-6 para a circulação sistêmica existindo uma correlação direta entre produção de IL-6 e massa adiposa e havendo evidências de que o tecido adiposo visceral seja o maior responsável por esta produção (MOHAMED-ALI et al., 2001). Conforme

demonstrado por Bastard et al., (2000), uma redução da massa adiposa, foi acompanhada de uma redução das concentrações circulantes de IL-6.

A IL-6 suprime a expressão de adiponectina e receptores e sinalizadores de insulina (ANTUNA-PUENTE, 2008). Guimarães et al., (2007) sugerem que a IL-6 pode agir de formas distintas, dependendo da sua concentração orgânica, tanto nos tecidos periféricos quanto no sistema nervoso central, influenciando no peso corporal, na homeostase energética e na sensibilidade insulínica. As concentrações circulantes de IL-6 estão associadas à RI, IMC (VOZAROVA et al., 2001), risco aumentado de DCV e ao surgimento do DM2 (PRADHAN et al., 2001). A correlação direta entre as concentrações circulantes de IL-6 e RI sugere que a IL-6 pode ser importante como um regulador local da ação da insulina ou ainda, como um hormônio circulante, levando a um aumento da RI no tecido muscular (BASTARD et al., 2000). Tal como o TNF- $\alpha$ , a IL-6 possui efeito lipolítico, pois reduz a expressão e atividade da LPL (TRUJILLO et al., 2004).

Bastard et al., (2000) demonstraram pela primeira vez em humanos que o tecido adiposo subcutâneo abdominal expressa o receptor de IL-6, o que sugere que esta citocina estaria envolvida em mecanismos de regulação parácrinos ou autócrinos dos adipócitos. Em tecido adiposo de indivíduos resistentes à insulina, ficou demonstrado que a expressão gênica da IL-6 encontra-se exacerbada, exercendo efeitos inibitórios na transcrição do IRS-1 e do GLUT4 (ROTTER et al., 2003).

A PCR é a principal mediadora da resposta inflamatória de fase aguda, e possui funções imuno-reguladoras como o recrutamento e ativação do sistema complemento, o aumento da reatividade leucocitária, e o estímulo da liberação de citocinas como a IL-1, IL-18, IL-6 e o TNF- $\alpha$  (BLACK et al., 2004). Paralelamente à função de defesa, a PCR, possui também diversas ações que estariam implicadas na patogênese de DCV, SM, intolerância aos carboidratos e DM2 (BULLÓ et al., 2003; MATSUBARA et al., 2003; TAN et al., 2003). Além disso, a PCR aumenta a expressão de moléculas de adesão endotelial, a captação de LDL colesterol pelos macrófagos (ZWAKA et al., 2001) e inibe a óxido-nítrico-sintetase endotelial (VENUGOPAL et al., 2002). Vários estudos demonstram a correlação existente entre PCR e medidas de obesidade (PIRES et al., 2014; FROTA et al., 2015).

## 1.7 Sistema Purinérgico

O sistema purinérgico é uma importante via de comunicação célula-célula, tendo como molécula sinalizadora o ATP (adenosina trifosfato). Este nucleotídeo está presente em todas as células e participa da regulação de processos fisiopatológicos dentre estes resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular. A sinalização purinérgica envolve os nucleosídeos de adenina, os receptores através dos quais eles exercem seus efeitos e as ectoenzimas (OLIVEIRA, 2008).

Um importante nucleosídeo componente do sistema purinérgico é a adenosina (ado) que está envolvida em inúmeros processos fisiológicos. No sistema cardiovascular a adenosina promove a redução da pressão arterial em virtude de sua atividade vasodilatadora (SATO et al., 2005). A adenosina também modula a liberação de neurotransmissores e de citocinas, participa da inibição da lipólise, (FAN et al., 2003), além de exercer importante papel na modulação da ação da insulina no metabolismo da glicose em diferentes tecidos. Estudos indicam que em condições hiperglicêmicas ocorre uma perturbação da homeostase da adenosina, *in vivo* e *in vitro*, o que por sua vez pode estar relacionado com a função diminuída das células imunes (RUTKIEWICZ; GORSKI, 1990; BURKIEWICZ et al., 2006).

A adenosina está presente em todos os vertebrados, é produzida por diferentes vias e sua síntese ocorre no meio intra e extracelular. No meio intracelular, a sua produção ocorre a partir da atividade da 5'nucleotidase (5'NT) sobre o 5'-AMP, resultando em adenosina. No meio extracelular, a produção decorre da atividade da S-adenosinahomocisteína hidroxilase que converte a S-adenosinahomocisteína em adenosina. Ambas as adenosinas intra e extracelulares são metabolizadas em inosina pela adenosina desaminase (ADA), como pode ser observado na figura 8 (LATINI; PEDATA, 2001).



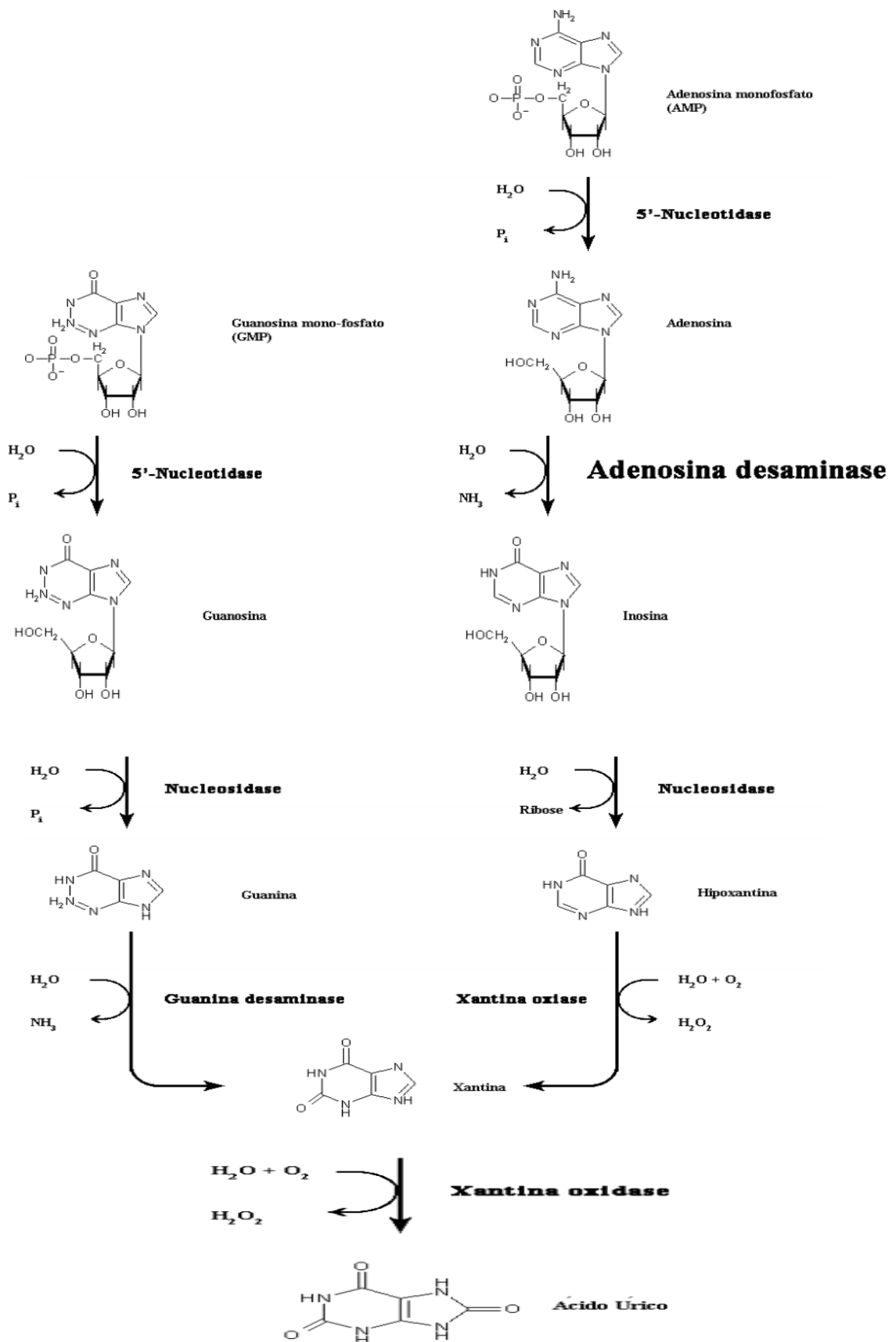


Figura 10: Catabolismo dos nucleotídicos purínicos. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2002).

A ADA é expressa por duas isoenzimas presentes em três isoformas: ADA 1, ADA1+Complexo protéico (ADA1-CD26) e ADA2, e está presente no citoplasma e na superfície das células (OLIVEIRA, 2008).

A ADA1 é uma proteína monomérica com massa molecular de aproximadamente 36 kDa, que desamina eficientemente a adenosina, funcionando como um agente modulador dos níveis intra e extracelulares de adenosina e desoxiadenosina (FRANCO et al., 1998).

A ADA1-CD26, consiste na ADA1 formando um complexo proteico com a enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), com massa molecular de aproximadamente 280 kDa, estando envolvida diretamente na ativação dos linfócitos T (BOTA et al., 2001).

A ADA 2 é uma isoenzima que coexiste com a ADA 1 apenas em monócitos e macrófagos, com massa molecular de aproximadamente 100 kDa, apresenta baixa afinidade pela adenosina e é uma ferramenta importante para o diagnóstico de doenças inflamatórias e infecciosas, visto que, a ADA é liberada pelos macrófagos estimulados pela presença de microrganismos vivos no seu interior. Além disso, doenças inflamatórias e infecciosas promovem a proliferação e/ou ativação de células T também produtoras de ADA (TITARENKO et al., 2006). Em adição, também foram observados aumentos na atividade da enzima em diferentes fluidos biológicos (líquidos pleural, pericárdico, peritoneal, intra-articular e fluidos cerebrospinais) em diversos processos infecciosos. A ADA2 que corresponde 80% da atividade total da enzima, tem sido utilizado para diagnóstico de tuberculose peritonite infecciosa, mononucleose infecciosa, febre tifóide, sinusite, meningite e AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) (TITARENKO et al., 2006).

Bottini et al., (2004) sugeriu que dois polimorfismos nos alelos ADA\*1 e ADA\*2 do gene da ADA estariam associados com diferenças na atividade enzimática e poderiam contribuir para o grau de obesidade em pacientes com DM2 (BOTTINI et al., 2004). Também, estudos recentes demonstraram um aumento da atividade da ADA em diferentes tipos celulares em indivíduos com SM e DM2 (DE BONA et al., 2012; DE BONA et al., 2014).

### 1.7.2 Dipeptidil peptidase – IV (DPP-IV)

A enzima DPP-IV também conhecida como CD26, é uma glicoproteína multifuncional tipo 2, encontrada nas formas solúvel e transmembrana. É uma exopeptidase que cliva aminoácidos prolina e alanina, na penúltima posição na região N-terminal de polipeptídeos (PACHECO, 2005). Na forma transmembrana, é expressa como um homodímero na superfície de várias células epitelial, endotelial e linfóide. Existem relatos de atividade da DPP-IV em soro humano, porém, correspondem à apenas 5% do total, os outros 95% correspondem atividade da DPP-IV associada à ADA. A DPP-IV é expressa por células TCD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, e é aumentada de 5 a 10 vezes com o estímulo de certos antígenos como: interleucina-2, ou mitogênicos, tais como fitohemaglutinina (DE BONA et al., 2012).

Lamers et al., (2011) mediram a atividade de DPP-IV em indivíduos obesos e magros pareados por idade, demonstrando que os indivíduos obesos são caracterizados por um aumento significativo da atividade da DPP-IV. Em adição, Bellé et al., (2012) observou uma correlação significativamente positiva entre a hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) e a atividade da DPP-IV em pacientes com DM2.

## 1.8 Obesidade e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/oxidante em favor do pró-oxidante, levando a dano potencial (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Dessa maneira, a redução dos sistemas de defesas antioxidantes, ou, o aumento da geração de espécies oxidantes, radicalares ou não, podem resultar em lesões oxidativas em macromoléculas de diversas estruturas celulares, que se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos. Diante disso, o estresse oxidativo tem sido implicado na obesidade e em várias doenças como DM, DCV, neurodegenerativas, câncer, bem como no processo de envelhecimento (HALLIWELL et al., 2000).

Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados de EROs, enquanto que os centrados no nitrogênio são denominados de ERNs. Os principais EROs são os radicais hidroxila (OH<sup>-</sup>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxila (ROO<sup>-</sup>) e alcoxila (RO<sup>-</sup>), oxigênio, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ácido hipocloroso. O O<sub>2</sub><sup>-</sup> apresenta uma baixa capacidade de

oxidação, a  $\text{OH}^-$  mostra uma pequena capacidade de difusão e é mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^-$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}$ ) (HALIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Várias vias de geração de estresse oxidativo são ativadas pela hiperglicemia observada no DM associado com a obesidade. A avançada glicosilação de produtos finais formados de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos faz com que estes produtos se liguem a receptores na superfície celular e ativem fatores de transcrição intracelulares, como  $\text{NF}\kappa\text{-}\beta$ . Este último ativa a PKC, o sorbitol e a transcrição de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), sendo que a ativação destas moléculas causa a produção de EROS (VINCENT e TAYLOR, 2006).

A Produção de EROS induzida por hiperglicemia crônica é apontada como um potencial mecanismo molecular que induz complicações vasculares em pacientes diabéticos e/ou obesos. As células  $\beta$ -pancreáticas expressam níveis baixos de enzimas anti-oxidantes e tornam-se sensíveis ao estresse citotóxico que leva a maior risco de danos oxidativos (ROBERTSON et al., 2003). Nas células do endotélio vascular existe uma série de enzimas envolvidas com a produção de espécies reativas, como NADPH oxidase, xantina oxidoreductase e NO sintases (VINCENT e TAYLOR, 2006). Juntamente com o quadro hipertensivo, que é a comorbidez mais comumente encontrada na obesidade, a concentração elevada de LDL na corrente sanguínea do indivíduo obeso facilita a captação das mesmas por macrófagos ativados, os quais iniciam o processo de lipoperoxidação, aumentando o dano oxidativo e promovendo condições para o desenvolvimento da aterosclerose (MOHN et al., 2005; HUI et al., 2012).

O aumento da produção de citocinas inflamatórias e de fatores de transcrição também pode ser estimulado pelo aumento da glicose plasmática através do aumento da atividade da via das hexosaminas, pois o aumento da glicose intracelular tem como consequência a metabolização final de frutose-6-fosfato à uridina difosfato-N-acetil glucosamina, resultando em alterações patológicas na expressão gênica e aumento de citocinas e fatores de transcrição (GOLDIN, et al., 2006).



### 1.8.1 Defesas antioxidantes

Os antioxidantes do organismo podem agir neutralizando radicais livres, ou seja, espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio de forma enzimática ou não enzimática. Os principais antioxidantes enzimáticos são a Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase, Superóxido Dismutase e os não enzimáticos são a Glutathione Reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (ferritina e transferrina) e ácido diidrolipóico. O organismo também utiliza antioxidantes provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C),  $\beta$ -caroteno (vitamina A) e compostos fenólicos com destaque para os flavonóides e poliflavonóides (HALLIWELL, 2000).

As concentrações séricas de nutrientes antioxidantes como vitamina E,  $\beta$ -caroteno, vitamina C, zinco e selênio encontram-se menores em pacientes obesos (DECSI et al., 1997; VIROONUDOMPHOL et al., 2003), estando inversamente correlacionados com o IMC (KISAKOL et al., 2002). Desta forma, os indivíduos obesos possuem menor defesa antioxidante por ingerirem menos nutrientes com esta propriedade e também por estarem em um processo metabólico promotor de espécies reativas. Independente da idade ou sexo, os antioxidantes dietéticos são utilizados mais rapidamente no obeso para inativar substâncias oxidantes do que no indivíduo normal. Isto ocorre porque a quantidade de oxidantes na obesidade é superior, com maior necessidade de antioxidantes para evitar os possíveis danos (OLUSI, 2002).

A glutathione reduzida é o tiol não-protéico mais abundante e é considerada a primeira defesa antioxidante e o maior tampão redox intracelular, por esta razão é um bom indicativo do estado redox da célula. Seus grupamentos sulfidrilas (SH) estão intimamente ligados ao seu potencial antioxidante, visto que este grupo desempenha um papel importante no caráter doador de elétrons da glutathione, pois a medida que os elétrons são perdidos a molécula de GSH se torna oxidada (GSSG) (KISAKOL et al., 2002). A glutathione apresenta muitas funções biológicas, dentre elas a de manter diversos componentes da célula em estado reduzido, especialmente proteínas e íons ferroso ( $Fe^{++}$ ) de grupos heme. Também apresenta capacidade de se ligar com várias drogas, formando metabólitos que contribuem para a excreção urinária ou biliar desses xenobióticos (AFSHARI et al., 2007).

### 1.8.1.1 Glutathione S transferase (GST)

As glutathione transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HAYES, 2005). As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros, apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a GSH que é muito específico para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (DANIELSON, 1985; HAYES et al., 2005).

As GSTs de mamíferos podem ser divididas em três grandes famílias: GST citossólica, GST mitocondrial e GST microssomal. As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto que as do tipo microssomal se encontram associadas à membrana. A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares resulta na formação de eletrófilos, como aldeídos e, hidroxialdeídos, cetoaldeídos- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos. Alguns destes são altamente genotóxicos (MARNETT, 2003) e sua formação excessiva pode ser controlada pela ação de GSTs (HURST et al., 1998; PRABHU, 2004). De fato, foi demonstrado que GSTs promovem a adição conjugada da glutathione à acroleína, crotonaldeído e à outros aldeídos  $\alpha$ , $\beta$ -insaturados (HAYES et al., 2005). Assim, a atuação das GSTs é uma importante estratégia de defesa da célula contra xenobióticos (HEIJN et al., 1992; MARNETT et al., 2003).

É importante observar que as enzimas GSTs fazem parte de um sistema de defesa integrado, e que a eficiência deste sistema depende da ação combinada de outras enzimas, como a  $\gamma$ -glutamylcisteína sintase e a glutathione sintase, no sentido de fornecer glutathione, bem como, de transportadores que facilitem a eliminação dos conjugados de GSH, desse modo, a conjugação de um metabólito com a GSH é catalisada pelas GST e consiste em ligar o xenobiótico com o GSH endógeno. Assim, os conjugados de glutathione podem ser excretados através da bile ou serem convertidos a ácido mercaptúrico no rim e serem eliminados através da urina (HAYES, 2005).

## 1.9 Genética e Obesidade

Existem implicações genéticas no controle do peso corporal sendo que a programação e controle genético são capazes de produzir a manutenção fisiológica de uma determinada quantidade de gordura para cada indivíduo (VIGUERIE et al., 2012).

A obesidade do tipo monogênica se desenvolve devido à mutação de um único gene, que é responsável por promover acúmulo excessivo de gordura independentemente de interação gênica ou fatores ambientais. Esse tipo de obesidade é muito raro e os indivíduos afetados têm um fenótipo muito grave. Os sintomas iniciam na infância, geralmente vêm acompanhados de disfunções comportamentais, de desenvolvimento e endócrinas (FAROOQI; O'RAHILLY, 2004).

Já a obesidade comum que se tornou uma epidemia mundial e vêm requisitando atenção da comunidade científica, é considerada uma doença de herança multifatorial, pois, é influenciada por fatores genéticos e por fatores ambientais. A quantidade de gordura armazenada não é simplesmente um parâmetro inteiramente pré-determinado geneticamente. Evidências indicam que a obesidade é uma doença cuja expressão pode ser modulada por numerosos genes modificadores, que interagem entre si e também interagem com fatores ambientais, como por exemplo, as escolhas alimentares, atividade física e tabagismo (WALLEY et al., 2012).

Um grande número de genes e polimorfismos já foram testados para a obesidade. Estes genes estão relacionados a diferentes funções tais como o controle da ingestão alimentar, do gasto de energia, do metabolismo da glicose e de lipídios e mais recentemente o controle de processos inflamatórios e oxidativos (RANKINEN et al., 2006). A maioria dos genes, entretanto, pode ser considerada genes de susceptibilidade, cada um contribuindo com efeitos relativos e agindo em conjunto para influenciar a expressão do fenótipo da obesidade em ambientes permissivos (WARDEN; WARDEN, 2001).

A hipótese do “genótipo econômico” é a explicação que responde por que o genoma humano conteria variantes gênicas que favorecem o acúmulo e a manutenção de um nível excessivo de gordura. De acordo com esta hipótese, durante milhões de anos nossos genes sofreram pressões evolutivas que favoreceram alelos que promoviam ganho de peso, uma vez que o nosso ambiente

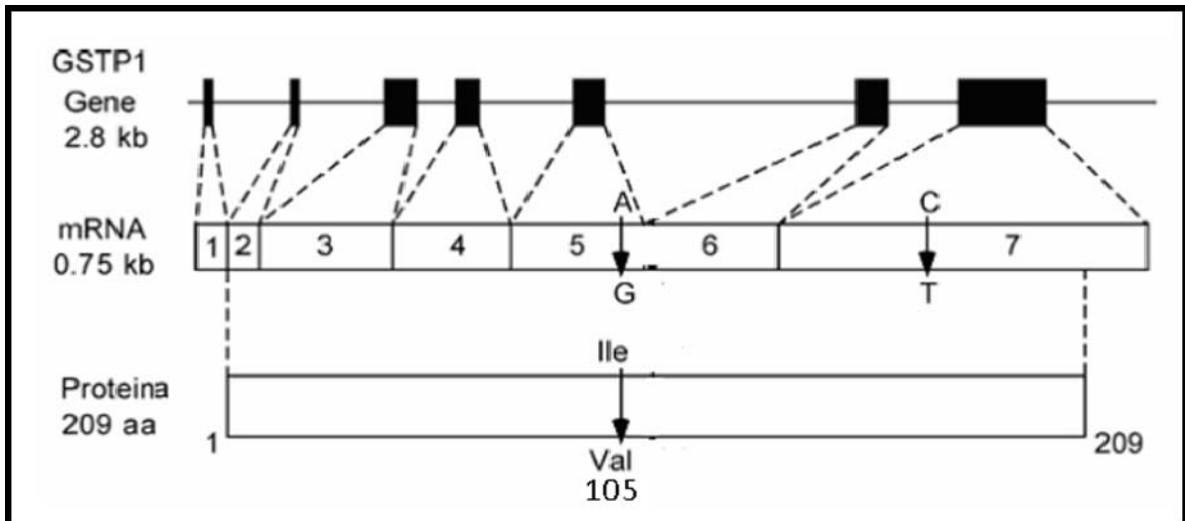
caracterizava-se pelo acesso restrito à comida. Os indivíduos geneticamente mais propensos a ter um comportamento alimentar guloso e/ou armazenar de forma mais eficiente as calorias ingeridas, teriam uma maior chance de sobreviver aos períodos de fome e, conseqüentemente, maior chance de propagar seus genes “econômicos” (FAROOQI; O’RAHILLY, 2004). No entanto, o ambiente tem a capacidade de influenciar diretamente na suscetibilidade ao desenvolvimento da obesidade, seja por meio de hábitos e estilo de vida do indivíduo, seja por indução de modificações epigenéticas. O conhecimento das bases genéticas em conjunto com as influências ambientais que levam à obesidade poderá permitir identificar populações vulneráveis e intervir de modo a controlar esta epidemia em gerações futuras (MOSCA et al., 2012)

### **1.10 Gene da Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) e seu polimorfismo**

O gene da subfamília GSTP1 está localizado no cromossomo 11q13, contendo 2,8 Kb e 7 exons, sendo responsável por codificar a isoenzima P1, de 209 aminoácidos, que está comprovadamente envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular, epóxidos reativos de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e radicais livres (ANDRADE, 2006).

Um dos polimorfismos estudado da GSTP1 é o que está envolvido na troca do nucleotídeo adenina (A) pela guanina (G) na posição +313 do exon 5 resultando na substituição do aminoácido no códon 105, de isoleucina (Ile) por valina (Val), conforme mostrado na figura 11. Estes alelos formam três diferentes genótipos: A/A, A/G e G/G (STANILOVA et al., 2007; FRANKO et al., 2008).

Oito categorias distintas de GST que são altamente solúveis e expressas no fígado já foram identificadas como a alfa, mu, pi, sigma, teta, kappa, ômega e zeta. Vários genes responsáveis pela produção da GST apresentam polimorfismos característicos que resultam diretamente em mudanças na quantidade ou atividade da enzima GST. A Glutathione-S-transferase mu (GSTM1), glutathione-S-transferase teta (GSTT1), e glutathione-S-transferase pi (GSTP1) e seus polimorfismos têm sido amplamente estudados e relacionados com diversas patologias (COTTON et al.; 2000).



**Figura 11:** O gene da GSTP1 constituído de 7 exons. O polimorfismo ocorre através da troca do nucleotídeo adenina (A) pela guanina (G) no exon 5, resultando na substituição do aminoácido isoleucina por valina na posição 105. (Adaptado de PARL, 2005).

Uma condição importante afetando a expressão GST é o estresse oxidativo, geralmente observada no diabetes e nos indivíduos obesos. O gene que expressa as enzimas de GST é polimórfico e, portanto, é possível que as variações individuais nas atividades metabólicas de cada enzima possam regular a eliminação de intermediários tóxicos e conseqüentemente podem ser parcialmente responsáveis pela susceptibilidade a danos nas células  $\beta$  gerado pelo estresse oxidativo (WANG; ZHANG, 2006). Um exemplo é o que ocorre com a variante do alelo A da GSTP1 pelo alelo G, no éxon 5 do códon 105, ou seja, a inversão de uma isoleucina (alelo A) por uma valina (alelo G) ocasionando a redução da capacidade conjugativa da glutationa, permitindo a sensibilização das células por radicas livres mediando danos celulares (PARL, 2005).

Alguns estudos têm mostrado que as isoformas da GST apresentam diferenças na especificidade de ligação ao substrato e na estabilidade térmica. Tais alterações podem conferir diferentes atividades catalíticas, sendo demonstrado que o alelo G confere uma atividade catalítica aumentada em sete vezes para hidrocarbonetos aromáticos policíclicos diol epóxidos, porém três vezes menor para 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, quando comparadas com as enzimas codificadas pelo alelo A (ALI-OSMAN, et al., 1997; HARRIES et al. 1997). Estudos como o de Kvitko et al. (2006), analisaram uma amostra de descendentes de europeus, oriundo do Rio Grande do Sul e a distribuição encontrada de 52,2% para o genótipo A/A, 40% para A/G e 7,8% para G/G. Também, outro estudo com uma amostra de afro-brasileiros

teve a distribuição genotípica de 47,8% para A/A, 42,6% para A/G e 9,6% para G/G (ROSSINI et al., 2002).

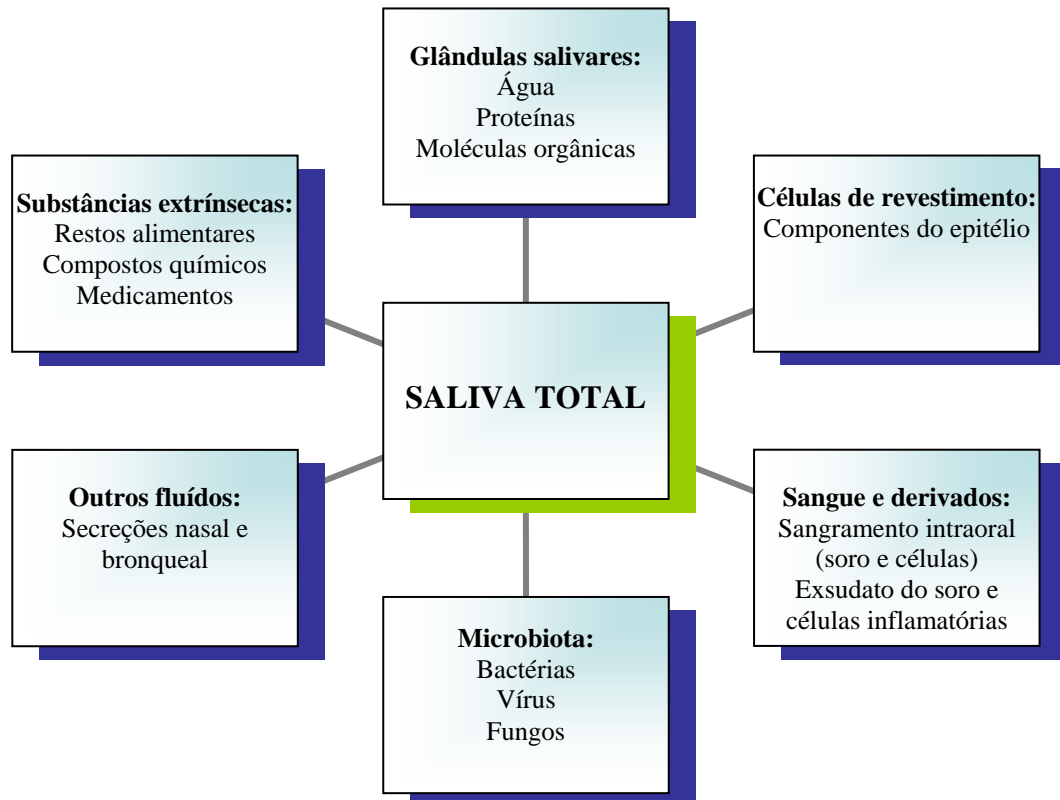
Além disso, a GSTP1 é conhecida por metabolizar muitos compostos carcinogênicos, como, por exemplo, o benzopireno diol epóxido (BPDE), um dos principais metabólitos carcinogênicos derivados da fumaça do cigarro. Alguns estudos realizados entre este metabólito e o alelo G da GSTP1 demonstraram que a enzima tem sua atividade catalítica reduzida, e com isso, aumenta a susceptibilidade para o câncer (JOURENKOVA-MIRONOVA et al., 1999; TORRESAN, 2006). Também, Mahmoud et al., (2012), mostraram que o genótipo GSTP1 Ile/Val pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de DM2, e o gene GSTP1 pode ser um marcador útil na predição de DM2.

### **1.11 Saliva**

A saliva é um fluido biológico aquoso com múltiplas funções e claras implicações na saúde oral. O fluido oral é constituído principalmente por água (99%), e uma mistura de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloro, magnésio, bicarbonato e fosfato), proteínas (incluindo enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas da mucosa, vestígios de albumina e vários polipeptídios e oligopeptídios). Também em menores quantidades, glicose e produtos nitrogenados (ureia e amônia), como mostra a figura 12 (HUQ et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2008).

Podemos considerar dois tipos de saliva, o primeiro tipo corresponde à saliva específica das glândulas salivares individuais. A saliva é secretada em sua maioria pelos três pares de glândulas principais: parótidas (20%), submandibulares (65-70%) e sublinguais (7-8%). Estas glândulas são responsáveis pela produção de aproximadamente 90% do volume total de saliva sendo o restante (<10%) produzido por uma série de glândulas salivares menores, dispersas pela mucosa oral (GREABU, 2009). A recolha e análise da saliva produzida por cada uma das glândulas é especialmente útil na detecção de patologias específicas das glândulas. Um segundo tipo, a saliva total, corresponde a uma mistura de fluidos orais que incluem as secreções das glândulas salivares, juntamente com vários constituintes de origem não-salivar, como o fluido crevicular gengival (FCG), secreções nasais e bronquiais expectoradas, derivados do sangue provenientes de lesões orais,

bactérias e produtos bacterianos, vírus, fungos, células epiteliais descamadas, outros componentes celulares e restos de alimentos submetidos ao processo de mastigação (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; HUQ et al., 2007).



**Figura 12:** Principais componentes da saliva total. Fonte: Humphrey, (2001).

Existem vários processos pelos quais as proteínas do sangue que não fazem parte da composição normal da saliva podem chegar a esta. Um desses processos é o sangramento intra-oral que pode levar soro e células até a saliva. Outro processo consiste na transferência direta a partir do plasma, que ocorre dentro das glândulas salivares através de mecanismos que incluem vias transcelulares e vias paracelulares. A via transcelular mais comum é a difusão simples. Já a via paracelular mais frequente é a ultrafiltração que ocorre nos complexos juncionais estreitos, entre as células. Os constituintes do sangue também podem surgir na saliva através do fluxo do FCG. Dependendo do grau de inflamação da gengiva, o FCG pode ser um transudado sérico ou então, mais frequentemente, um exsudato inflamatório que contém componentes séricos (KAUFMAN; LAMSTER, 2002).

### 1.11.1 Fatores que interferem no fluxo salivar e na sua composição

Quando a quantidade de água corporal é reduzida em 8% o fluxo salivar é virtualmente eliminado, enquanto a hiperhidratação causa um aumento do fluxo salivar. Na desidratação a concentração de proteínas totais e a osmolaridade aumentam significativamente (WALSH et al., 2004). Outro fator é a postura corporal, iluminação e hábitos tabágicos pois, pessoas que permanecem de pé apresentam maior fluxo salivar, enquanto que pessoas que permanecem mais tempo deitadas apresentam menor fluxo. A secreção da saliva não estimulada é transitoriamente aumentada pelo tabaco. Já foi demonstrado que pessoas que fumam apresentam maior fluxo estimulado do que não fumantes. Evidências indicam que estas circunstâncias são provocadas, por um lado, pelo efeito irritativo do fumo e, por outro, pelas alterações morfológicas e funcionais profundas induzidas pela nicotina nas glândulas salivares (MAIER et al., 1998; DE ALMEIDA et al., 2008).

A quantidade de saliva atinge o seu máximo ao fim da tarde e decresce até praticamente zero durante a noite. Amostras salivares colhidas pela manhã sofrem menor influência do ritmo circadiano. Pela manhã elimina-se a contaminação da cavidade oral pela ingestão de alimentos ou líquidos que ocorrem no decorrer do dia. Além disso, no período matinal a limpeza oral pode ser realizada com água destilada, eliminando resíduos que podem interferir nas dosagens, visto que, à noite é um período de jejum (DAWES, 1972; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; CHIAPPIN, et al., 2007).

Também, inúmeras classes de medicamentos podem causar uma redução no fluxo salivar e alterar sua composição. Em especial destacam-se os medicamentos que apresentam ação anti-colinérgica, anti-depressivos, ansiolíticos, antipsicóticos, anti-histamínicos e anti-hipertensivos (STACK; PAPAS, 2001; ATKINSON; BAUM, 2010).

Tanto a secreção, quanto a composição da saliva podem sofrer ação de exercícios físicos, especialmente em componentes como imunoglobulinas, hormônios, lactato, várias proteínas e eletrólitos (CHICHARRO et al., 1998; DE ALMEIDA et al., 2008).

A ingestão de etanol provoca uma redução significativa do fluxo salivar estimulado e não estimulado. É possível que o consumo crônico de etanol acelere o envelhecimento das glândulas salivares, além de promover alterações morfológicas



e funcionais que podem levar a um impacto direto no funcionamento destas glândulas (ATKINSON; BAUM, 2010). Enberg et al.; (2001) mostraram uma diminuição do fluxo salivar de humanos que consumiam etanol, assim como de cálcio, sódio, potássio e fósforo salivares.

Por outro lado, podemos encontrar um fluxo salivar aumentado em diversas doenças sistêmicas como pancreatite, diabetes, insuficiência renal, anorexia, bulimia e doença celíaca (MAIER et al., 1998). Doenças psíquico-emocionais, como a depressão também são acompanhadas de alterações bioquímicas salivares, como o aumento de cortisol e amilase (GRIGORIEV et al., 2003).

Deficiências nutricionais também podem influenciar a composição da saliva e, conseqüentemente, alterar as suas funções. Apesar do jejum de curta duração reduzir o fluxo salivar, não provoca hipossalivação uma vez que o fluxo normal é restabelecido assim que acabar o período de jejum (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; EDGAR et al., 2004).

Em relação a idade, os dados da literatura são conflitantes, especialmente porque existem poucos estudos observando o fluxo salivar em idosos saudáveis por exemplo (PERCIVAL et al., 1994). Análises histológicas demonstraram que com o avançar da idade o parênquima das glândulas salivares é substituído gradualmente por tecido adiposo e tecido fibrovascular, ficando o volume dos ácinos reduzido (AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006). No entanto, estudos funcionais em indivíduos saudáveis demonstraram que o envelhecimento não leva obrigatoriamente a uma redução da capacidade das glândulas produzirem saliva (NAGLER, 2004).

Duas hipóteses podem ser atribuídas às diferenças observadas na secreção de saliva entre homens e mulheres. Uma, é o tamanho das glândulas salivares que é menor nas mulheres e a segunda é o padrão hormonal que nas mulheres pode provocar uma diminuição da secreção de saliva. As mulheres saudáveis, não medicadas, apresentam um fluxo salivar (não estimulado e estimulado) mais baixo do que os homens (PERCIVAL, 1994).

### **1.12 Funções da Saliva**

A saliva exerce ações importantes sobre os dentes, a mucosa oral, a comida e os microrganismos que colonizam a cavidade oral. A saliva atua sobre o paladar,

pois dissolve substâncias e permite que as papilas gustativas detectem pequenas variações nos sabores (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; BARRY et al., 2009). Também a proteção dos tecidos orais contra agentes agressores é mediada pela saliva. Isto ocorre devido à existência de mucinas responsáveis pela lubrificação e proteção contra desidratação. As mucinas também modulam seletivamente a adesão dos microrganismos à superfície dos tecidos orais, o que contribui para o controle da colonização da cavidade oral por bactérias e fungos. Outra função da saliva é sua capacidade de diluir as substâncias e limpar mecanicamente resíduos presentes na boca, tais como bactérias não aderentes, restos de células e de alimentos, reduzindo a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos (NAGLER, 2004; BARRY, 2009).

A saliva comporta-se como uma solução tampão, para proteger a cavidade oral da colonização por microrganismos potencialmente patogênicos neutralizando e eliminando os ácidos produzidos por microrganismos acidogênicos prevenindo a desmineralização do esmalte dentário através de três sistemas tampão: tampão bicarbonato, tampão fosfato e tamponificação por proteínas (BARDOW et al., 2000; NANCI, 2007).

A saliva desempenha um papel essencial na manutenção da estrutura físico-química do esmalte dentário modulando a sua remineralização e desmineralização. Além disso, a saliva participa do processo mecânico da mastigação através da  $\alpha$ -amilase que degrada o amido em maltose, maltotriose e dextrinas. A ação da  $\alpha$ -amilase é limitada à cavidade oral, pois no estômago é inativa pelo pH e esta enzima é considerada um bom indicador do funcionamento adequado das glândulas salivares, uma vez que constitui cerca de 40 a 50% das proteínas por elas secretadas (EMBERG, 2001; DE ALMEIDA et al., 2008).

As propriedades antimicrobianas da saliva se devem a presença de proteínas, dentre elas, a imunoglobulina A (IgA), que funciona como um anticorpo para antígenos bacterianos e é capaz de agregar bactérias, inibindo a sua aderência aos tecidos orais. Outra substância importante presente na saliva é a lisozima que consegue hidrolisar a parede celular de algumas bactérias e, por ter propriedade catiônica, pode ativar autolisinas que, por sua vez, conseguem destruir componentes da parede celular de bactérias levando à sua destruição (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Do mesmo modo, a saliva é rica em agentes antioxidantes e pode constituir a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo mediado por radicais livres. O mais comum é o ácido úrico, que constitui aproximadamente 85% de todos os antioxidantes salivares. A albumina, o  $\alpha$ -tocoferol, o  $\beta$ -caroteno, o ácido ascórbico e a glutatona são outros antioxidantes que podem ser encontrados na saliva (GREABU et al., 2007).

#### 1.12.1 Saliva como amostra biológica para diagnóstico

Embora a saliva, ao longo da história, tenha sido desprezada na literatura e vista por muitas como uma amostra a ser rejeitada, pesquisadores estão cada vez mais atentos a esta amostra biológica como um fluido adequado para diagnóstico seguro e de coleta não-invasiva. Na atualidade, diversos biomarcadores podem e estão sendo detectados e medidos em fluidos orais, visto que já se sabe que a saliva pode refletir tanto a saúde oral como um estado sistêmico do paciente. Esta ideia desperta uma valiosa oportunidade de realçar a investigação conduzida neste campo ou de expandir a versatilidade da saliva enquanto fluido de diagnóstico tanto de doenças orais como sistêmicas (WONG, 2008; CHIELLE et al., 2015). Cientistas de todo o mundo estão desenvolvendo estratégias para definir e fundamentar bases científicas essenciais para suportar a utilização da saliva como um biofluido de diagnóstico, bem como, desenvolver biossensores capazes de realizar testes rápidos e eficientes, baseados em saliva, e que possam ser utilizados no ambiente clínico. Na última década, com o desenvolvimento de técnicas de proteômica de alto rendimento e com maior poder de resolução, ocorreu uma explosão de estudos dirigidos para o esclarecimento do proteoma salivar (WONG, 2008; HU et al., 2008). Todos estes trabalhos permitiram identificar, na saliva, várias classes de biomarcadores com potencial de diagnóstico, como mostra a Tabela 1.

Até o momento, a saliva já foi alvo de estudos visando a sua utilização na avaliação de risco de cáries dentárias e na detecção de várias doenças orais como a periodontite, cancro oral, doenças das glândulas salivares e doenças sistêmicas como por exemplo, infecções virais (HIV, hepatites e Epstein-Barr) (MALAMUD et al., 2011).

A facilidade de recolha de amostras de saliva providencia uma forma fácil de determinar níveis hormonais, incluindo estrogénio (estradiol), progesterona,

testosterona, dihidroepiandrosterona e cortisol. Importante salientar que a identificação não invasiva do estradiol é importante em situações em que se pretenda ter um indicador que permita avaliar o risco de nascimento prematuro ou de bebês de baixo peso (WONG, 2008; AUFDENBLATTEN et al., 2009; MALAMUD et al., 2011).

Tabela 1: Biomarcadores identificados na saliva e suas potenciais utilizações.

<b>Classe de Biomarcador</b>	<b>Aplicações possíveis</b>
<b>ADN</b>	Genotipagem comum Infecções bacterianas Diagnóstico de câncer da cabeça e pescoço Ciências forenses
<b>ARN</b>	Identificação de bactérias/vírus Diagnóstico de câncer oral
<b>Proteínas</b>	Diagnóstico de periodontite Diagnóstico de câncer Susceptibilidade a cáries
<b>Mucinas/glicoproteínas</b>	Diagnóstico de câncer da cabeça e pescoço Susceptibilidade a cáries
<b>Imunoglobulinas</b>	Infecções virais (VIH, hepatite B e C)
<b>Metabólitos</b>	Várias condições endócrinas Avaliação do estresse/estado psicológico Diagnóstico da periodontite Diagnóstico da fibrose cística
<b>Drogas e seus metabólicos</b>	Monitoração do abuso de drogas Controle de agentes terapêuticos
<b>Vírus</b>	Reativação de vírus Epstein-Barr (Mononucleose)
<b>Bactérias</b>	Diagnóstico de câncer oral Susceptibilidade à cáries
<b>Componentes celulares</b>	Diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço

Fonte: Adaptado de Wong, 2008.

A saliva permite também a detecção de várias drogas, bem como a sua quantificação, sendo um substituto viável aos testes sanguíneos, sendo atualmente possível a detecção de drogas de abuso (cocaína, álcool e opiáceos) e a monitorização terapêutica de fármacos como a digoxina, metadona e alguns anticonvulsivantes. Além disso, a saliva pode ser útil na descoberta das causas genéticas de doenças, incluindo a determinação de fatores de risco genéticos (WONG, 2008).

Enquanto ferramenta clínica, a saliva apresenta várias vantagens em relação ao soro sanguíneo: é mais fácil de recolher, armazenar e transportar e pode ser obtida com custos reduzidos em quantidades suficientes para análise. Para os pacientes, as técnicas de recolha não invasivas reduzem drasticamente a ansiedade e desconforto provocado pela amostragem, simplificando a recolha de amostras de

forma repetida para monitorização em longo prazo. Para os profissionais, a recolha de saliva é mais segura do que os testes sanguíneos, que podem expor os prestadores de cuidados de saúde a vírus como o HIV e o vírus da hepatite. (CAMPO et al., 2006).

A saliva é também mais fácil de manusear, para fins de diagnóstico, uma vez que não coagula, o que reduz o processo de manipulação. O diagnóstico baseado em saliva é acessível, preciso, menos dispendioso e apresenta menos risco para o paciente e para o profissional de saúde comparativamente a metodologias tradicionais (LEE et al., 2009).

#### 1.12.2 ADA e DPP-IV salivar

Resultados contraditórios foram observados em relação a determinação de ADA salivar. Balwant et al., (2011) observaram que a determinação salivar da ADA poderia ser utilizado como uma ferramenta de diagnóstico para a detecção precoce de carcinoma epidermoide de língua, visto que, estes pacientes apresentaram níveis significativamente aumentados de ADA salivar quando comparados com controle. Enquanto que Saracoglu et al., (2005) salientam que embora a atividade da ADA na saliva de pacientes com câncer bucal foi menor do que a do grupo controle e grupo com câncer de laringe é muito difícil afirmar a hipótese de que a atividade salivar desta enzima pode ser utilizada como marcador adicional de diagnóstico e prognóstico de câncer como proposto por outros investigadores.

Foi demonstrado o aumento salivar da DPP-IV em doenças periodontais, sugerindo que a atividade aumentada da DPP-IV poderia refletir a extensão da destruição periodontal (PIYAMAS et al., 2009). Em adição, Yuko et al., (2008) revelam que a DPP-IV na saliva está presente em vesículas denominadas exossomo-like e que possivelmente a atividade desta enzima seria a clivagem da substância P e do Peptídeo Inibitório Gástricos (GIP), também encontrados na saliva, além de outros peptídeos. Ressaltam também que a DPP-IV exerceria uma atividade de regulação de resposta imune.

Desta forma, considerando-se que o polimorfismo do gene GSTP1 pode contribuir para o desenvolvimento de obesidade e que a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e a resistência insulínica são influenciados pela quantidade de tecido adiposo no organismo, e que a saliva representa uma amostra biológica

valiosa no diagnóstico e acompanhamento de patologias sistêmicas este estudo objetivou investigar em amostras de soro e/ou saliva, biomarcadores inflamatórios, oxidativos e de resistência insulínica e a interação do polimorfismo do gene GSTP1 na obesidade adulto-jovem.



## 2.1 Objetivo Geral

Investigar potenciais biomarcadores séricos e salivares e o polimorfismo de gene da Glutathione-S-Transferase P1 (GSTP1) na obesidade adulta jovem.

## 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Em amostras de saliva de pacientes com peso normal, sobrepeso e obesidade:
  - Determinar a atividade da ADA e da DPP-IV;
  - Avaliar marcadores oxidativos e bioquímicos;
  - Correlacionar medidas antropométricas de pacientes obesos, com sobrepeso e com peso normal aos parâmetros bioquímicos, inflamatórios e oxidativos determinados em saliva;
  - Relacionar os parâmetros oxidativos, inflamatórios e de RI séricos com os parâmetros salivares.
  
- ❖ Em amostras de soro e sangue total de adultos jovens de peso normal, com sobrepeso e obesidade:
  - Verificar a prevalência do polimorfismo e a frequência alélica do gene GSTP1 (Glutathione S-transferase P1)
  - Verificar a prevalência de Resistência Insulínica.
  - Investigar a associação das proteínas RBP4, resistina, adiponectina e obesidade com o polimorfismo do gene GSTP1 no desenvolvimento de RI;
  - Verificar o comportamento das adipocinas, de marcadores inflamatórios e oxidativos sobre as principais comorbidades da obesidade;
  - Correlacionar medidas antropométricas (IMC, Relação cintura-quadril, circunferência abdominal e do pescoço) com os biomarcadores analisados e com o polimorfismo do gene GSTP1.





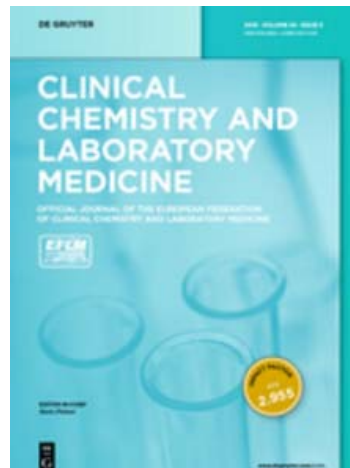
### 3.1 Artigo 1

#### **ADENOSINE DEAMINASE, DIPEPTIDYL PEPTIDASE-IV ACTIVITIES AND LIPID PEROXIDATION ARE INCREASED IN THE SALIVA OF OBESE YOUNG ADULT**

Eduardo Ottobelli Chielle, Gabriela Bonfanti, Karine Santos De Bona, Rafael Noal Moresco and Maria Beatriz Moretto

Publicado em:

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 2015; 53(7): 1041–1047



Eduardo Ottobelli Chielle, Gabriela Bonfanti, Karine Santos De Bona, Rafael Noal Moresco and Maria Beatriz Moretto\*

## Adenosine deaminase, dipeptidyl peptidase-IV activities and lipid peroxidation are increased in the saliva of obese young adult

DOI 10.1515/cclm-2014-1086

Received November 5, 2014; accepted November 20, 2014; previously published online December 20, 2014

### Abstract

**Background:** Obesity is the hallmark of the metabolic syndrome representing a major global health problem. It is considered a state of chronic inflammation with minimal exploration of salivary biomarkers. Thus, the intent of the present study was to assess the activities of salivary dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), adenosine deaminase (ADA) and lipid peroxidation in obese young and overweight young subjects.

**Methods:** ADA, DPP-IV activities and lipid peroxidation were investigated in saliva, as well as insulin, glucose, HbA<sub>1c</sub>, HOMA and anthropometric measurements in 149 young adults, including 54 with normal weight, 27 overweight and 68 obese subjects.

**Results:** Salivary ADA and DPP-IV activities as well as lipid peroxidation were higher in patients with obesity compared to the normal weight group. Correlations between ADA/DPP-IV activities, lipid peroxidation/ADA

activity, ADA activity/hip circumference and BMI/weight were observed.

**Conclusions:** Our results indicate that the increase in the salivary ADA and DPP-IV activities as well as in the lipid peroxidation could be related of the regulation to various aspects of adipose tissue function and inflammatory obesity. It is suggested that these salivary biomarkers may be used as biochemical test in clinical abnormalities present in obesity, in the absence of oral inflammatory diseases.

**Keywords:** adenosine deaminase; dipeptidyl peptidase-IV; lipid peroxidation; obesity; saliva.

### Introduction

Excessive body fat is a chronic inflammatory disorder that affects people of all ages and ethnicities. A chronic low-grade inflammation and an activation of the immune system are observed in abdominal obesity and may have a role in the pathogenesis of obesity-related metabolic disorders [1, 2]. It is recognized that the deposition of excessive fat in adipose tissue in adults is associated with chronic diseases, such as cardiovascular disease, dyslipidemia, hypertension, cancer, insulin resistance (IR) and diabetes mellitus type 2 (DM2). In overweight conditions hemodynamic alterations and abnormal metabolic parameters can be present even at very young ages and are silently climbing toward chronic inflammatory diseases [3].

In obesity the production and release of free fatty acids (FFA), adipokines and proinflammatory cytokines is associated with a chronic case of low-grade inflammation, and additional product infiltrates of macrophages in tissue leading to a reduction of the expression of insulin receptors [4]. In this scenario, the extracellular concentration of the endogenous nucleoside adenosine increases rapidly [5] and can interfere with the biosynthesis of proinflammatory cytokines, also reducing the neutrophil functions [6]. Adenosine deaminase (ADA) (ADA; EC 3.5.4.4) catalyzes the irreversible deamination of adenosine to inosine

\*Corresponding author: Maria Beatriz Moretto, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil, Fax: +55 3220 8018, E-mail: Beatriz@smail.ufsm.br

Eduardo Ottobelli Chielle: Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil; and Center Healthy Sciences, University of West of Santa Catarina, UNOESC, São Miguel do Oeste, SC, Brazil

Gabriela Bonfanti and Karine Santos De Bona: Postgraduate Program in Pharmacology, Center of Healthy Sciences, UFSM-Santa Maria, Brazil

Rafael Noal Moresco: Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil; and Postgraduate Program in Pharmacology, Center of Healthy Sciences, UFSM-Santa Maria, Brazil

contributing to the regulation of intracellular and extracellular concentrations of adenosine and is suggested to be an important enzyme for modulation of insulin bioactivity [7]. It is widely distributed in human tissues and is primarily associated with T-lymphocyte proliferation [8, 9].

Furthermore, dipeptidyl peptidase-IV (CD26/DPP-IV; EC 3.4.14.5), is a transmembrane glycoprotein and exo-protease that cleaves N-terminal dipeptides from various substrates [8] playing the key role in modification, processing, and/or inactivation of peptides, such as peptide hormones, various chemokines, neuropeptides, and growth factors [10, 11]. Recent data suggests that DPP-IV also exerts direct effects, with the ability to induce insulin resistance in adipocytes and skeletal muscle cells in concentrations found in the circulation of overweight and obese subjects [8]. Also, the association between ADA and DPP-IV on the T cell surface has been proposed to have a costimulatory function during T cell antigen receptor-CD3 complex engagement [12]. Previous studies in our group observed a significant increase of DPP-IV in lymphocytes from patients with metabolic syndrome [13], as well as an association between HbA<sub>1c</sub> and DPP-IV activity in DM2 patients [14].

Peroxidation of the lipid membrane has been related to the pathogenesis of many diseases, such as atherosclerosis, aging, diabetes mellitus and obesity [15]. It has been suggested that reactive oxygen species (ROS) induce membrane lipid peroxidation with the toxicity of the generated fatty acids peroxides being important causes of cell malfunction [16].

The measurement of biomarkers in saliva for the examination of numerous clinical conditions has increased over the last decade. In fact, viral infections, hormonal levels, monitoring drugs of abuse and therapeutic drugs, stress assessment and other [17, 18]. In fact, human saliva is an attractive medium for monitoring and diagnosing diseases because of its easy and non-invasive mode of collection and has many advantages over serum, including the ease of collection, storing, and shipping. Researchers around the world are developing strategies to define and explain bases key scientific to support the use of saliva as a biofluid diagnostic and develop biomarkers able to perform fast and efficient tests, based on saliva, and can be used in clinical setting, for systemic diseases, such as cancer and obesity [17, 19].

Accordingly, whole saliva is an important physiologic fluid and may have great clinical interest in the exploration and research of systemic health conditions. Considering that obesity is thought to be a state of chronic, low-grade inflammation, with little exploration of the salivary biomarkers recent studies have found the involvement of

enzymes of the purinergic system in various diseases [13, 20], the purpose of the present study was to assess the activities of salivary DPP-IV, ADA and lipid peroxidation in obese young patients and young overweight patients. Moreover, correlations were made between the parameters evaluated.

## Materials and methods

### Study population

Participants were recruited from January to August 2013 in São Miguel do Oeste located in south of Brazil. The protocol of the study was approved by the Ethics Committee of the University of West Santa Catarina (UNOESC, no. 219.091) and all participants provided written informed consent. Experiments were performed in 149 subjects. A total of 54 normal weight subjects with gender-matched healthy volunteers served as a control group (32 females and 22 males). The subjects with increased weight were divided in two subgroups, matching for sex, age, and body mass index, and were enrolled as follows: 1) 27 overweight subjects (17 females and 10 males); 2) 68 obese young subjects (41 females and 27 males). The participants were non-smokers and were not using any medications, as shown in Table 1.

### Anthropometric survey

All measures were taken in the Anthropometry Laboratory at the University of West Santa Catarina, São Miguel do Oeste, SC (Table 1). Standing height (H, cm) was measured to the nearest 0.1 cm using a wall-mounted stadiometer (Charder model HM-210D). Weight (W, kg) was measured to the nearest 0.1 kg using a calibrated electronic scale (Toledo model 2124). BMI was calculated as  $W/H^2$  ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Waist circumference (WC), neck circumference (NC) and hip circumference (HC) was measured in centimeters with a flexible tape to the nearest 0.1 cm. For AC the tape was applied above the iliac crest with the subject standing with the abdomen relaxed, arms at sides and feet together. NC for the participant remained in the same position and tape was placed on half of the neck on the hyoid bone. The percentages of fat and fat weight were determined by bioimpedance (Biodynamics Model 450). Systolic and diastolic pressure (SBP, DBP) was measured in the individual after being seated and resting for 10 minutes, with a digital apparatus and were expressed in mmHg. All measurements were taken on the left side of the body, according to standardized procedures by Weiner and Lourie [21]. During the anthropometric measurements, all participants were barefoot and clothed appropriately.

### Indices and classifications

According to the World Health Organization, underweight was defined as BMI  $<18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$ , normal weight as BMI  $18.5\text{--}24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ , overweight as BMI  $25\text{--}29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ , and obesity as a BMI  $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$  [22], all without comorbidities. According to Gallagher et al. [23]



**Table 1** Baseline characteristics of study participants.

	Groups		
	Normal weight	Overweight	Obese
n	54	27	68
Male/female	22/32	10/17	27/41
Age, years	21.0 (19.8–24.0)	24.0 (21.0–26.0)	25.0 (22.0–27.0)
Weight, kg	60.1±9.4	77.2±7.0 <sup>a</sup>	97.7±16.0 <sup>ab</sup>
Height, cm	167.8±7.3	167.0±8.3	166.8±10.5
BMI, kg/m <sup>2</sup>	20.9 (19.3–22.6)	28.1 (26.5–28.7) <sup>a</sup>	34.1 (32.4–37.5) <sup>ab</sup>
NC, cm	36.0±4.3	36.0±3.3	38.8±3.5 <sup>ab</sup>
WC, cm	72.3±6.8	87.7±6.3 <sup>a</sup>	104.2±13.7 <sup>ab</sup>
HC, cm	95.7±6.2	107.1±5.5 <sup>a</sup>	117.8±8.9 <sup>ab</sup>
SBP, mmHg	120.9±11.7	126.3±11.2	136.7±14.2 <sup>ab</sup>
DBP, mmHg	72.0 (67.8–80.0)	81.0 (73.0–89.0) <sup>a</sup>	86.0 (77.0–93.0) <sup>a</sup>
Body fat, %	25.3 (18.9–28.9)	33.3 (27.4–36.8) <sup>a</sup>	38.7 (34.8–41.6) <sup>ab</sup>
Fat body mass, kg	14.9 (12.7–17.9)	24.2 (21.0–28.3)	36.1 (31.1–40.7)

Data are expressed as means±SD or median (interquartile ranges). Data were processed for analysis for One-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison test. BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; HC, hip circumference; NC, neck circumference; SBP, systolic blood pressure; WC, waist circumference. <sup>a</sup>p<0.0001 compared to normal weight group; <sup>b</sup>p<0.0001 compared to overweight group.

% fat ≥20% (males) and % fat ≥33% (females) are the cut-points adopted to define overfatness, corresponding to overweight classification using BMI in a population of young adults. According to the National Institute for Health and Clinical Excellence guidelines, WC ≥102 cm for men and ≥88 cm for women are prerequisite risk factors for the diagnosis of the metabolic syndrome, as WSR ≥0.5 for both males and females [24].

### Saliva sampling

A well defined and standardized protocol was used for collection, storage, and processing of all the samples under the exactly same conditions. Unstimulated saliva samples were collected in the morning after fasting for at least 8 h. Brushing teeth, smoking, eating or drinking anything but water for at least 60 min prior to sampling were prohibited. For the collection of salivary samples, patients were asked to put and keep the cotton swab under tongue for 3 min and then to place it back directly into the plastic container according to the manufacturer's instruction (Salivette tubes, Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The collections were made in the laboratory under the guidance and supervision of researchers. Immediately after collecting the saliva samples were centrifuged for 10 min at 1100 g, fractionated in eppendorf and were stored at -20 °C until analysis [25]. Approximately 200 µL of thawed saliva samples was processed for enzymatic and biochemical tests. To avoid the effects of protein degradation, the samples that had been thawed were not reused.

### Laboratory methods

**Enzymatic assays:** DPP-IV activity was determined by spectroscopic quantification of glycyl-prolyl-p-nitroanilide hydrolysis [26]. A 50-µL sample of specimen was incubated with 200 µL 71 mM glycine/NaOH

(pH 8.7) and 50 µL 3 mM glycyl-prolyl-p-nitroanilide at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 2.7 mL acetate buffer (pH 4.5), and absorbance was measured at 385 nm. Results were expressed as the specific activity (U/L). All other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

ADA activity was determined by commercial kit (Ebram Products Laboratory Ltd.<sup>®</sup>, SP, Brazil) according with the enzymatic deamination of adenosine to inosine by kinetic manner. The values were expressed in U/L.

**Biochemical and hormonal measures:** The insulin were determined by electrochemiluminescent immunoassay using an Elecsys 2010 analyzer (Roche Diagnostics<sup>®</sup>). Insulin resistance index was calculated by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as (fasting insulin mIU/L)×(fasting glucose mg/dL)/22.5 and evaluation of insulin sensitivity (SI), the Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was used. Glucose concentrations were determined by using the glucose-oxidase-derived technique (Labtest Diagnostics<sup>®</sup>). HbA<sub>1c</sub> was measured by high performance liquid chromatography. Lipid peroxidation was estimated by measuring of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Lapenna et al. [27]. The reaction product was measured spectrophotometrically at 532 nm and the results were expressed in nmol/L.

### Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used examine the distribution of variables. Comparisons of baseline data among the groups were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test were used to determine statistical differences among the BMI groups and gender. Pearson's rank correlation analysis was used to determine the correlations among ADA and DPP-IV activities and anthropometric

characteristics of the study groups. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . The data were analyzed using Statistica 6.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## Results

### General characteristics of the study population

Baseline characteristics of study participants are described in Table 1. In relation to SBP and DBP, weight, BMI, circumference of the neck, hip, and waist, body fat percentage and body fat mass the obese group exhibited a significant increase ( $p < 0.0001$ ) when compared with the normal and overweight groups.

### Enzymatic assays

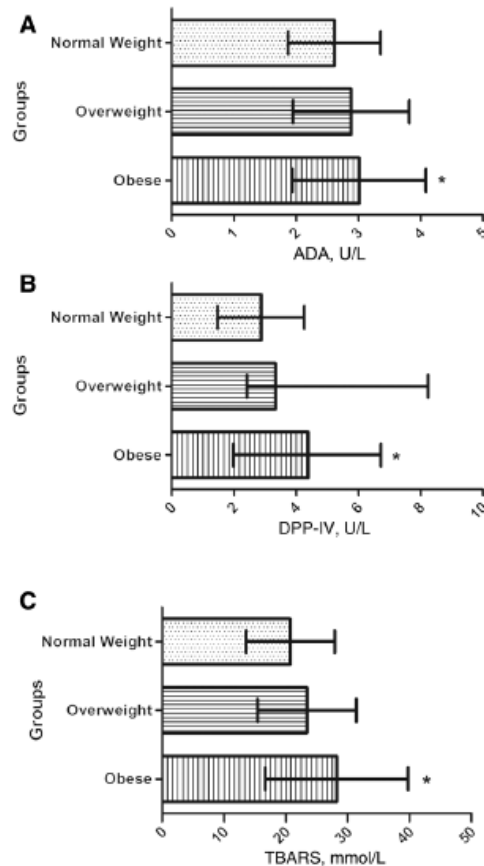
Salivary ADA and DPP-IV activities were significantly elevated in the obese group compared to those in the normal weight ( $p < 0.05$ ) as shown in Figure 1A and B. Significant differences were not observed between the obese and overweight groups and between normal and overweight groups. In relation to gender, no significant differences were observed between men and women in the salivary ADA ( $p = 0.195$ ) activity. However, the activity of DPP-IV was significantly higher in men ( $6.0 \text{ U/L} \pm 3.8$ ) than in women ( $3.7 \text{ U/L} \pm 3.1$ ) ( $p < 0.01$ ).

### Lipid peroxidation measure

Significant difference ( $p < 0.0001$ ) was found between the obese groups and normal weight group in TBARS levels (obese =  $28.2 \pm 11.6$  vs. normal weight =  $20.7 \pm 7.2$  mmol/L) (Figure 1C).

### Correlations between analyzed parameters

Correlation analyses were performed between salivary ADA and DPP-IV activities and anthropometrics parameters. A positive correlation was found between ADA activity the obese group with BMI ( $r = 0.2709$ ;  $p = 0.02$ ), weight ( $r = 0.2623$ ;  $p = 0.03$ ), hip circumference ( $r = 0.2752$ ;  $p = 0.02$ ), DPP-IV activity ( $r = 0.3993$ ;  $p = 0.0007$ ) and TBARS ( $r = 0.2898$ ;  $p = 0.01$ ). The same correlations were performed in overweight and obese group and no were observed significant correlations.



**Figure 1** Salivary analysis in the population studied. Data are expressed as means  $\pm$  SD. Data were processed for analysis by One-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test. (A) Salivary ADA activity. (B) Salivary DPP-IV activity. (C) Salivary lipid peroxidation. \* $p < 0.05$  compared to normal weight group. \*\* $p < 0.0001$  compared to normal weight group.

### Insulin resistance measure

Additionally, the obese group showed a significant increase insulin, glucose,  $\text{HbA}_{1c}$  and HOMA ( $p < 0.0001$ ), when compared to normal weight group. In the same manner the obese group showed a significant reduction ( $p < 0.0001$ ) in insulin sensitivity in relation to normal group (Table 2).

## Discussion

The results of the present investigation, discovered by us for the first time indicated that ADA and DPP-IV activities

**Table 2** Biochemical characteristics of the experimental groups.

	Groups		
	Normal weight	Overweight	Obese
Glucose, mg/dL	79.6±6.7	83.4±7.2	87.1±10.8 <sup>b</sup>
HbA <sub>1c</sub> , %	4.9±0.3	5.1±0.3	5.3±0.4 <sup>a,b</sup>
Insulin, µU/mL	9.5 (6.8–11.5)	11.0 (8.6–14.2)	13.8 (10.3–20.0) <sup>b,c</sup>
HOMA-IR index	1.8 (1.3–2.3)	2.2 (1.6–3.0)	3.1 (2.0–4.4) <sup>b,c</sup>
Insulin sensitivity	0.35 (0.34–0.37)	0.34 (0.32–0.36)	0.32 (0.30–0.35) <sup>b,c</sup>

Data are expressed as means±SD or median (interquartile ranges). Data were processed for analysis, where one-way ANOVA followed by Tukey's test, and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.0001 compared to normal weight group; <sup>c</sup>p<0.0001 compared to overweight group.

are increased in saliva of obese young adults (Figure 1A and B) when compared to normal and overweight groups. Adenosine regulate several aspects of adipose tissue function including lipolysis and the increases of the sensitivity to insulin in isolated adipocytes [9, 28]. ADA is an important enzyme that degrades adenosine to inosine, tightly regulating extracellular concentrations of adenosine [29]. In this line, the increase in the ADA activity found in this study could be a contributing factor to the insulin sensitivity in obese subjects, as a reduction of Ado levels would reduce the purinergic input to the transport of glucose in the adipocytes, tissue insulin dependent. Also, in adipocytes the ADA activity increases the rate of depletion of ATP factor that correlates with increased lipolysis [30] corroborating with the evidences that the ADA activity may modulate the well established antilipolytic effects of adenosine. Similarly, Kurtul et al. [31] have shown that ADA activity was significantly increased in serum of obese subjects compared with non-obese control subjects.

Another important aspect to be discussed is that DPP-IV is a strong inhibitor of the antilipolytic activity of neuropeptide Y, which is one of the best peptide substrates of the enzyme [32]. Therefore, enhanced abundance of both resident and soluble DPP-IV within adipose tissue of obese subjects may substantially augment the lipolytic activity of enlarged adipocytes. As obese subjects are characterized by a significant increase in circulating DPP-IV, it is possible that DPP-IV can interfere in insulin sensitivity not only on adipose tissue, but also in other insulin sensitive peripheral organs [33]. In this context, DPP-IV activity may be required for T-cell activation cascade together with ADA, which has an essential role in the development of immune responses [34]. Supporting this, a positive correlation between ADA and DPP-IV salivary activities in the obese group was observed in this study.

Lamers et al. [35] indicated that serum DPP-IV activity correlates with adipocyte size and all parameters of the

metabolic syndrome; and that adipose tissue explants from obese subjects release substantially more DPP-IV, with a prominent decrease after weight reduction. In the same way, we have also shown in this study that both the ADA activities increased in the saliva of subjects obese and this increase is directly correlated with weight, BMI and hip circumference.

The increased salivary activity of DPP-IV and ADA in the obese group may be linked with hyperinsulinemic obesity since insulin, glucose levels, glycosylated hemoglobin levels and HOMA index were significantly higher in the obese subjects, suggesting an important role of the of ADA and DPP-IV activities in developing IR in obese individuals.

Chronic hyperglycemia could lead to the stimulation of DPP-IV activity and is the key promoter of ROS and advanced production of glycation end products. Thus, considering that the redox potential is an important determinant of immune cell activity, the DPP-IV activity would favor the lipid peroxidation [36, 37]. Furthermore, a positive correlation between the activity of salivary ADA and the salivary TBARS level in obese subjects, was observed. This indicates that with the increase in the ADA activity an increase in deamination of adenosine occurs reducing the levels of this nucleoside and, consequently, decreasing its antioxidant capacity favoring increased lipid peroxidation observed in this study.

We would like to mention that despite the interesting results of this study, it has limitations. Firstly, the lack of measurement of ADA and DPP-IV activity in serum is one of the limitations of the study. Further work is being structured to verify the correlation between the activities of these enzymes in serum and saliva. However, our research group has showed an increase of these enzymes in serum and lymphocytes from diabetic patients and in patients with metabolic syndrome, which presented high BMI [13, 14, 20]. These previous findings support our line of thought, which suggest that the increased ADA and



DPP-IV activity in saliva may represent systemic changes in the samples studied.

In conclusion, we demonstrated alterations in the salivary ADA and DPP IV activities, as well as in the lipid peroxidation levels in obese subjects, suggesting that these alterations are very important in the inflammatory status observed in the individuals with excessive weight. These results support the view that these parameters can be used with biomarkers that demonstrate clinical abnormalities of obesity, since these enzymatic systems regulate functions in adipose tissue related to glucose metabolism and inflammation. The responses observed in the groups tested also indicate that the increase of salivary ADA activity is directly correlated with the BMI and weight indicating insulin resistance in the obese group. These findings open a new perspective of the biomarkers being used as a biochemical test for rapid preliminary evaluation of obesity.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank the Federal University of Santa Maria (UFSM), and University of West of Santa Catarina (UNOESC), SC, Brazil, for support in this study. Also, we thank all the volunteers who participated in this study.

**Author contributions:** All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

**Financial support:** The work had the financial support of the Brazilian National Research Council (CNPq), Universal n° 477029/2011-6.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

**Competing interests:** The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

## References

- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;384:766–81.
- Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;105:141–50.
- Ghigliotti G, Barisione C, Garibaldi S, Fabbi P, Brunelli C, Spallarossa P, et al. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. *Inflammation* 2014;37:1337–53.
- Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J* 2009;276:5747–54.
- Kuno M, Seki N, Tsujimoto S, Nakanishi I, Kinoshita T, Nakamura K, et al. Anti-inflammatory activity of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor FR234938. *Eur J Pharmacol* 2006;534:241–9.
- Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25:33–9.
- Khemka VK, Bagchi D, Ghosh A, Sen O, Bir A, Chakrabarti S, et al. Raised serum adenosine deaminase level in nonobese type 2 diabetes mellitus. *Sci World J* 2013;2013:404320.
- Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:600–7.
- Deacon CF, Carr RD, Holst JJ. DPP-4 inhibitor therapy: new directions in the treatment of type 2 diabetes. *Front Biosci* 2008;13:1780–94.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 1999;85:9–24.
- Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr Med Chem Rev* 2009;16:2943–51.
- Kobayashi S, Ohnuma K, Uchiyama M, Iino K, Iwata S, Dang NH, et al. Association of CD26 with CD45RA outside lipid rafts attenuates cord blood T-cell activation. *Blood* 2004;103:1002–10.
- De Bona KS, Bonfanti G, Cargnelutti LO, Bitencourt PE, da Silva PS, Ceolin R, et al. Lymphocytic enzymes and lipid peroxidation in patients with metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2012;45:1081–5.
- Bellé LP, Bitencourt PE, De Bona KS, Moresco RN, Moretto MB. Association between HbA1c and dipeptidyl peptidase IV activity in type 2 diabetes mellitus [Letter to the Editor]. *Clin Chim Acta* 2012;413:1020–1.
- Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diab Vasc Dis Res* 2011;8:22–8.
- Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, Meyer M, Heinrich K, Bahlmann FH, et al. Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation* 2010;121:110–22.
- De Almeida PD, Grégio AM, Machado MA, De Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:72–80.
- Malamud D, Rodriguez-Chavez IR. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 2011;55:159–78.
- Takagi K, Ishikura Y, Hiramatsu M, Nakamura K, Degawa M. Development of a saliva collection device for use in the field. *Clin Chim Acta* 2013;425:181–5.
- De Bona KS, Bonfanti G, Bitencourt PE, Cargnelutti LO, da Silva PS, De Lucca L, et al. Butyrylcholinesterase and  $\gamma$ -glutamyltransferase activities and oxidative stress markers are altered in metabolic syndrome, but are not affected by body mass index. *Inflammation* 2013;36:1539–47.
- Weiner JS, Lourie JA. *Practical human biology*. London: Academic Press, 1981.



22. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obes Res* 2001;12:S228–33.
23. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2000;12:694–701.
24. Ashwell M, Hsieh SD. Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international public health message on obesity. *Int J Food Sci Nutr* 2005;12:303–7.
25. Sereg M, Judit T, Attila P, Ibolya V, Péter I, Nikolette S, et al. Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical LCushing's syndrome. *Steroids* 2011;76:38–42.
26. Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S. New chromogenic substrates for Xprolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem* 1976;74:466–76.
27. Lapenna GD, Ciofani SD, Pierdomenico MA, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2001;31:331–5.
28. Vroegrijk IO, van Klinken JB, van Diepen JA, van den Berg SA, Febbraio M, Steinbusch LK, et al. CD36 is important for adipocyte recruitment and affects lipolysis. *Obesity (Silver Spring)* 2013;21:2037–45.
29. Johansson SM, Lindgren E, Yang JN, Herling AW, Fredholm BB. Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue-interactions with insulin. *Eur J Pharmacol* 2008;597:92–101.
30. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Salvador J. Leptin induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *FASEB J* 2001;15:333–40.
31. Kurtul N, Pence S, Akarsu E, Kocoglu H, Aksoy Y, Aksoy H. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Med (Hradec Kralove)* 2004;47:33–5.
32. Katagiri D, Hamasaki Y, Doi K, Okamoto K, Negishi K, Nangaku M, et al. Protection of glucagon-like peptide-1 in cisplatin-induced renal injury elucidates gut-kidney connection. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:2034–43.
33. Kos K, Baker AR, Jernas M, Harte AL, Clapham JC, O'Hare JP, et al. DPP-IV inhibition enhances the antilipolytic action of NPY in human adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* 2009;11:285–92.
34. Yu DM, Slaitini L, Gysbers V, Riekhoff AG, Kähne T, Knott HM, et al. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances human lymphocyte proliferation in vitro independent of dipeptidyl peptidase enzyme activity and adenosine deaminase binding. *Scand J Immunol* 2011;73:102–11.
35. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens M, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 2011;60:1917–25.
36. Mannucci E, Pala L, Ciani S, Bardini G, Pezzatini A, Sposato I, et al. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005;48:1168–72.
37. Kirino Y, Sato Y, Kamimoto T, Kawazoe K, Minakuchi K. Altered dipeptidyl peptidase-4 activity during the progression of hyperinsulinemic obesity and islet atrophy in spontaneously late-stage type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:372–9.

### 3.2 Manuscrito 1

#### **IMPACT OF THE ILE<sup>105</sup>VAL POLYMORPHISM OF THE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) GENE ON OBESITY AND MARKERS OF CARDIOMETABOLIC RISK IN YOUNG ADULT POPULATION**

Eduardo Ottobelli Chielle<sup>a,c</sup>, Alexis Trott<sup>c</sup>, Beatriz da Silva Rosa<sup>c</sup>, Jeferson Noslen Casarin<sup>c</sup>, Paola Carra Fortuna<sup>c</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>b</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>a</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Center for Health Sciences, Federal University of Santa Maria, UFSM, 97105-900  
- Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, UFSM,  
97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup>Laboratory of Molecular Biology, University of Western Santa Catarina, UNOESC,  
89900-000 - São Miguel do Oeste - SC – Brazil

\*Correspondent author:

Eduardo Ottobelli Chielle

eduardochielle@yahoo.com

Fax: +55 49 3631 1072

89.900-000 – São Miguel do Oeste, SC, Brazil

## ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the association between Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene polymorphism with obesity and markers of cardiometabolic risk. A cross-sectional study was carried out in individuals aged  $\geq 18$  and  $\leq 30$  years. The study included 54 normal weight, 27 overweight and 68 obese volunteers. Anthropometric measurements and biochemical parameters were evaluated, the DNA was extracted from blood samples and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to measure GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val gene polymorphism of the study participants. Also, biochemical analysis and hormone assays were carried out. A positive association between GSTP1 polymorphism and obesity was observed on subjects carrying at least one G allele (AG and GG). GG genotype was found only in the obese group. The G allele carriers presented 2.4 times higher chance of obesity when compared to those with the AA genotype. These results were independent of sex and age. We suggest that the GSTP1 gene polymorphism may play a significant role in the increase of susceptibility of obesity and contribute to identify the cardiovascular risk in young adults.

**Keywords:** Obesity – Glutathione – polymorphism – biomarkers - cardiometabolic

### Abbreviations

BMI – Body Mass Index	hs-CRP – High-sensitivity C-reactive protein
CDNB – 1-chloro-2,4-dinitrobenzene	IR – Insulin Resistance
DBP – Diastolic Blood Pressure	LDL-C – Low Density Lipoprotein Cholesterol
DM2 – Diabetes mellitus 2	MnSOD – Manganese Superoxide Dismutase
GSH – Reduced Glutathione	NC – Neck Circumference
GST - Glutathione S-transferase	PCR-RFLP – Restriction Fragment
GSTP1 – Glutathione S-transferase P1	Polymorphism – Polimerase Chain Reation
HbA1c – Glycated hemoglobin A1c	SBP – Systolic Blood Pressure
HC – Hip Circumference	SH groups – Sulfhydryl groups
HDL-C – High Density Lipoprotein Cholesterol	TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive
HOMA – Homeostasis Model Assessment	Substances
HPLC – High-performance liquid chromatography	WC – Waist Circumference

## INTRODUCTION

The oxidative stress is suggested as a prominent factor associated to obesity contributing in many pathological processes such as atherosclerotic disease, diabetes and cancer [1]. Obesity is characterized by the deposition of abnormal or excessive fat in adipose tissue and relates to the possibility of numerous metabolic damages associated with oxidative stress [2]. In fact, in vascular endothelial cell exists a number of enzymes involved in the production of reactive species [3], which along with the frame hypertensive comorbidity commonly found in obesity, favors the uptake, internalization of LDL-cholesterol by activated macrophages beginning the process of lipid peroxidation increasing the oxidative damage and promoting conditions for the development of atherosclerosis [4].

One of the system defenses against the harmful effects of oxidative stress in the body is the activity of the enzyme glutathione S-transferase (GSTs - EC: 2.5.1.18). This enzyme belongs to a group of multigene detoxification enzymes, which protect cells against a wide variety of toxic insults of chemicals products, metabolites, and oxidative stress, because catalyze the conjugation these compounds with glutathione, decreasing toxic effects of oxidative stress on cellular macromolecules [5].

The gene that expressing the GST enzymes are polymorphic, therefore it is possible that individual variations affecting the production and metabolic activities of GST enzyme may interfere in elimination of intermediates toxic. The decrease in GST efficacy, contributes to impair the ability of the defense antioxidant being consequently may be associated with development of DM2 [6].

Previous genetic investigations suggested that the variant allele at the GSTP1 allele G in codon 105 of exon 5, or reversing an isoleucine (allele A) by a valine (allele G) leads to the affect the conjugative ability of reducing glutathione. In this case, the G allele decreases the GST enzymatic efficiency, which decreases the antioxidant capacity and increase the oxidative stress and subsequent cellular damage. In addition, significant differences in the frequency of the genotype (Isoleucina<sup>105</sup>Valina) between healthy patients and the diabetic control group were observed, corroborating the hypothesis that allele G (Valine) of GSTP1 would have

a major role in the predisposition to DM2 [7]. Other investigations also demonstrated an association between GSTP1 gene polymorphism and several chronic diseases, such as cancer [8,9], coronary artery disease [10] and cystic fibrosis [11].

Few studies have addressed the role of this polymorphism in diabetes and are no studies exist in obese volunteers correlating the polymorphism of this gene with the development of complications associated with obesity. Therefore, the present study was conducted to evaluate the polymorphism of the GSTP1 gene in subjects normal weight, overweight and obese to investigate the association of this polymorphism with the susceptibility to the development of obesity and comparison of the variants with anthropometric measurements and serum biomarkers.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study design and Study Population**

This study is characterized by a cross-sectional study, measurements were made in a single moment, and there is therefore a follow-up of individuals. Participants were recruited at January to August 2013 in São Miguel do Oeste city Santa Catarina State located in southern Brazilian Region. The patients were recruited from basic health units. The protocol of the study was approved by the Ethics Committee of the University of West Santa Catarina (UNOESC - n° 219.091) and all participants provided written informed consent. The volunteers were classified according to the criteria established by the World Health Organization, 2000 [12], based on BMI and waist circumference (WC) in normal weight (BMI 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup>), overweight (BMI 25-29,9 kg/m<sup>2</sup>) and obese ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) and by central obesity defined as a WC  $\geq 102$  cm for men and  $\geq 88$  cm for women. The groups studied included 149 subjects: 54 normal weight subjects and gender-matched healthy volunteers served as control group (32 females and 22 males). The subjects with increased weight were divided in two subgroups, matched for sex, age, and body mass index, and were enrolled as follows: 1) 27 overweight subjects (17 females and 10 males); 2) 68 obese young subjects (41 females and 27 males). The participants were non-smokers and were not taking any medications.

We selected all obese, overweight and non-obese healthy subjects without previous diseases such as DM, coronary, stroke, neoplasias, other diseases, or dysfunctions that could influence the obese state and genotype distribution. We excluded subjects under the age of 18 years and more than 30 years, individuals who smoked and who have some previous illness, or who used continuous medication.

### **Anthropometric survey**

All measures were taken in the Anthropometry Laboratory at UNOESC. Standing height (H, cm) was measured to the nearest 0.1 cm using a wall-mounted stadiometer (Charder, model HM-210D). Weight (W, kg) was measured to the nearest 0.1 kg using a calibrated electronic scale (Toledo, model 2124). BMI was calculated as  $W/H^2$  (kg/m<sup>2</sup>). Waist Circumference (WC), neck circumference (NC) and hip circumference (HC) were measured in centimeters with a flexible tape to the nearest 0.1 cm. For WC the tape was applied above the iliac crest with the subject standing with the abdomen relaxed and arms at your sides and your feet together. NC for the participant remained in the same position and tape was placed on half of the neck on the hyoid bone. The percentage of fat and fat weight were determined by bioimpedance (Equipment Bioimpedance Model 450, Biodynamics<sup>®</sup>). Systolic blood pressure (SBP) and diastolic (DBP) were measured in individual seated after 10 minutes of rest, with a digital apparatus and were expressed in mmHg. All measurements were taken on the left side of the body, according to standardized procedures by Weiner and Lourie, 1981 [13]. During the anthropometric measurements, all participants were barefoot and clothed appropriately.

### **Laboratory analysis**

*Genotyping of GSTP1 polymorphism (Ile<sup>105</sup>Val)*: Blood samples (5-10mL) from each individual were collected in EDTA. Genomic DNA was isolated using the salting out technique, slightly modified [14,15]. The PCR assay for the polymorphisms in GSTP1-105 was performed as described previously [7], with

slight modifications, containing 10 pmol of each primer P105F (5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3') and P105R (5'-TGA GGG CAC AAGAAG CCC CT-3'), 100 ng of genomic DNA, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM KCl), 0.2 mM of dNTPs, 4% (v/v) DMSO and 2U of Taq DNA Polymerase, in a total volume of 25 µl. Initial denaturation was carried out at 94°C for 5 min. The reaction involved 35 cycles of incubation at 94°C (40 s), 58°C (40 s), and 72°C (40 s). The final polymerization step of 72°C for 5 min was carried out to complete the elongation processes. After the confirmation of an amplified fragment of the expected size (176 bp) on an agarose gel, the PCR products were digested with 5 U of restriction enzyme Alw26I. DNA fragments were submitted to electrophoresis through a 1.5% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide (10 mg/ml). Fragments were compared to 100bp DNA ladder.

*Biochemical Analysis and Hormone Assays:* For determination of biochemical and hormonal assays were used serum and whole blood (EDTA). Insulin and C-reactive protein high sensitive (hs-CRP) were determined by electrochemiluminescent immunoassay using an Elecsys 2010 analyzer (Roche diagnostics®). The concentration of glucose, cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol were measured with reagents brand diagnostic Labtest Diagnostics® according to manufacturer, all analyses were performed at Cobas Mira (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer using standard methods. HbA<sub>1c</sub> was measured by HPLC (Tosoh 2.2 Plus A1C, Tosoh Corporation, Tokyo, Japan), method certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program and is standardized by the International Federation of Clinical Chemistry. The total serum GST activity was determined by a photometric method. GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm with the standard substrate (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB) and co-substrate (reduced glutathione, GSH), using kit of brand Sigma Aldrich®. Lipid peroxidation was estimated by measuring of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the method of Lapenna et al., (2001) [16]. Levels sulfhydryl groups of protein and non-protein according Boyne and Ellman, (1972) [17]. LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald formula. Insulin resistance index was calculated by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as (fasting insulin mIU/L) × (fasting glucose mg/dL)/22.5 and evaluation of Insulin Sensitivity (SI), the index QUICKI

(Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) was used, according to Katz et al 2000 [18].

### **Statistical Analysis**

The results were expressed by frequency (%) or mean  $\pm$  standard deviation (SD) and median according to variable analyzed. The association between obesity and other cardiometabolic risks and GSTP1 polymorphism genotypes and alleles were tested using  $\chi^2$  analyses. Comparison among genotypes of quantitative variables was analyzed by One way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test. Multivariate analysis was performed to analyze the possible intervenient effects (sex and age) on association between GSTP1 genotypes and obesity and other biomarkers by logistic regression (Backward stepwise Wald method). We also calculated the odds ratio values and 95% confidence intervals. The alpha value considered was set at 0.05, and all p values were two-tailed. Data analysis was performed using SPSS software (version 19.0).

## **RESULTS**

### **General characteristics of the study population**

Baseline characteristics of study participants are described in Table 1. As expected, systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), weight, body mass index (BMI), neck, hip, and waist circumference, body fat percentage and body fat mass were higher in obese when compared to normal weight subjects ( $p < 0.0001$ ).

The biochemical profiles of groups are shown in Table 2 and Figures 1 and 2. The mean GST, triglycerides, cholesterol, LDL, glucose, HbA<sub>1c</sub>, insulin, HOMA, insulin sensitivity, TBARS and hs-CRP were significantly higher in the obese group when compared with the normal weight group. In the same way, we observed a significant reduction in HDL and SH groups in the obese group in relation to normal weight group.



### **GSTP1 alleles frequency in study groups**

Genotype and allele Ile<sup>105</sup>ValGSTP1 polymorphism frequencies were determined and presented in Figure 3 and Figure 4. The distribution of genotype frequencies in the study group was given as follows: AA normal weight (23-47.9%), overweight (10-20.8%), obese (15-31.3%); AG in normal weight (31-32.6%), overweight (17-17.9%), obese (47-49.5%); GG normal weight (0-0%), overweight (0-0%), obese (6-100%). A positive association between Ile<sup>105</sup>Val GSTP1 genotypes and obesity was observed, since a higher G frequency was documented in the obese group ( $\chi^2 = 11.975$ ,  $P = 0.01$ ).

The odds ratio related to the association between allele G and obesity was calculated (2.426 95% CI: 1.177–5.013) and the results indicating that subjects having at least one G allele (AG and GG) have 2.4 times greater chance of obesity compared to those with the AA genotype. We observed that the G allele is associated in obesity with dose-dependent phenotypic effect. Multivariate logistic regression indicates that the association between G allele and obesity was independent of sex and age ( $P = 0.691$ ).

Additional analyses comparing some anthropometric and biochemical variables (Tables 3, 4) to different GSTP1 genotypes display a strong interaction with anthropometric variables and a weak interaction with biochemical parameters. The subjects carrying GG genotype presented a higher percentage of weight, BMI, neck, waist and hip circumference, fat body mass, Systolic blood pressure and higher levels HbA<sub>1c</sub> than individuals with other genotypes.

### **DISCUSSION**

There are several studies dealing with GSTP1 polymorphism in various diseases [7, 8,19,20] but no studies exist addressing the role of GSTP1 gene polymorphism with obesity in young adults. The results described here showed a positive association between obesity and Ile<sup>105</sup>Val GSTP1 gene polymorphism in a young obese population, with a strong interaction with anthropometrics variables and a weak interaction with biological variables related to cardiovascular risk. To our knowledge this is the first study describing the association between GSTP1

gene polymorphism and obesity, despite the reduced number of subjects analyzed.

Unfortunately, the role of organic oxidative stress caused by genetic factors still is a point that is obscure and not well considered. Strong evidence suggests that obesity causes oxidative stress and changes adipocyte homeostasis. As obesity is strongly associated with a high fat diet and a lower antioxidant diet, the idea that oxidative stress could also be a causal factor that induces the obese state is logical and well observed in previous studies. However, it is vague whether a genetically caused basal oxidative imbalance could contribute to an obesogenic state. Previous population studies suggest that it is possible since there are investigations describing an association between obesity and other cardiometabolic risks, such as hypercholesterolemia with a gene polymorphism located in the antioxidant enzyme superoxide dismutase manganese dependent (Ala<sup>16</sup>Val MnSOD) [7,21]. This polymorphism has also been associated with oxidized LDL levels [22], and high proinflammatory cytokines [23]. Considering that MnSOD gene polymorphism is associated with an increase in levels of superoxide anion or an increase in the levels of hydrogen peroxide according of each possible allele (A or V), is plausible to conclude that other genetic variations affecting the cellular oxidative imbalance could to contribute obesogenesis.

Therefore, we chose to study the Ile<sup>105</sup>Val GSTP1 gene polymorphism, since the two genotypes (AG and GG) could cause an oxidative imbalance since glutathione S-transferases (GSTs) belong to a group of multigene and multifunctional detoxification enzymes, defending cells against a wide variety of toxic insults from chemicals, metabolites, and oxidative stress [5,24]. Thiol-containing molecules with S–H bonds such as glutathione (GSH) suppress oxidative damage and involve the maintenance of the cell redox status. In healthy tissues, these antioxidants work in cooperative to maintain the pro oxidant–antioxidant balance and prevent tissue damage and disease [25].

Glutathione S-transferase enzymes are responsible for cell defense against xenobiotics compounds. These antioxidant enzymes catalyze the conjugation of glutathione to a wide range of electrophiles and represent a protective role against oxidative stress [26]. The family of GST genes plays an important role in protecting cells from oxidative stress. GSTP1 catalyses the detoxification of products arising from DNA oxidation [27]. Considering the association between metabolic diseases obesity and oxidative stress, genetic defects determined in detoxifying reactive

oxygen species, could influence the risk of these diseases [28]. Peroxidation of the lipid membrane has been related to the pathogenesis of many diseases such as atherosclerosis, aging, diabetes mellitus and obesity [29]. It has been suggested that ROS induce membrane lipid peroxidation and the toxicity of the generated fatty acids peroxides are important causes of cell malfunction [30].

In this study we describe a significant increase in TBARS levels in proportion to the increase in body weight as well as reduced levels of SH groups in proportion to the increase in body weight (Figure 1 and 2). This decrease of the SH groups could be due to polymorphism of the GSTP1, since this polymorphism could lead to decreased both activity when the quantity of GST which would lead to increased lipid peroxidation and increased formation to TBARS.

Although no association was found in polymorphism with markers inducing of atherosclerosis such as lipid profile and hs-CRP, we observed that obese volunteers have significantly higher levels of these parameters (Table 2) that are consequences of obesity and are associated with decreased antioxidant defenses. In the long term these may determine the onset of the cardiovascular diseases.

The gene expressing GST enzymes is polymorphic and therefore it is possible that individual variations in metabolic activities of each enzyme may regulate the clearance of toxic DNA intermediates. This may also be partially responsible for susceptibility of the individual host to the oxidative stress damage of  $\beta$ -cells [31].

The results demonstrated an association between a GSTP1 polymorphism and obesity independent of other potential intervening factors, and the data permitting us to speculate the association between oxidative stress and obesity is close and could establish a "positive feedback process." In this case, the presence of at least one G allele could have a biological oxidative imbalance that is genetically determined, and this condition could affect adipocyte metabolism, which could lead to the state of obesity. In this case, a positive oxidative stress feedback could be established, influencing additional metabolic dysfunctions such as changing the modulations of hormones such as leptin and ghrelin, insulin and the resistance that is known as the expansion of body fat related to resistance insulin. Obese volunteers often present increased levels of insulin and HOMA when compared to volunteers of normal weight, which can be observed in this study (table 2). Adipose tissue is one of the insulin-responsive tissues, stimulates the

storage of triglycerides in adipose tissue by multiple mechanisms, including promoting the differentiation of preadipocytes to adipocytes, increasing the uptake of glucose and fatty acids derived from circulating lipoproteins and lipogenesis in mature adipocytes, and inhibiting lipolysis [32].

DM2 is associated with an increased production of reactive oxygen species (ROS) and reduction of antioxidant defenses [33], with both factors associated with the susceptibility to oxidative stress damage of  $\beta$ -cells [34]. The results found that individuals carrying the GG genotype had higher HbA<sub>1c</sub> levels than individuals with other genotypes (Table 4), suggesting that this polymorphism could induce obesity and consequently alter the metabolism of carbohydrates.

Our results described that individuals carrying the GG genotype had higher BMI, neck, waist and hip circumference, as well as SBP and HbA<sub>1c</sub> than subjects with the AA and AG genotypes. However, we observed through multivariate analysis that these results are actually a consequence of obesity. Like all carriers of GG genotype having a BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>, as would be expected, these individuals displayed changes in reported cardiometabolic risk.

Some limitations of our study must be acknowledged. First, the cross-sectional design of the present study impedes a demonstration etiological association among the markers and the polymorphism; a longitudinal follow-up study is more appropriate for this type of investigation. Second, because subjects of this research from population-specific (a state of South of Brazil), a strong regional focus was applicable. Finally, Despite the reduced number of volunteers for being a cross-sectional study, the results described could be considered important in clinical terms, since they raise the possibility that the polymorphism of the GSTP1 gene plays an important role in the predisposition to obesity.

In conclusion, the results of the present study suggest an association between the G allele (AG and GG genotypes) and obesity. A possible biological explanation for this association could be a chronic state of the GSTs imbalance present in AG and GG carriers, which could affect differential metabolic pathways and hormonal factor modulations caused by higher free radical levels, triggering a positive feedback: oxidative stress–obesity–oxidative stress.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank the Federal University of Santa Maria (UFSM), and University of West of Santa Catarina (UNOESC), SC, Brazil, for

support in this study. Also, we thank all the volunteers who participated in this study. The authors thank CNPq/Brazil for providing research scholarships (M.B. Moretto, R.N. Moresco and I.B.M. Da Cruz).

**Conflict of interest:** There are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- [1] Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9:813–839.
- [2] Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? *Arterioscler ThrombVasc Biol.* 2003; 23:365–367.
- [3] Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond).* Review. 2006; Mar;30(3):400-18.
- [4] Mohn A, Catino M, Capanna R, Giannini C, Marcovecchio M, Chiarelli F. Increased oxidative stress in prepubertal severely obese children: effect of a dietary restriction-weight loss program. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; May;90(5):2653-8
- [5] Cotton, SC, Sharp, L, Little, J, Brockton, N. Glutathione S transferase polymorphisms and colorectal cancer. *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 7–32.
- [6] Wang G, Zhang L, Li, Q. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 310-3.
- [7] Mahmoud AA, Maivel HG, Dina MA, Soad HA. Evaluation of glutathione S-transferase P1 genetic variants affecting type-2 diabetes susceptibility and glycemic control. *Arch Med Sci.* 2012; 8, 4: 631-636.
- [8] Yanlong Y. The association between the GSTP1 A313G and GSTM1 null/present polymorphisms and the treatment response of the platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014 Jul; 35(7):6791-9.
- [9] Tang ZH, Zhang C, Cheng P, Sun HM, Jin Y, Chen YJ, Huang F. Glutathione-S-

Transferase Polymorphisms (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and Acute Leukemia Risk in Asians: a Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014; 15 (5), 2075-2081.

[10] Nomani H, Mozafari H, Ghobadloo SM, Rahimi Z, Raygani AV, Rahimi MA, Haghi AF, Keshavarz AA. The association between GSTT1, M1, and P1 polymorphisms with coronary artery disease in Western Iran. *Mol Cell Biochem*. 2011; 354:181–187.

[11] De Lima MFA, Bertuzzo CS, Secolin R, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Genetic interaction of GSH metabolic pathway genes in cystic fibrosis. *BMC Medical Genetics*. 2013, 14:60.

[12] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284.

[13] Weiner JS, Lourie JA. *Practical Human Biology*. London: Academic Press; 1981.

[14] Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*. 1990; 8:43.

[15] Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:1215.

[16] Lapenna GD, Ciofani SD, Pierdomenico MA, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31:331–5.

[17] Boyne, AF, Ellman, GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Analytical Biochemistry*. 1972, v. 46, p. 639–653.

[18] Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; v. 85, n. 7, p. 2402-2410.

[19] Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 Polymorphisms: They Indicate Susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Non-Small-Cell Lung Cancer? *Genetics and Molecular Biology*. 2004; 27:133-138.

[20] Mo Z, Gao Y, Cao Y, Gao F, Jian L. An Up dating Meta-Analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms and Prostate Cancer: AHuGE

Review. *The Prostate*. 2009; 69:662- 688.

[21] Piva SJ, Duarte MM, Da Cruz IB, Coelho AC, Moreira AP, Tonello R, Garcia SC, Moresco RN. Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in obesity. *Clin Biochem*. 2011; Mar;44(4):345-7

[22] Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, Da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoproteinE polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res*. 2005; Dec30;4(4):691-703.

[23] Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer Cda C, da Rocha MI, Mânica-Cattani MF, Soares FA, Rosa G, Maris AF, Battiston FG, Trott A, Lera JP. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. 2012; Oct;60(1):30-3.

[24] Kim JH, Park SG, Lee KH, Choi JH, Ha EH, Myung SK, Hong YC. GSTM1 and GSTP1 polymorphisms as Potential Factors for Modifying the Effect of Smoking on Inflammatory response. *J. Korean Med. Sci*. 2006; 21:1021-7.

[25] Ramprasath, T, SenthilMurugan, P, Prabakaran, AD, Gomathi, P, Rathinavel, A, Selvam, GS. Potential risk modifications of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 (glutathione-S-transferases) variants and their association to CAD in patients with type-2 diabetes. *Biochem.Biophys. Res. Commun*. 2011; 407, 49–53.

[26] Moussa SA. Oxidative stress in Diabetes mellitus. *Romanian J Biophys*.2008; 18(3):225–236.

[27] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev BiochemMol Biol*. 1995; 30: 445-600.

[28] Yalin S, Hatungil R, Tamer L, Ates NA, Dogruer N, Yildirim H, Karakas S, Atik U. Glutathione S-trans - ferase gene oymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct*. 2007; 25: 509-13.

[29] Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *DiabVasc Dis Res*. 2011; jan;8(1):22-8.

[30] Sorrentino SA<sup>1</sup>, Besler C, Rohrer L, Meyer M, Heinrich K, Bahlmann FH, Mueller M, Horváth T, Doerries C, Heinemann M, Flemmer S, Markowski A, Manes C, Bahr MJ, Haller H, von Eckardstein A, Drexler H, Landmesser U.

Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*. 2010; Jan 5;121(1):110-22.

[31] Rotter,V, Nagaev, I. Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* 2003; V, 278, n. 46, p. 45777-84.

[32] Kahn, BB, Flier, JS. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Investig.* 2000; 106, 473–481.

[33] Giron MD, Salto R, Gonzalez Y. Modulation of hepatic and intestinal glutathione S-transferases and other antioxidant enzymes by dietary lipids in streptozotocin diabetic rats. *Chemosphere*. 1999; 38:3003–3013.

[34] Karalis, KP, Giannogonas, P, Kodela, E, Koutmani, Y, Zoumakis, M, Teli, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS*. 2009; v. 276, n. 20, p. 5747-47.

### Legends:

**Figure 1-** TBARS levels in the groups studied. Data are expressed as median (interquartile ranges). Normality was assessed by Kolmogorov - Smirnov test. Data were processed for analysis for One-way ANOVA followed Bonferroni post hoc test.

\* $P < 0.05$  compared to Normal Weight Group.

**Figure 2-** SH groups levels in the groups studied. Data are expressed as means  $\pm$  SD. Normality was assessed by Kolmogorov - Smirnov test. Data were processed for analysis for One-way ANOVA followed Bonferroni post hoc test.

\* $P < 0.0001$  compared to Normal Weight Group.

\*\* $P < 0.0001$  compared to Overweight Group.

**Figure 3-** GTSP1 gene polymorphism in obeses and non obeses subjects. Genotyping of GSTP1 Ile<sup>105</sup>Val by PCR on 1.5% agarose gel, which distinguishes between the GSTP1 genotypes: AA (Ile/Ile) – lines 1,2,5 and 7 (176 bp); AG (Ile/Val) – lines 3 and 4 (176, 91 and 85 bp); GG (Val/Val) – line 6.

**Figure 4-** GTSP1 gene polymorphism in obeses and non obeses subjects. Frequency distribution of genotypes in the population studied. Chi square test: 11.975,  $p = 0.01$ .



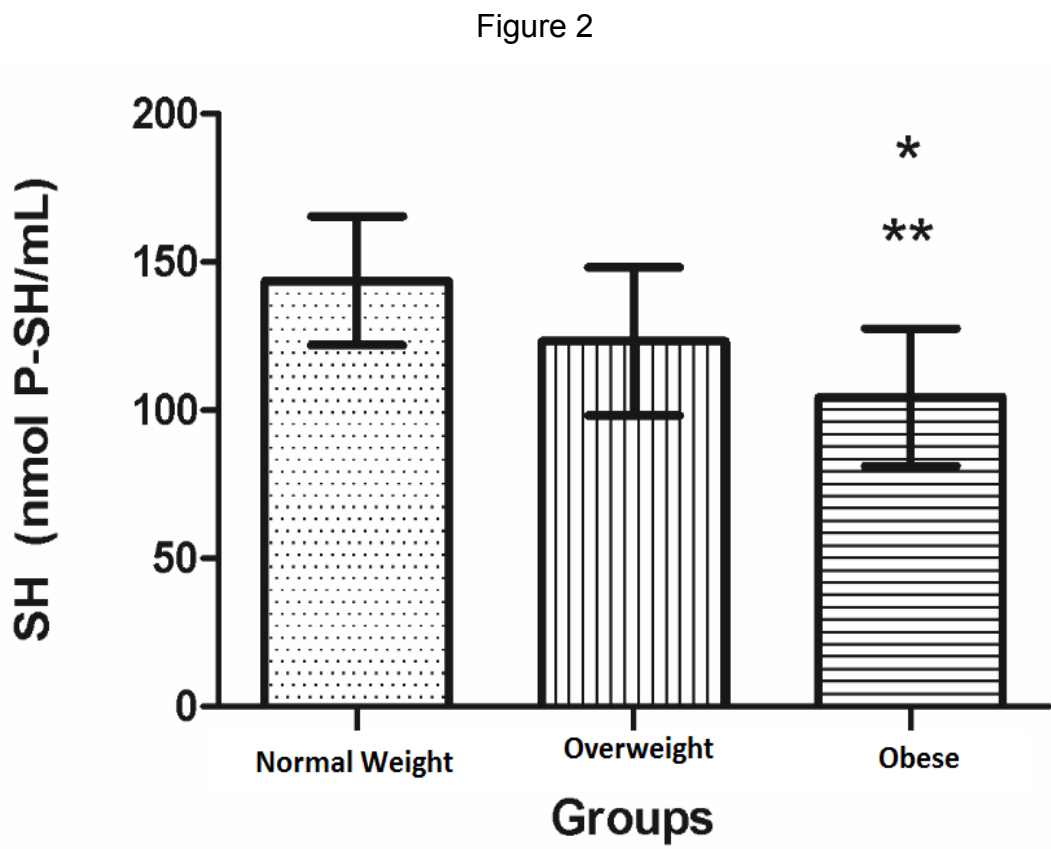
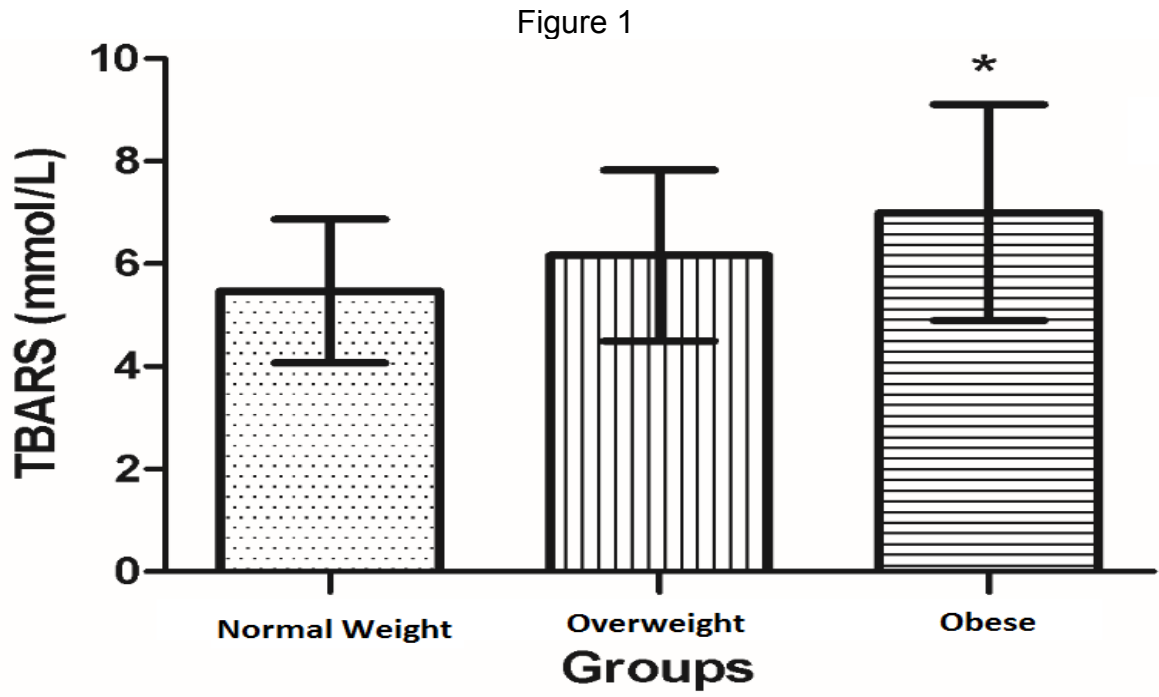


Figure 3

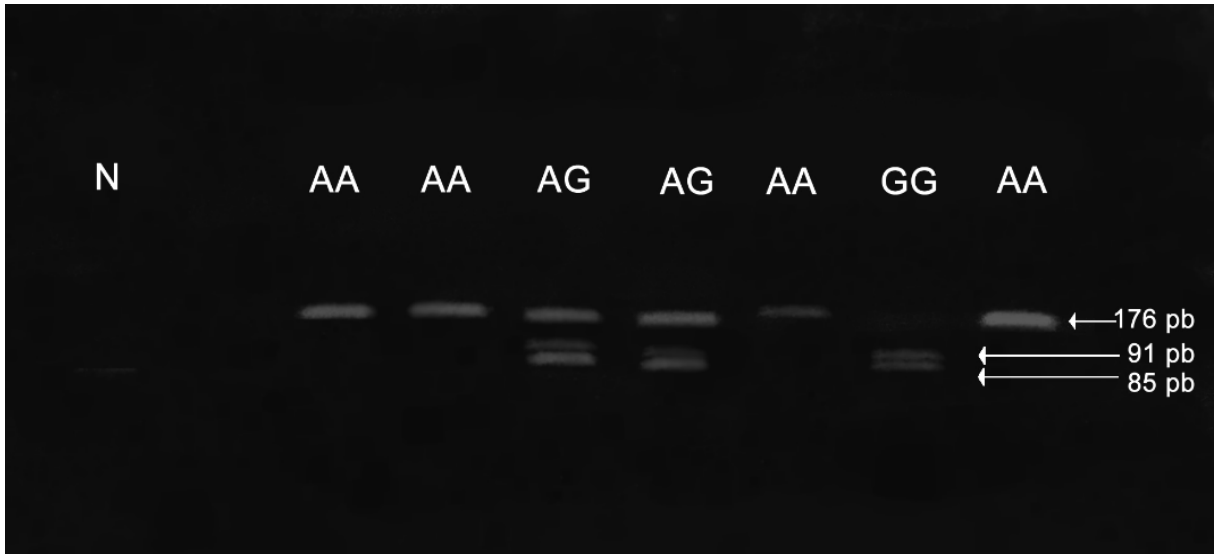
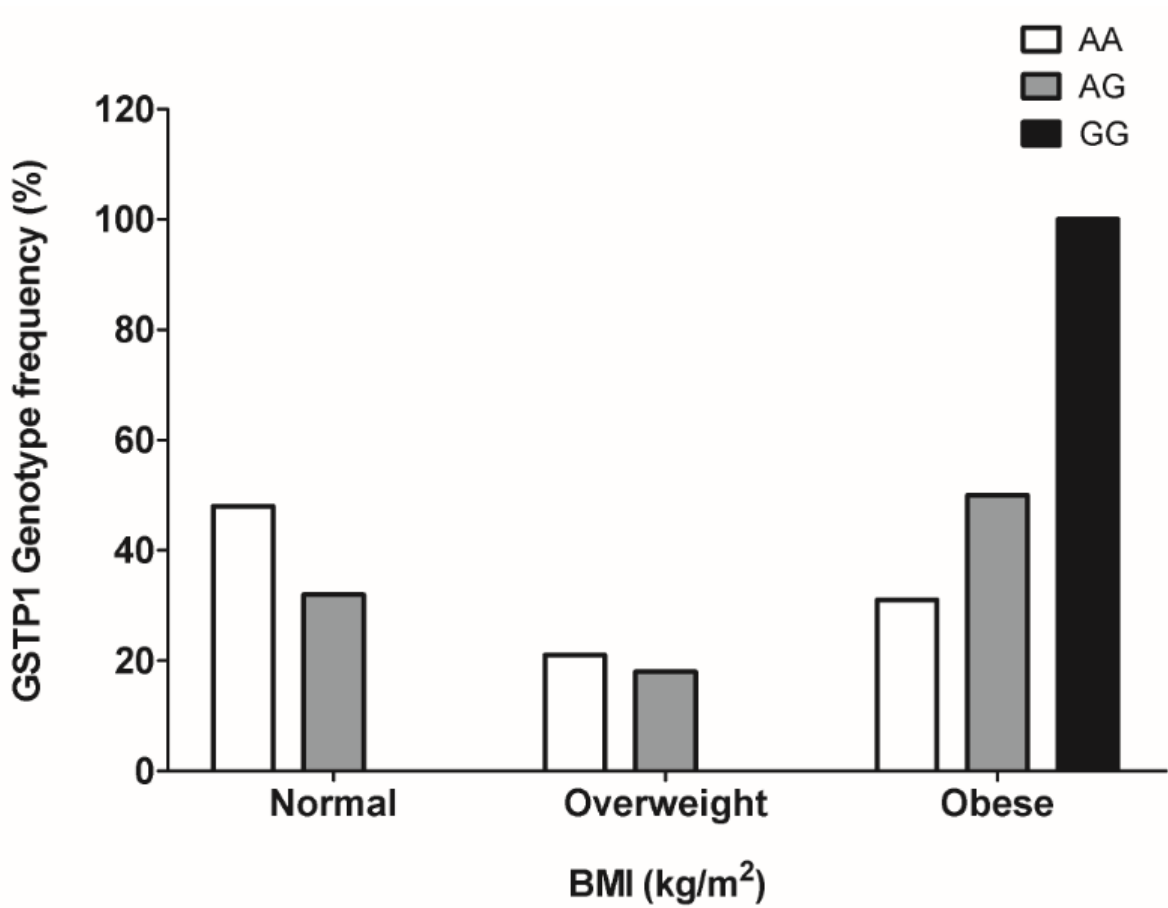


Figure 4



**Table 1:** Baseline characteristics of study participants.

	Groups		
	Normal weight	Overweight	Obese
N	54	27	68
Male / Female	22/32	10/17	27/41
Age (years)	21.0 (19.8-24.0)	24.0 (21.0-26.0)	25.0 (22.0-27.0)
Weight (Kg)	60.1 ± 9.4	77.2 ± 7.0 <sup>†</sup>	97.7 ± 16.0 <sup>†‡</sup>
Height (cm)	167.8 ± 7.3	167.0 ± 8.3	166.8 ± 10.5
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	20.9 (19.3 – 22.6)	28.1 (26.5 – 28.7) <sup>†</sup>	34.1 (32.4 – 37.5) <sup>†‡</sup>
NC (cm)	36.0 ± 4.3	36.0 ± 3.3	38.8 ± 3.5 <sup>†‡</sup>
WC (cm)	72.3 ± 6.8	87.7 ± 6.3 <sup>†</sup>	104.2 ± 13.7 <sup>†‡</sup>
HC (cm)	95.7 ± 6.2	107.1 ± 5.5 <sup>†</sup>	117.8 ± 8.9 <sup>†‡</sup>
SBP (mmHg)	120.9 ± 11.7	126.3 ± 11.2	136.7 ± 14.2 <sup>†‡</sup>
DBP (mmHg)	72.0 (67.8 – 80.0)	81.0 (73.0 – 89.0) <sup>†</sup>	86.0 (77.0 – 93.0) <sup>†</sup>
Body Fat (%)	25.3 (18.9 – 28.9)	33.3 (27.4 – 36.8) <sup>†</sup>	38.7 (34.8 – 41.6) <sup>†‡</sup>
Fat Body Mass (Kg)	14.9 (12.7 – 17.9)	24.2 (21.0 – 28.3) <sup>†</sup>	36.1 (31.1 – 40.7) <sup>†‡</sup>

Data are expressed as means ± SD or median (interquartile ranges). Data were processed for analysis for One-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test. BMI: Body Mass Index; NC: Neck Circumference; WC: Waist Circumference; HC: Hip Circumference; SBP: Systolic Blood Pressure; DBP: Diastolic Blood Pressure.

<sup>†</sup> $p < 0.0001$  compared to normal weight group.

<sup>‡</sup> $p < 0.0001$  compared to overweight group.

**Table 2:** Biochemical profiles of study participants.

	Groups		
	Normal weight	Overweight	Obese
GST (U/L)	69.9 (65.7 – 75.5)	65.7 (57.8 – 70.6)	61.9 (43.9 – 72.9)*
Triglycerides (mg/dL)	79.0 (59.0 – 103.3)	92.0 (77.0 – 126.0)*	91.0 (75.3 – 127.0)*
Cholesterol (mg/dL)	180.0 (161.0 – 192.0)	191.0 (179.0 – 236.0)**	209.0 (175.0 – 229.0)**
HDL (mg/dL)	55.5 ± 9.6	50.4 ± 11.0	46.3 ± 10.9*
LDL (mg/dL)	110.0 (91.0 – 122.3)	117.0 (105.0 – 145.0)**	137.0 (111.0 – 160.0)**
PCR - US (mg/dL)	0.04 (0.01 – 0.27)	0.23 (0.07 – 0.81)**	0.52 (0.15 – 1.33)**
Glucose (mg/dL)	79.6 ± 6.7	87.1 ± 7.2	83.4 ± 10.8**
HbA1c (%)	4.9 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.3 ± 0.4***‡
Insulin (uIU/mL)	9.5 (6.8 – 11.5)	11.0 (8.6 – 14.2)	13.8 (10.3 – 20.0)**‡
HOMA	1.8 (1.3 – 2.3)	2.2 (1.6 – 3.0)	3.1 (2.0 – 4.4)**‡
Insulin Sensitivity	0.35 (0.34 – 0.37)	0.34 (0.32 – 0.36)	0.32 (0.30 – 0.35)**‡

Data are expressed as means ± SD or median (interquartile ranges). Data were processed for analysis, where One-way ANOVA followed Bonferroni post hoc test.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0001$  compared to Normal Weight Group.

‡ $P < 0.0001$  compared to Overweight Group.

**Table 3:** Anthropometric variables comparison between study groups with different Ile<sup>105</sup>Val I polymorphism of the GSTP1 gene.

Variables	GSTP1			p
	AA	AG	GG	
Weight (Kg)	75.7±20.1	81.0±20.9	106.7±8.1	0.01
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	26.7±7.2	29.1±7.0	33.4±3.1	0.01
Neck Circumference (cm)	34.8±4.2	36.3±4.2	40.6±2.1	0.01
Waist Circumference (cm)	85.4±15.2	90.6±18.6	108.2±7.9	0.01
Hip circumference (cm)	105.1±12.6	108.8±12.1	116.2±8.2	<0.05
Systolic Blood Pressure (mmHg)	125.7±13.2	129.7±14.7	146.0±15.4	0.01
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	81.2±17.7	81.3±12.1	86.0±13.4	0.72
Body Fat (%)	30.9±8.6	32.8±8.2	32.4±4.3	0.40
Fat Body Mass (Kg)	24.3±11.7	28.3±13.9	34.8±6.9	<0.05

Data are expressed as means ± SD. ANOVA multivariate test followed by Bonferroni post hoc test. Value of  $p < 0.05$  is statistically significant.

**Table 4:** Biochemical variables comparison between study groups with different Ile<sup>105</sup>Val polymorphism of the GSTP1 gene.

Variables	GSTP1			p
	AA	AG	GG	
GST (U/L)	64.2±14.1	64.4±15.1	61.1±17.2	0.87
Triglycerides (mg/dL)	82.9±9.8	84.4±9.5	84.2±8.5	0.50
Cholesterol (mg/dL)	192.4±30.6	194.7±39.9	216,5±32.0	0.32
HDL (mg/dL)	50.6±11.7	49.6±10.9	50.5±8.5	0.85
LDL (mg/dL)	121.3±28.2	124.6±36.4	148.3±31.2	0.18
Glucose (mg/dL)	82.4±9.7	84.4±9.5	84.2±8.3	0.50
HbA1c (%)	5.0±0.3	5.1±0.3	5.4±0.4	0.02
Insulin (uUI/mL)	13.1±8.1	13.7±10.6	10.6±4.9	0.72
HOMA	2.7±1.9	2.8±2.4	2.2±1.0	0.76

Data are expressed as means ± SD. ANOVA multivariate test followed by Bonferroni post hoc test. Value of p < 0.05 is statistically significant.

### 3.3 Manuscrito 2

## ADIPOCYTOKINES, INFLAMMATORY AND OXIDATIVE STRESS MARKERS OF CLINICAL RELEVANCE ALTERED IN YOUNG OVERWEIGHT/OBESE SUBJECTS

*Eduardo Ottobelli Chielle<sup>a,c</sup>, Willian Marciel de Souza<sup>c</sup>, Thainan Paz da Silv<sup>a</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>a,b</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>a,b\*</sup>*

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences

Department of Clinical and Toxicology Analysis

Center of Healthy Sciences

Federal University of Santa Maria (UFSM)

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Pharmacology- Center of Healthy Sciences

UFSM-Santa Maria-Brazil

<sup>c</sup>Center Healthy Sciences – University of West of Santa Catarina - UNOESC –

89900-000 - São Miguel do Oeste - SC – Brazil

\*Corresponding author:

Maria Beatriz Moretto

beatriz@smail.ufsm.br

Phone: +55 - 3220 8018 97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the study was to assess the influence of overweight and obesity in youth on adipocytokine levels, inflammatory and oxidative markers.

**Design and methods:** Cross-sectional study of 149 young adults (54 normal weight, 27 overweight, 68 obese). Clinical and biochemical parameters, including lipid profile, fasting glucose, insulin and HOMA were determined. The levels of adipokines (adiponectin, Retinol-binding protein 4 (RBP4), and resistin), markers of inflammation (high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) adenosine deaminase (ADA), dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) activities, serum IL-6 levels and oxidative stress (malondialdehyde and ferric reducing antioxidant power - FRAP) were measured.

**Results:** Obese subjects presented significantly lower levels of Sulfhydryl groups (SH groups), adiponectin, HDL-C and the highest levels of RBP4, hs-CRP, resistin, IL-6, ADA, DPP-IV activities, and oxidative markers than compared to those who were of normal weight. There was a positive correlation between hs-CRP, IL-6, DPP-IV activity, anthropometric measurements and biochemical parameters.

**Conclusions:** This analysis shows that resistin, RBP4, IL-6, ADA and DPP-IV activities and the reduction of adiponectin can promote inflammation, impairment of insulin sensitivity, and may contribute development of the pathways involved in obesity. These findings may hold promise in identifying new inflammatory markers, benchmarks that assist in the diagnosis and monitoring of patients with overweight and obese.

**Keywords:** Obesity; adipocytokines; Adenosine deaminase; Dipeptidyl peptidase-IV; young adult

**Abbreviations**

ADA – Adenosine deaminase

Ado – Adenosine

Apo B – Apolipoprotein B

BMI – Body Mass Index

CVD – Cardiovascular Disease

DBP – Diastolic Blood Pressure

DM2 – Diabetes mellitus 2

DPP-IV – Dipeptidyl Peptidase-IV

FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

GLUT-4 – Glucose Transporter 4

HbA1c – Glycated hemoglobin A1c

HC – Hip Circumference

HDL-C – High Density Lipoprotein Cholesterol

HOMA – Homeostasis Model Assessment

hs-CRP – High-sensitivity C-reactive protein

IR – Insulin Resistance

LDL-C – Low Density Lipoprotein Cholesterol

MetS – Metabolic Syndrome

IRS-1 – Insulin Receptor Substrate 1

IL-6 – Interleukin 6

NC – Neck Circumference

NF- $\kappa$ B – Nuclear Factor Kappa B

RBP4 – Retinol-Binding Protein 4

SBP – Systolic Blood Pressure

SH groups – Sulfhydryl groups

SI – Insulin Sensitivity

TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor-alpha

TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

WC – Waist Circumference



## Introduction

Excess weight and obesity are two of the most complex clinical syndromes whose prevalence has reached epidemic proportions in recent decades, especially in earlier ages [1]. Current data indicate that 52.5% of Brazilians are overweight and 17.9% are obese. Carrying excess weight is more common among men (56.5%), while obesity is higher in women (18.2%), with a 23% weight increase over the last nine years [2]. Human obesity is accepted as an important risk factor for development of Metabolic Syndrome (MetS), Diabetes mellitus, dyslipidemia, atherosclerosis, hypertension, insulin resistance, hepatic steatosis, non-alcoholic liver disease and high morbidity and mortality [3].

Multiple mechanisms may contribute to obesity-related comorbidity development, including an abnormal production of adipocytokines, aberrant oxidative stress and dysregulated proinflammatory response in tissues such as the muscle and liver [4]. Both obesity and oxidative stress can manifest as early as the first two decades of life [5].

Adipocytokines and inflammatory markers could mediate the facilitating effect of obesity on the appearance of its comorbidities such as insulin resistance (IR), diabetes mellitus 2 (DM2) and cardiovascular disease (CVD) [5]. Adiponectin levels were previously observed to be significantly diminished with both obesity and DM2 and a significant negative correlation was detected between adiponectin and the parameters of obesity [6]. Evidence demonstrates that low adiponectin concentrations correlate with high plasma insulin and high IR, while adiponectin administration was found to suppress proinflammatory agents, e.g., tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and IL-6, and directly ameliorate endothelial dysfunction [7]. Furthermore, resistin is an adipokine specifically expressed in white adipose tissue that has secretion strongly related to insulin resistance. The highest levels were observed in DM2 subjects [8], and also correlated with markers of inflammation and can be a predictor of coronary atherosclerosis [9].

Another prominent adipokine, the Retinol-binding protein 4 (RBP4), mainly secreted by adipocytes and liver is the main protein carrier of vitamin A in the circulation [10]. Recent studies demonstrate that RBP4 levels were increased in obese and IR human and mice models. Additionally, a genetic or pharmacologic elevation of serum RBP4 causes insulin resistance in normal mice, probably by

inhibiting insulin signaling and stimulating gluconeogenesis [11]. Evidences shows strong correlations of serum RBP4 levels with the severity of insulin resistance, obesity, hypertension, dyslipidemia, waist/hip ratio, cardiovascular disease, and intra-abdominal fat mass [12]. However, others results do not demonstrate these correlations, thus, this is still poorly understood [13].

It is well known that the chronic inflammatory response is characterized by increases in the production of markers of inflammation i.e., C-reactive protein (CRP), IL-6 and TNF- $\alpha$  [14]. In particular, in our recent studies we observed an increase in Adenosine deaminase (ADA), dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) activities in MetS subjects and in the activity of these enzymes in saliva of obese young adults [15]. These enzymes in inflammatory processes may influence insulin sensitivity since the ADA reduces levels of adenosine (Ado), important to the transport of glucose in the adipocytes. In addition, DPP-IV activity may be required for T-cell activation cascade together with ADA [16].

This way, considering that systemic inflammation could be the causative link between obesity and various diseases, as well as obesity is associated with a chronic inflammatory response characterized by abnormal adipokine production, and the activation of several proinflammatory signalling pathways resulting in the induction of several biological markers of inflammation [7], the purpose of the present study was to evaluate the adipocytokines (adiponectin, RBP4 and resistin) levels, inflammatory markers (IL-6, hs-CRP, ADA and DPP-IV activities) and oxidative markers (TBARS, FRAP and SH groups), in order to clarify the influence of adiposity on the metabolic risk profile and the metabolic consequences of weight change in early adulthood in overweight and obese young adults.

## **Materials and methods**

### *Study design and Study Population*

This cross-sectional study and measurements were taken in a single moment. Participants were recruited at January to august 2013 in São Miguel do Oeste city Santa Catarina State located in southern Brazilian Region. The patients were from basic health units. The protocol of the study was approved by the Ethics Committee

of the University of West Santa Catarina (UNOESC - nº 219.091) and all participants provided written informed consent. The groups studied included 149 young subjects with aged between 18 and 30 years: 54 normal weight subjects and gender-matched healthy volunteers served as control group (32 females and 22 males). The subjects with increased weight were divided in two subgroups, matched for sex, age, and body mass index, and were enrolled as follows: 1) 27 overweight subjects (17 females and 10 males); 2) 68 obese young subjects (41 females and 27 males). The participants were non-smokers and were not taking any medications. The group studied did not present previous diseases such as DM, coronary, stroke, neoplasias, other diseases or dysfunctions that could influence the obesity status.

### *Anthropometric measurements*

All measures were taken in the Anthropometry Laboratory at UNOESC. Standing height (H, cm) using a wall-mounted stadiometer (Charder, model HM-210D). Weight (W,kg) was measured using a calibrated electronic scale (Toledo, model 2124). Body Mass Index (BMI) was calculated as  $W/H^2$  (kg/m<sup>2</sup>). Waist Circumference (WC), neck circumference (NC) and hip circumference (HC) were measured in centimeters with a flexible tape. For WC the tape was applied above the iliac crest with the subject standing with the abdomen relaxed and arms at your sides and your feet together (feet close in the same position and facing forward fully supported on the platform). NC for the participant remained in the same position and tape was placed on half of the neck on the hyoid bone. The percentages of fat and fat weight were determined by bioimpedance (Biodynamics Model 450). All measurements were taken on the left side of the body, according to standardized procedures by Weiner and Lourie, 1981 [17]. During the anthropometric measurements, all participants were barefoot and clothed appropriately.

### *Indices and classifications*

According to the World Health Organization, underweight was defined as BMI <18.5 kg/m<sup>2</sup>, normal weight as BMI 18.5–24.9 kg/m<sup>2</sup>, overweight as BMI 25–29.9 kg/m<sup>2</sup>, and obesity as a BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup> [18], all without comorbidities. According to Gallagher et al., 2000 [19] % fat ≥ 20% (males) and % fat ≥ 33% (females) are the

cut-points adopted to define over fatness, corresponding to overweight classification using BMI in a population of young adults. According to the National Institute for Health and Clinical Excellence guidelines, WC  $\geq 102$  cm for men and  $\geq 88$  cm for women are prerequisite risk factors for the diagnosis of the metabolic syndrome, as WSR  $\geq 0.5$  for both males and females [20].

### *Laboratory measurements*

Blood samples containing liquid EDTA and serum samples were obtained from collected blood samples from participants after an overnight fast of at least 12 hours. Total blood cholesterol, HDL-C, triglyceride, glucose and uric acid were measured enzymatically using a commercial assay kit (Labtest Diagnostics<sup>®</sup> - Brazil). LDL-c was subsequently calculated using the Friedewald formula [21].

The insulin and hs-CRP were determined by electrochemiluminescent immunoassay using an Elecsys 2010 analyzer (Roche diagnostics<sup>®</sup>). Insulin resistance index was calculated by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as (fasting insulin mIU/L)  $\times$  (fasting glucose mg/dL)/22.5 and evaluation of Insulin Sensitivity (SI), the index QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) was used. HbA<sub>1c</sub> was measured by high performance liquid chromatography and expressed as %.

The serum adiponectin, resistin and RBP4 concentrations were measured in duplicate using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) in the Luminex 100 IS Analyser System (Luminex Corp, Austin, TX, USA). The resistin showed sensitivity of 0.16 ng/mL, accuracy of 90-108%, inter-assay precision was 7.1-7.7% and intra-assay 3.2-7.0% and the curve range: 0.16-10 ng/mL. Adiponectin showed a sensitivity of 1.5 ng/mL, accuracy of 92-102%, inter-assay precision was 2.4-8.4% and intra-assay 1.0-7.4% and the curve range: 1.5-100 ng/mL. RBP4 showed a sensitivity of 0.78 ng / mL, accuracy of 76-113%, inter-assay precision was 3.8% and intra-assay 4.8% and the curve range: 0.14-100 ng/mL.

Serum IL-6 levels were determined by ELISA using commercial kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The detection limits of the assays were: 0.09 pg/ml, the sensitivity of 2 pg/mL and the curve range: 23.3 to 2560 pg/mL.

DPP-IV activity was determined by spectroscopic quantification of glycyL-prolyL-p-nitroanilide hydrolysis [22]. Results were expressed as the specific activity (U/L). All other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

ADA activity was determined by commercial kit (Ebram Products Laboratory Ltda.<sup>®</sup>, SP – Brazil) according with the enzymatic deamination of adenosine to inosine by kinetic manner. The values were expressed in U/L.

Lipid peroxidation was estimated by measuring of TBARS according to the method of Lapenna et al., (2001) [23]. The determination of sulfhydryl groups levels was based on Boyne and Ellman, (1972) [24]. FRAP levels was estimated according to Singh et al. (2012) [25]. All were determined by spectroscopic quantification.

### *Statistical Analysis*

The data were analyzed using Statistica 6.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Data are expressed as means  $\pm$  SD or median (interquartile ranges). The Kolmogorov-Smirnov test was used examine the distribution of variables. Comparisons of baseline data among the groups were performed using One-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test. Spearman correlation coefficients were calculated to describe crude associations between variables (bivariate correlation) and the effect of potential confounding factors was tested in multivariate linear regression models. A  $p$ -value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### *General characteristics of the study population*

Baseline characteristics of study participants are described in Table 1. As expected, weight, BMI, hip and waist circumference, percentage of body fat and body fat mass in the obese group exhibited a significant increase ( $p<0.0001$ ) when compared with the normal and overweight groups.

### *Biochemical Analysis*

The concentrations of biochemical, inflammatory and oxidative parameters are presented in Table 2. The obese group exhibited a significant increase in insulin, glucose, HbA1c, HOMA, cholesterol, LDL-C, uric acid and hs-CRP ( $p < 0.0001$ ), as well as triglycerides, ADA, DPP-IV, IL-6, FRAP and TBARS ( $p < 0.05$ ) when compared to the normal weight group. Among the obese group there was a significant reduction in SH groups, insulin sensitivity ( $p < 0.0001$ ) and HDL-C ( $p < 0.05$ ) when compared to the normal group. Moreover, the obese group displayed a significant increase ( $p < 0.0001$ ) in insulin, HbA1c and HOMA and a significant reduction ( $p < 0.0001$ ) in SH groups and insulin sensitivity when compared to the overweight group. The overweight group also showed a significant increase in cholesterol, LDL-C, hs-CRP ( $p < 0.0001$ ) and triglycerides ( $p < 0.05$ ) when compared to the normal weight group. No significant differences between men and women of the studied groups were observed.

### *Evaluation of Adipocytokine Levels*

Basal plasma concentrations of adipocytokines (adiponectin, resistin and RBP4) are shown in Figure 1A-B-C. The lowest levels of adiponectin were found in the obese group, which displayed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of adiponectin compared to the normal weight group (Figure 1A). Furthermore, there was a significant increase in resistin ( $p < 0.05$ ) and RBP4 ( $p < 0.0001$ ) in the obese group when compared to the normal weight group (Figure 1B-C).

### *Correlations between analyzed parameters*

We observed a significant and positive correlation between hs-CRP and body fat percentage in the obese group ( $r = 0.4610$ ;  $p < 0.0001$ ). Positive correlations were also observed between IL-6 and BMI ( $r = 0.3653$ ;  $p = 0.002$ ), glucose ( $r = 0.2719$ ;  $p = 0.02$ ), insulin ( $r = 0.2491$ ;  $p = 0.04$ ), HOMA ( $r = 0.2873$ ;  $p = 0.01$ ) and negatively correlated with insulin sensitivity ( $r = -0.2702$ ;  $p = 0.02$ ) and HDL-C ( $r = -0.2479$ ;  $p = 0.04$ ). The correlation was still observed between DPP-IV and neck circumference

( $r=0.3774$ ;  $p= 0.001$ ). The same correlations were performed in the overweight and obese group and no significant correlations were observed.

## Discussion

As expected, the study results indicated that with the exception of adiponectin, the obese group had higher indices evaluated than both normal-weight and overweight groups (Fig. 1A). The novel finding was the adipocytokines effects in young people in combination with other biomarkers may produce an impact in the obesity state. In this regard, adiponectin is the most abundant adipose tissue-derived cytokine with anti-inflammatory and anti-atherogenic properties. It has been shown to have insulin-sensitizing activity and is crucial for maintaining adipose tissue function [26]. In fact, previously it was observed that plasma adiponectin levels were lower in patients with CVD than in controls and it is associated with defects in the catabolism of VLDL-apo B particles [27,28]. Thus, reduced levels of this adipokine over a prolonged time, contribute to future metabolic disorders in the obese organism.

We observed that resistin levels increase parallel to increases in BMI, and also, a significant increase in cholesterol, LDL-C and triglyceride concentrations in the overweight and obese groups when compared to the normal weight group. Indeed, resistin is induced during adipogenesis and may modulate numerous steps in the insulin-signaling pathway leading to IR [8]. It has been reported that human resistin can induce glycerol and the release of fatty acids, which in excess are associated with IR [29,30]. The elevated secretion of resistin in obese conditions may affect lipid metabolism in obese and overweight young adults triggering the production of LDL-C in liver cells and degrading the LDL-C receptor in the liver [31]. Furthermore, resistin has atherogenic action potential by increasing the expression of Intercellular Adhesion Molecule -1 and anti-vascular-1 in vascular endothelial cells and increasing nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activity, a flag for induction of these adhesion molecules [29].

In relation to RBP4, we postulate that its effect on blood lipid concentrations, especially triglyceride, may be mediated through its effect on the metabolism of hepatic fatty acids, which regulate the expression of genes involved in lipid metabolism [32]. Also, other studies have discerned circulating RBP4 levels positively

correlated with adiposity measures, inflammatory factors and percent of body fat [33]. However, in relation to the role of RBP4 in IR the results are contradictory [13].

Recent studies have shown that RBP4 levels were positively associated with serum triglyceride, systolic blood pressure, BMI and other components of metabolic syndrome [34,35]. Corroborating these results, we found a progressive increase of RBP4 in relation to increased BMI and an increase in insulin resistance markers, lipids and inflammatory markers. Then, we postulated that the increase of RBP4 levels could contribute to these abnormalities.

The second goal of the present study was to explore inflammatory cytokines, where we observed a positive association between IL-6 and BMI, glucose, insulin, HOMA and a negative association with insulin sensitivity. The increasing concentration of IL-6 in obesity is associated with reduced expression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and glucose transporter 4 (GLUT4) in muscle and liver tissues. This leads to IR and stimulates the production of CRP [36]. In fact, IL-6 has direct effects on insulin signaling in adipocytes and hepatocytes, increasing circulating free fatty acids and stimulating whole-body lipolysis and also inhibiting glucose metabolism in man [37,38,39,40]. Moreover, IL-6 may also induce IR, at least in part, by decreasing adiponectin secretion [41].

Regarding the results of oxidative stress measurements progressive increase TBARS levels in accordance with the increase in body weight and progressive decrease in SH groups according to body weight gain. The increased oxidative stress in vascular walls is involved in the pathogenesis of atherosclerosis, hypertension and induces damage to cell structures, including membranes, proteins, and DNA [42]. This contributes to the cardiometabolic diseases related to obesity. Indeed, besides impairing insulin secretion and glucose transport in muscle and adipose tissue, visceral fat accumulation induces an increase in systemic lipid peroxidation and damage through excess fatty acids and cytokines which then triggers systemic oxidative damage [43]. These findings are important especially considering the age of the study population. Concerning the increase of total antioxidant capacity in the obese group, we can be explained by the significant increase of uric acid in the same group, since uric acid can chelate metal ions such as iron, contributing to total antioxidant capacity [44].

The study emphasizes the significant increase in the evidence of the ADA and DPP-IV activities in obese subjects compared with the normal weight group (Table 2).



In fact, similar results in the saliva of obese subjects in our previous study were observed [15]. The increase in the ADA activity found in this study could be a contributing factor to the insulin sensitivity in obese subjects, since a reduction of Ado levels would reduce the purinergic input to the transport of glucose in the adipocytes and interfere with hydrolysis of lipids [45]. At the same time, the increased activity of DPP-IV in obese subjects may substantially augment the lipolytic activity of enlarged adipocytes. For this reason, the increased serum activity of DPP-IV and ADA in the obese group may be linked with hyperinsulinemic obesity since insulin, glucose levels, glycosylated hemoglobin levels and the HOMA index were significantly higher in the obese subjects, suggesting an important role of the of ADA and DPP-IV activities in developing IR in obese individuals. As a matter of fact, a previous study in our research group found association between HbA1c and DPP-IV activity in DM2 [46].

Some limitations must be acknowledged. First, the cross-sectional design of our study impedes a demonstrated etiological association among the markers; a longitudinal follow-up study is more appropriate for this type of investigation. Second, because subjects in this research were population-specific (a state of South of Brazil), a strong regional focus was applicable. Finally, the study also do not address the lifestyle, ethnicity, genetic of the volunteers. It shows only an association between obesity and the biomarkers investigated, but could contribute to obesity prevention, especially in vulnerable adolescents.

These results can integrate new knowledge concerning the possible interactions of inflammatory mediators with obesity in young adults for the prevention of chronic diseases in adulthood. The results presented herein are of relevant clinical importance. As demonstrated, evaluation of the various components of MS (adiposity, dyslipidemia and hypertension) may have beneficial effects in preventing DM2 and cardiovascular disease, and in improving insulin sensitivity, including weight reduction and physical activity. Therefore, our data confirm the need to develop and reinforce public health policies to prevent early obesity and to reduce yours effects.

## **Conclusion**

The most important finding of the study was that obesity and excess weight in young people could predispose significant changes in adipocytokines, inflammatory

and oxidative markers. The set of resistin, RBP4, ADA and DPP-IV activities and reduction of adiponectin, resulting from infiltration and activation of macrophages in adipose tissue, can promote inflammation and impairment of insulin sensitivity, therefore having a critical role in the pathogenesis of insulin resistance, dyslipidemia and atherosclerosis. These findings are particularly significant because they may help with monitoring changes of clinical relevance in the prevention of future cardiometabolic events in adults. The results could help determine the pathways involved in obesity-related inflammation that are relevant to the development of obesity in young individuals. Our results may also play a role in identifying inflammatory markers, especially, for the young population and, thus, contribute to the prevention complications related to obesity.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Federal University of Santa Maria (UFSM), and University of West of Santa Catarina (UNOESC), SC, Brazil, for support in this study. Also, we thank all the volunteers who participated in this study.

**Conflict of interest:** None.

### **References**

- [1] World Health Organization - Obesity: preventing and managing the global epidemic - Report of a WHO Consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000; 894:i-xii, 1-253 [01/07/15].
- [2] Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. VIGITEL Brasil 2014. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília-DF; 2015.  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2014.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2014.pdf) [09/07/15].
- [3] Marie NG, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of

Disease Study 2013. *The Lancet*; Early Online Publication; 2014; S0140-6736(14)60460-8.

[4] Park KH, Zaichenko L, Brinkoetter M, Thakkar B, Sahin-Efe A, Joung KE, et al. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4899–4907.

[5] Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 547–566.

[6] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2001; 86, 1930–1935.

[7] Deng G, Long Y, Yu YR, Li MR. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int. J. Obesity* 2010; 34, 165–171.

[8] Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409(6818): 307-12.

[9] Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 2005; 111, 932–939.

[10] Blaner WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 1989; 10:308–316.

[11] Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, et al. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol independent mechanism. *Mol Cell Biol* 2012; 32:2010–2019.

[12] Tschoner A, Sturm W, Engl J, Kaser S, Laimer M, Laimer E, et al. Retinol-binding protein 4, visceral fat, and the metabolic syndrome: effects of weight loss. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16:2439–2444.

[13] Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4—a controversial adipokine. *Eur J Endocrinol* 2011; 165:703–711.

[14] Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 2007; 56, 1010–1013.

- [15] Chielle EO, Bonfanti G, De Bona KS, Moresco RN, Moretto MB. Adenosine deaminase, dipeptidyl peptidase-IV activities and lipid peroxidation are increased in the saliva of obese young adult. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Jun;53(7):1041-7.
- [16] Yu DM, Slaitini L, Gysbers V, Riekhoff AG, Kähne T, Knott HM, et al. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances human lymphocyte proliferation in vitro independent of dipeptidyl peptidase enzyme activity and adenosine deaminase binding. *Scand J Immunol*. 2011; Feb;73(2):102-11.
- [17] Lourie JA., Weiner JS. *Practical Human Biology*. London: Academic Press; 1981.
- [18] James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obes Res*. 2001; 12:S228–S233.
- [19] Gallagher D<sup>1</sup>, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr*. 2000; 12(3):694–701.
- [20] Ashwell M, Hsieh SD. Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international public health message on obesity. *Int J Food Sci Nutr*. 2005; 12(5):303–307.
- [21] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499–502.
- [22] Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S. New chromogenic substrates for Xprolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem* 1976; 74:466-476.
- [23] Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31:331–5.
- [24] Boyne AF, Ellman, G. L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Analytical Biochemistry*, 1972; v. 46, p. 639–653.
- [25] Singh N, Bhardwaj P, Pandey RM, Saraya A. Oxidative stress and Antioxidant capacity in patients with chronic pancreatitis with and without diabetes mellitus. *Indian J Gastroenterol*. 2012; Sep;31(5):226-31.
- [26] Asterholm IW, Scherer PE. Enhanced metabolic flexibility associated with elevated adiponectin levels. *Am J Pathol*, 2010; 176, pp. 1364–1376.
- [27] ORourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin, II, et al. Depot-specific

differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 2009; 33(9):978-90.

[28] Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*. 2012;18(3):363-74.

[29] Ort T, Arjona AA, MacDougall JR, Nelson PJ, Rothenberg ME, Wu F. Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice. *Endocrinology* 2005; 146, p. 2200–2209.

[30] Kok BP, Brindley DN. Myocardial fatty acid metabolism and lipotoxicity in the setting of insulin resistance. *Heart Fail Clin* 2012; 8 pp. 643–661.

[31] Melone M, Wilsie L, Palyha O, Strack A, Rashid S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Am Coll Cardiol*. 2012; May 8;59(19):1697-705.

[32] Xia M, Liu Y, Guo H, Wang D, Wang Y, Ling W. Retinol binding protein 4 stimulates hepatic sterol regulatory element-binding protein 1 and increases lipogenesis through the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\beta$ -dependent pathway. *Hepatology* 2013; 58:564–575.

[33] Scribner KB, Odom DP, McGrane MM. Nuclear receptor binding to the retinoic acid response elements of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in vivo: effects of vitamin A deficiency. *J Nutr Biochem* 2006; 18pp. 206–214.

[34] Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 2006; 354:2552–63.

[35] Balagopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. Reduction of elevated serum retinol binding protein (RBP4) in obese children by lifestyle intervention: association with sub-clinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007:2006–712.

[36] Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB Journal* 2001; Vol. 15 pp. 43–58.

[37] Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002;51:3391–9.

- [38] Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:4167–70.
- [39] Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and betacell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 2002; 3:14–23.
- [40] Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, Steinberg GR, Macaulay SL, Febbraio MA, Pedersen BK. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288:E155–62.
- [41] Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocyte. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 301, 1045–1050.
- [42] Grundy, SM. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2005; 109, 433–438.
- [43] Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: A unifying hypothesis. *J. Nutr. Biochem.* 2008; 19, 491–504.
- [44] Yeum KJ, Russel RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2004, v. 430, n.1, p.97-103.
- [45] Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Salvador J. Leptin induced Lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *FASEB J.* 2001; Feb;15(2):333-40.
- [46] Bellé LP, Bitencourt PE, De Bona KS, Moresco RN, Moretto MB. Association between HbA1c and dipeptidyl peptidase IV activity in type 2 diabetes mellitus. Letter to the Editor. *Clinica Chimica Acta.* 2012; 413 1020–1021.

**Legends:**

**Figure 1A.** Plasma levels of Adiponectin. Data are expressed as means  $\pm$  SD in ng/mL. Data were processed for analysis, where One-way ANOVA followed by Tukey's test.  
\* $p < 0.05$  compared to Normal Weight Group

**Figure 1B.** Plasma levels of Resistin. Data are expressed as means  $\pm$  SD in ng/mL. Data were processed for analysis, where One-way ANOVA followed by Tukey's test..  
\* $p < 0.05$  compared to Normal Weight Group

**Figure 1C.** Plasma levels of RBP-4. Data are expressed as median (interquartile ranges) in ng/mL. Data were processed for analysis, where Kruskal Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test.  
\* $p < 0.0001$  compared to Normal Weight Group

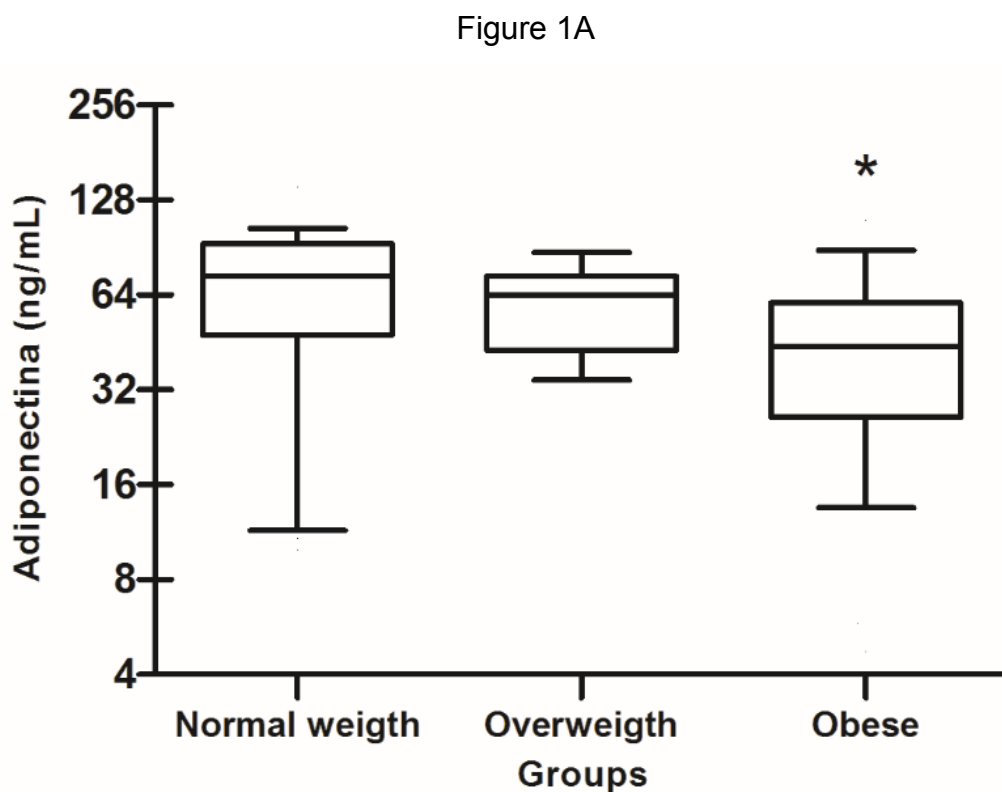


Figure 1B

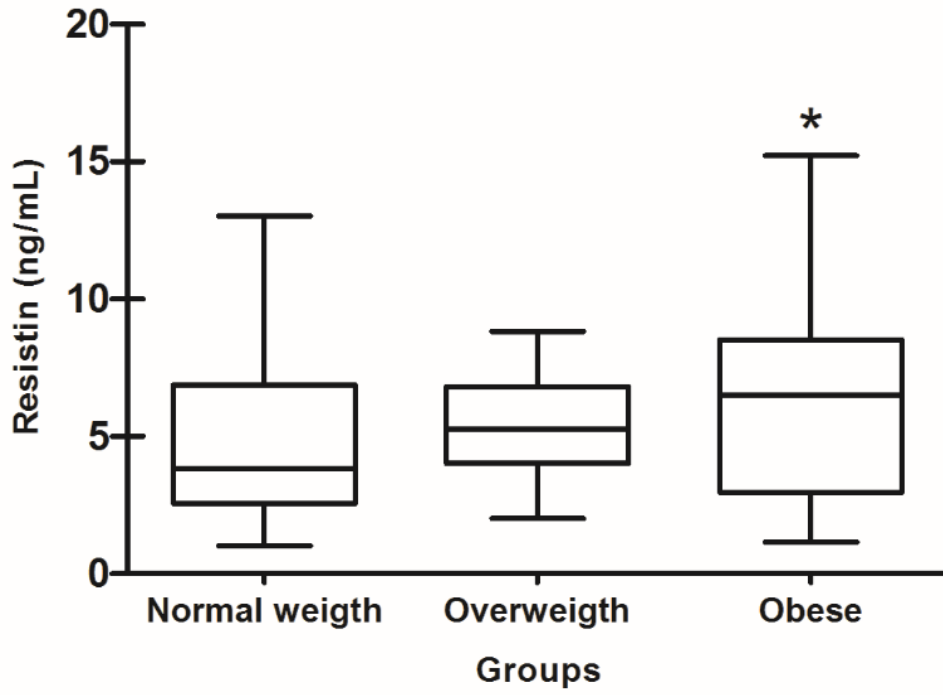
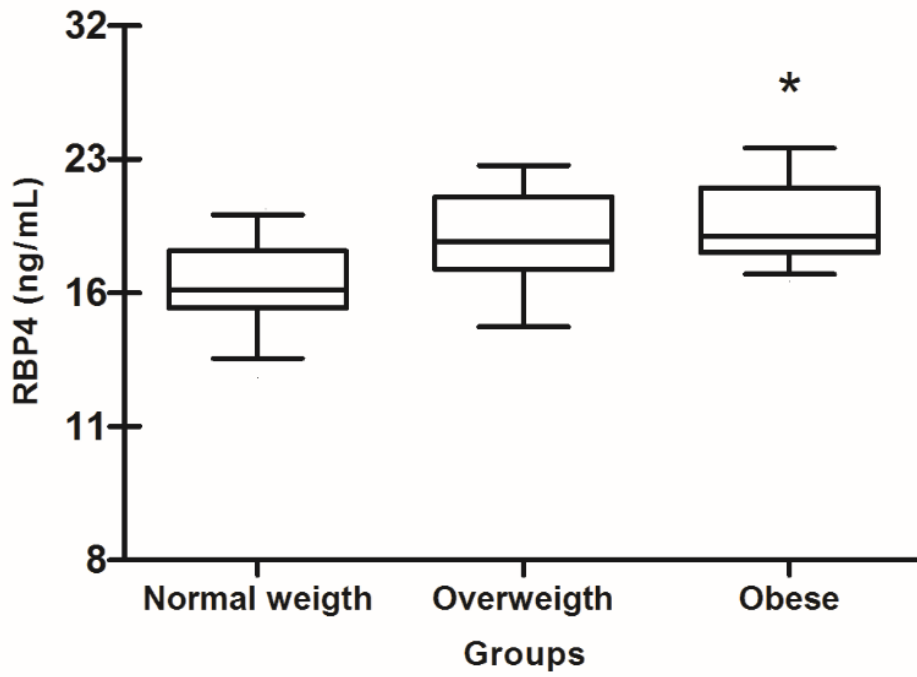


Figure 1C





**Table 1:** Baseline characteristics of study participants.

	Groups		
	Normal weight	Overweight	Obese
N	54	27	68
Male / Female	22/32	10/17	27/41
Age (years)	21.0 (19.8-24.0)	24.0 (21.0-26.0)	25.0 (22.0-27.0)
Weight (Kg)	60.1 ± 9.4	77.2 ± 7.0*	97.7 ± 16.0**‡
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	20.9 (19.3 – 22.6)	28.1 (26.5 – 28.7)*	34.1 (32.4 – 37.5)**‡
WC (cm)	72.3 ± 6.8	87.7 ± 6.3*	104.2 ± 13.7**‡
HC (cm)	95.7 ± 6.2	107.1 ± 5.5*	117.8 ± 8.9**‡
Body Fat (%)	25.3 (18.9 – 28.9)	33.3 (27.4 – 36.8)*	38.7 (34.8 – 41.6)**‡
Fat Body Mass (Kg)	14.9 (12.7 – 17.9)	24.2 (21.0 – 28.3)*	36.1 (31.1 – 40.7)**‡

Data are expressed as means ± SD or median (interquartile ranges). Data were processed for analysis for One-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test. BMI: Body Mass Index; WC: Waist Circumference; HC: Hip Circumference.

\* $p < 0.0001$  compared to normal weight group.

‡ $p < 0.0001$  compared to overweight group.

**Table 2:** Biochemical characteristics of the experimental groups.

	Groups		
	Normal Weight	Overweight	Obese
Glucose (mg/dL)	79.6 ± 6.7	83.4 ± 7.2	87.1 ± 10.8**
HbA <sub>1c</sub> (%)	4.9 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.3 ± 0.4**‡
Insulin (µUI/mL)	9.5 (6.8 – 11.5)	11.0 (8.6 – 14.2)	13.8 (10.3 – 20.0)**‡
Cholesterol (mg/dL)	180.0 (161.0 – 192.0)	191.0 (179.0 – 236.0)**	209.0 (175.0 – 229.0)**
LDL-c (mg/dL)	110.0 (91.0 – 122.3)	117.0 (105.0 – 145.0)**	137.0 (111.0 – 160.0)**
HDL-c (mg/dL)	55.5 ± 9.6	50.4 ± 11.0	46.3 ± 10.9*
Triglycerides (mg/dL)	79.0 (59.0 – 103.3)	91.0 (77.0 – 126.0)*	92.0 (75.3 – 127.0)*
Uric acid (md/dL)	3.8 ± 1.0	4.2 ± 1.0	4.7 ± 1.7**
ADA (U/L)	13.6 (11.0 – 15.6)	13.7 (11.2 – 23.8)	15.3 (12.7 – 21.3)*
DPP-IV (U/L)	45.1 (39.3 – 62.0)	50.4 (45.1 – 55.9)	53.3 (42.2 – 70.3)*
hs-CRP (mg/dL)	0.04 (0.01 – 0.27)	0.23 (0.07 – 0.81)**	0.52 (0.15 – 1.33)**
IL-6 (pg/mL)	3.2 (2.9 – 3.7)	3.5 (2.9 – 6.2)	4.9 (2.8 – 8.6)*
FRAP (mmol/L)	0.89 ± 0.20	0.98 ± 0.25	1.05 ± 0.22*
SH (nmol P-SH/mL)	143.6 ± 21.7	123.2 ± 25.1	105.4 ± 24.2**‡
TBARS (mmol/L)	5.1 (4.6 – 6.5)	6.0 (5.0 – 7.4)	6.6 (5.4 – 8.3)*
HOMA-IR index	1.8 (1.3 – 2.3)	2.2 (1.6 – 3.0)	3.1 (2.0 – 4.4)**‡
Insulin Sensitivity	0.35 (0.34 – 0.37)	0.34 (0.32 – 0.36)	0.32 (0.30 – 0.35)**‡

Data are expressed as means ± SD or median (interquartile ranges). Data were processed for analysis, where One-way ANOVA followed by Tukey's test, and Kruskal Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$  compared to Normal Weight Group

‡ $p < 0.0001$  compared to Overweight Group.



Em amostras de saliva e soro houve um aumento da atividade da ADA e DPP-IV em pacientes obesos quando comparados com pacientes de peso normal, sugerindo-se que houve uma redução dos níveis de Ado, que é um importante modulador da atividade da insulina e de células imunes (JOHNSTON-COX et al., 2012) e também uma correlação positiva entre os níveis de ADA salivar e os valores de IMC, peso e circunferência do quadril do grupo obeso. Uma correlação positiva entre ADA e DPP-IV salivares e um aumento plasmático de ADA e DPP-IV, possivelmente relacionados a vários fatores da obesidade tais como, inflamação, adiposidade abdominal, aumento de triglicerídeos e resistência insulínica (MANNUCCI et al., 2005). Desse modo, a atividade aumentada da DPP-IV e ADA no soro podem estar ligadas com a obesidade hiperinsulinêmica uma vez que os níveis de insulina, glicose, hemoglobina glicosilada e HOMA foram significativamente mais elevados nos indivíduos obesos.

Os grupos com sobrepeso e obesidade apresentaram maior frequência do alelo G (AG, GG) em relação aos pacientes com IMC normal, sugerindo uma associação entre o polimorfismo do gene GSTP1 e a quantidade de gordura corporal independente do gênero e da idade. O polimorfismo do gene GSTP1 contribuiria para a redução da produção das enzimas GSTs, que podem alterar outras funções metabólicas do organismo, visto que, dentre os sistemas de detoxificação, as enzimas GSTs possuem um importante papel na modificação de compostos eletrofílicos reativos (KANWAL et al., 2014). Esta situação pode acarretar uma diminuição de defesas antioxidantes alterando a homeostase dos adipócitos e hormonal.

Outro ponto importante a destacar foi que o grupo obeso apresentou níveis séricos maiores de RBP4, resistina, IL-6, PCR-us, ADA, DPP-IV, e níveis diminuídos de adiponectina quando comparados como grupo de peso normal. Com a obesidade os adipócitos entram em hipóxia relativa, iniciando um processo inflamatório, com infiltração de macrófagos e produção de citocinas que demonstram a estreita relação existente entre macrófagos e adipócitos (BULLÓ et al., 2003; LOLMEDE et al., 2003). Verificou-se uma correlação positiva entre o percentual de gordura corporal e PCR-us, enquanto que a IL-6 correlacionou-se positivamente com o IMC, glicose, insulina, HOMA e negativamente com a sensibilidade à insulina. Este fato pode contribuir para a RI, visto que, a concentração aumentada de IL-6 na obesidade está

associada a uma expressão reduzida de IRS-1 e GLUT4 nos tecidos muscular e hepático (JONES et al., 2001).

Em relação ao perfil lipídico foi possível constatar que jovens obesos apresentam valores de HDL inferiores e LDL, colesterol total e triglicerídeos superiores comparados ao grupo de peso normal. O aumento nos níveis de resistina e RBP4 podem influenciar na concentração de triglicerídeos, já que regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo hepático dos ácidos graxos, além de estimularem a degradação de receptores de LDL hepático (MELONE et al., 2012).

O aumento progressivo na lipoperoxidação ocorreu em conformidade com o aumento do peso corporal e com a diminuição progressiva de grupamentos SH demonstram um aumento do estresse oxidativo, que prejudica tanto a secreção de insulina como o transporte de glicose no músculo e tecido adiposo favorecendo a aterosclerose, hipertensão e doenças cardiometabólicas (MADUX, 2001). Ainda, a correlação positiva entre a lipoperoxidação e o aumento da atividade da ADA salivar e sérica no grupo obeso, sugere uma maior desaminação da Ado e consequente diminuição de sua capacidade antioxidante o que poderia contribuir para o agravamento da obesidade.

Particularmente, ressalta-se que estes resultados evidenciam o papel relevante das adipocinas e de vários biomarcadores inflamatórios, oxidativos e genéticos, que influenciam o perfil metabólico de indivíduos jovens obesos.

Destaca-se também a relevância dos resultados encontrados em amostras de saliva de pacientes obesos, que contribuem para seu emprego como uma importante amostra biológica para detecção de alterações sistêmicas.

Assim, este estudo poderá agregar novos conhecimentos referente às interações possíveis de mediadores inflamatórios, oxidativos e genéticos com a obesidade, contribuindo na prevenção desta síndrome na população jovem.



Através do desenho experimental usado neste trabalho podemos concluir que:

- A saliva é uma amostra biológica interessante para a avaliação do estado inflamatório na obesidade;
- As atividades da ADA e DPP-IV estão aumentadas na saliva e soro de pacientes obesos refletindo alterações no metabolismo dos carboidratos e inflamação.
- A atividade da ADA está correlacionada à parâmetros antropométricos aumentados e a lipoperoxidação sérica, decorrente do aumento da degradação da adenosina e consequente diminuição de sua atividade antioxidante.
- Indivíduos jovens obesos embora sem sinais clínicos, apresem dosagens que evidenciam metabolismo insulínico alterado.
- A associação positiva entre o polimorfismo de gene GSTP1 (Ile<sup>105</sup>Val) com a obesidade foi independente do sexo e idade e apresenta uma correlação com as variáveis antropométricas e fraca correlação com parâmetros cardiometabólicos.
- Indivíduos que apresentam pelo menos um alelo G (AG ou GG) são 2.4 vezes mais predispostos a desenvolver obesidade.
- O polimorfismo do gene GSTP1 interfere na produção e atuação de GST, contribuindo para um desequilíbrio oxidativo, importante mecanismo patogênico relacionado ao desenvolvimento e manutenção da obesidade.
- A obesidade e o excesso de peso podem favorecer o aumento significativo de RBP4, Resistina, marcadores inflamatórios (ADA, DPP-IV, PCR-us, IL-6) e a lipoperoxidação, e reduzir significativamente a adiponectina e defesas antioxidantes como grupamentos SH em adultos jovens.
- O aumento de resistina, RBP4, ADA, DPP-IV, IL-6, PCR-us e a redução da adiponectina podem induzir à inflamação e resistência insulínica, dislipidemia e aterosclerose.
- Adipocinas, atividade da ADA e da DPP-IV poderiam auxiliar na identificação de distúrbios relacionados ao estado de obesidade em jovens adultos.





ACADEMIA AMERICANA DE PEDIATRIA. Diabetes de tipo 2 em crianças e adolescentes. **Pediatrics** (edição brasileira), v. 4, n. 6, p. 357-68, 2000.

AFSHARI, A. T.; SHIRPOOR, A.; FARSHID, A.; SAADATIAN, R.; RASMI, Y.; SABOORY, E.; ILKHANIZADEH, B.; ALLAMEH, A. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats. **Food Chemistry**, v. 101, p. 148–153, 2007.

ALI-OSMAN F., AKANDE O., ANTOUN G., MAO J., BUOLAMWINI. Molecular Cloning, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of Full-length CDNAs of Three Human Glutathione S-transferase Pi Gene Variants. **The Journal of Biological Chemistry**. 272(15):10004-10012, 1997.

ANDRADE, V.S.S. Polimorfismos Genéticos, Susceptibilidade e Resposta ao Tratamento em Crianças Portadoras de Leucemia Linfoblástica Aguda. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, SP. 2006.

ANTUNA-PUENTE B, FEVE B, FELLAHI S, BASTARD JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metab.**;34(1):2-11, 2008.

ATKINSON JC, BAUM BJ. Salivary enhancement: current status and future therapies. **J Dent Educ**;65(10):1096–101, 2010.

AUFDENBLATTEN M, BAUMANN M, RAIIO L, DICK B, FREY BM, SCHNEIDER H, et al. Prematurity is related to high placental cortisol in preeclampsia. **Pediatr. Res**;65(2):198–202, 2009.

AZEVEDO LR, DAMANTE JH, LARA VS, LAURIS JRP. Age-related changes in human sublingual glands: a post mortem study. **Arch. Oral Biol**;50(6):565–74, 2005.

AZUMA K, KATSHKAWA F, OGUCHI S, MITSURU, M, YAMAZAKI H, SHIMADA A, et al. Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. **Obes Res**;11(8):997-1001, 2003.

BALWANT, R.; JASDEEP, K.; REINHILDE, J.; SURESH, C. A. Adenosine deaminase in saliva as a diagnostic marker of squamous cell carcinoma of tongue. **Clinical Oral Investigations**. Volume 15, Issue 3, pp 347-349, 2011.

BARRY K. B. B; BERNARD J. M. Oral Anatomy, Histology and Embryology. 4th ed. **Mosby**; 2009.

BASTARD, J. P.; JARDEL, C.; BRUCKERT E.; BLONDY, P.; CAPEAU, J.; LAVILLE, M.; et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, 85(9): 3338-42, 2000.

BAUMANN, C.A. et al. CAP defines a second signaling pathway required for insulin stimulated glucose transport. **Nature**, v.407, p.202-7, 2000.

BARDOW A, MOE D, NYVAD B, NAUNTOFTE B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. **Arch. Oral Biol**;45(1):1–12, 2000.

BELLÉ, L. et al. Association between HbA<sub>1c</sub> and dipeptidyl peptidase IV activity in type 2 diabetes mellitus. Letter to the Editor. **Clinica Chimica Acta**. 413, 1020–1021; 2012.

BJÖMTORP, P. Metabolic implications of body fat distribution. **Diabetes Care**, v. 14,n. 12, p. 1132- 1143, 1991.

BLACK S, KUSHNER I, E SAMOLS D. C-Reactive Protein. **J Biol Chem**, 279(47) 48487-90, 2004.

BLUHER M, WILLIAMS CJ, KLOTING N, HSI A, RUSCHKE K, OBERBACH A, et al. Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. **Diabetes Care**. Dec;30(12):3110-5, 2007.

BOREHAM, C.; RIDDOCH, C. The physical activity, fitness and health of children. **Journal of Sports Sciences**, v. 19, p. 915-929, 2001.

BOTTINI, N., F. GLORIA-BOTTINI, P. BORGIANI, E. ANTONACCI, P. LUCARELLI, E. BOTTINI. Type 2 diabetes and the genetics of signal transduction: a study of interaction between adenosine deaminase and acid phosphatase locus 1 polymorphisms. **Metabolism**, 53 pp. 995–1001, 2004.

BRADY, L. M.; LINDQUIST, C. H.; HERD, S. L.; GORAN, M. I. Comparison of children's dietary intake patterns with US dietary guidelines. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 361-367, 2000.

BROCH M, RAMÍREZ R, AUGUET MT, et al. Macrophages are novel sites of expression and regulation of retinol binding protein-4 (RBP4). **Physiol Res** 59(2): 299-303, 2010.

BOTA, A. et al. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR 647). **Clinical Chimica. Acta**, v. 306, p. 79–89, 2001.

BURKIEWICZ, MS;KATARZYNA K; MARZENA G; ANDRZEJ S; TADEUSZ P. Diabetes-induced decrease of adenosine kinase expression impairs the proliferation potential of diabetic rat T lymphocytes. **Immunology**. Jul; 118(3): 402–412, 2006.

BUSE, M. G. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol.* **Endocrinol. Metab.**, v. 290, n. 1, p. E1-E8, 2006.

BULLÓ, M.; GARCIA-LORDA, P.; MEGIAS, I.; SALAS-SALVADÓ, J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obesity Research**, 11 (4): 525-31, 2003.

CANCELLO R, CLÉMENT K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**.113:1141-1147, 2006.

CAMPO J, PEREA MA, DEL ROMERO J, CANO J, HERNANDO V, BASCONES A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. **Oral Dis**;12(3):219–28, 2006.

CARVALHO MH, COLACO AL, FORTES ZB. Citocinas, disfuncao endotelial e resistencia a insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**;50(2):304-312, 2006.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHIAPPIN, S. *et al.* Saliva specimen: a new laboratory tool diagnostic and basic investigation. **Clin Chim Acta**, v. 383, p. 30-40, 2007.

CHICHARRO JL, LUCÍA A, PÉREZ M, VAQUERO AF, UREÑA R. Saliva composition and exercise. **Sports Med**.26(1):17–27. 1998.

CHIELLE EO, BONFANTI G, DE BONA KS, MORESCO RN, MORETTO MB. Adenosine deaminase, dipeptidyl peptidase-IV activities and lipid peroxidation are increased in the saliva of obese young adult. **Clin Chem Lab Med**. Jun;53(7):1041-7, 2015.

COSTA, J.V.; DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Médica Portuguesa**, v.19, p.251-256, 2006.

COTTAM, D.R. *et al.* The Dysfunctional immune-privilege in morbid obesity: implications and effect of gastric bypass surgery. **Obesity Surgery**. V. 13, n. 1, p. 49-57, fevereiro, 2003.

COTTON, S.C.; SHARP, L.; LITTLE, J; BROCKTON, N. Glutathione S transferase polymorphisms and colorectal cancer. **Am J Epidemiol**; 151: 7–32; 2000.

DADDONA, P. E., Human adenosine deaminase. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 12496-501, 1981.

DANIELSON, U. H.; MANNERVIK, B.; Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem. J.**, 231, 263, 1985.

DAWES C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. **J. Physiol.** (Lond.);220(3):529–45., 1972.

DE ALMEIDA PDV, GRÉGIO AMT, MACHADO MAN, DE LIMA AAS, AZEVEDO LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. **J Contemp Dent Pract**.;9(3):72–80, 2008.

DE BONA, K. S., BONFANTI, G., CARGNELUTTI, L.O., BITENCOURT, P.E.R., SILVA, P.S., CEOLIN, R., PIMENTEL, V.C., MORETTO, M.B. Lymphocytic enzymes and lipid peroxidation in patients with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, 45 1081–1085, 2014.

DE BONA KS, BONFANTI G, CARGNELUTTI LO, BITENCOURT PE, DA SILVA PS, CEOLIN R, PIMENTEL VC, MORETTO MB.. Lymphocytic enzymes and lipid peroxidation in patients with metabolic syndrome. **Clin Biochem**. Sep;45(13-14), 2012.

DEGAWA-YAMAUCHI M, BOVENKERK JE, JULIAR BE, WATSON W, KERR K, JONES R, et al. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans, **J Clin Endocrinol Metab**. 88(11):5452–5455, 2003.

DECSI, T.; MOLNAR, D.; KOLETZKO, B. Reduced plasma concentrations of alpha tocopherol and beta-carotene in obese boys. **Jornal de Pediatria**, v.130, n.4, p.653-655, 1997.

DE SOUZA, A. Z. Z.; ZAMBOM, A. Z.; ABBOUD, K. Y.; REIS, S. K.; TANNINHÃO, F.; GUADAGNINI, D.; SAAD, M. J.A.; PRADA, P. O. Oral supplementation with L-glutamine alters gut microbiota of obese and overweight adults: A pilot study. **Nutrition**, v. 31, p. 884-889, 2015.

EDGAR M, DAWES C, O'MULLANE D. **Saliva and Oral Health**. 3rd ed. British Dental Journal; 2004.

ECKEL, R.H. et al. The metabolic syndrome. **The Lancet**, v.365, p.1415-28, 2005.

ENBERG N, ALHO H, LOIMARANTA V, LENANDER-LUMIKARI M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 92(3):292–8, 2001.

FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**;115(5):911-919, 2005.

FAN, M.; QIN, W.; MUSTAFA, S. J., Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, p. 1012- 1019, 2003.

FAROOQI, I.S. O'RAHILLY, S. Monogenic human obesity syndromes. **Recent Prog. Horm. Res**. 59:409-424, 2004.

FONSECA-ALANIS MH, TAKADA J, ALONSO-VALE MIC, LIMA FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras Endocrinol Metabol**;50(2):216-29, 2006.

FRANCO, R. et al., Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunol Rev**, v. 161, p. 27-42, 1998.

FRANKO A., DOLZAN A., ARNERIC N., DODIC M .The Influence of Genetic

Polymorphisms of GSTP1 on the Development of Asbestosis. **Joem.**; 50(1), 2008.

FROTA, KMG; FREIRE, JAP; MOREIRA-ARAÚJO RSR; RIBEIRO, VQ; ARÊAS, JAG. Relationship between C-reactive protein and other cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic individuals. **Nutrire**. Apr;40(1):54-62, 2015.

FUJIMURA, S. Acantose nigricans em crianças obesas: estudo clínico emetabólico. Curitiba, 61 f. **Dissertação (Mestrado em Pediatria)**. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2002.

FUNAHASHI T, NAKAMURA T, SHIMOMURA I, MAEDA K, KURIYAMA H, TAKAHASHI M, et al. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. **Intern Med**. Feb;38(2):202-6, 1999.

GOLDEN SH, BROWN A, CAULEY JA, CHIN MH, GARY-WEBB TL, KIM C, SOSA JA, SUMNER AE, ANTON B. Health disparities in endocrine disorders: biological, clinical, and nonclinical factors an Endocrine Society scientific statement. **J Clin Endocrinol Metab**. Sep;97(9):E1579-639, 2012.

GOLDIN BAA, BECKMAN JA, SCHIMIDT AM, CREAGER MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**.;114:597-605, 2006.

GUIMARÃES DED, SARDINHA FLC, MIZURINI DM, TAVARES DO CARMO MG. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev Nutr**. 20(5):549-59, 2007.

GREABU M, BATTINO M, MOHORA M, TOTAN A, DIDILESCU A, SPINU T, et al. Saliva a diagnostic window to the body, both in health and in disease. **J Med Life**; 2(2):124–32, 2009.

GRIGORIEV IV, NIKOLAEVA LV, ARTAMONOV ID. Protein content of human saliva in various psycho-emotional states. **Biochemistry Mosc**;68(4):405–6, 2003.

GHARIBEH MY, AL TAWALLBEH GM, ABOUD MM et al. Correlation of plasma resistin with obesity and insulin resistance in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab** 36(6): 443-9, 2010.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. Oxidative Stress; adaption, damage, repair and death. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd edition, pp. 284–330, **Oxford**: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL B, CLEMENT MV, LONG LH. Hydrogen peroxide in the human body. Review. **FEBS Lett**. Dec 1;486(1):10-3. **2000**.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R.; Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 45, 51, 2005.

HARRIES L.W., STUBBINS M.J., FORMAN D., HOWARD G. C., WOLF C. R. Identification of Genetic Polymorphisms at the Glutathione S-transferase Pi Locus and Association with Susceptibility to Bladder, Testicular and Prostate Cancer. **Carcinogenesis**. 18(4):641-644, 1997.

HERMSDORFF HHM, JOSEFINA MONTEIRO JBR. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arq Bras Endocrinol Metab**;48(6):803-811, 2004.

HEERMSDORFF HHM, VIEIRA MAQM, MONTEIRO JBR. Leptina e sua influência na patofisiologia de distúrbios alimentares. **Rev Nutr**;19(3):369-379. 2006.

HEIJN, M.; OUDE EFFERINK, R. P. J.; JANSEN, P. M. L.; ATP-dependent multispecific organic anion transport system in rat erythrocyte membrane vesicles. **Am. J. Physiol.** 262, C104, 1992.

HOEHN, K. L.; SALMAON, A. B.; HOHNEN-BEHRENS, C.; TURNER, N. HOY, A. J.; MAGHZAL, G. J.; STOCKER, R.; VAN REMMEN, H. KRAEGEN, E. W.; COONEY, G. J. RICHARDSON, A. R. JAMES, D. E. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 106, n. 42, p. 17787-92, 2009.

HU S, ARELLANO M, BOONTHEUNG P, WANG J, ZHOU H, JIANG J, et al. Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery. **Clinical Cancer Research**;14(19):6246–52, 2008.

HUI YANG, AHMED SALAH SALEM MOHAMED, SHENG-HUA ZHOU. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. **Lipids Health Dis.** 11: 85, 2012.

HURST, R.; BAO, Y.; JEMTH, P.; MANNERVIK, B.; WILLIAMSON, G.; Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases. **Biochem. J.**, 332, 97. 1998.

HUQ NL, CROSS KJ, UNG M, MYROFORIDIS H, VEITH PD, CHEN D, et al. A Review of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics. **Int J Pept Res Ther.**13(4):547–64, 2007.

HUMPHREY SP, WILLIAMSON RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**;85(2):162–9, 2001.

IBGE. Diagnóstico da Obesidade Infantil. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2009.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** – Disponível em: <[http://portal.web.01.saude.gov.br/alimentacao/redenuutri/dezembro/21-12\\_11.pdf](http://portal.web.01.saude.gov.br/alimentacao/redenuutri/dezembro/21-12_11.pdf)> Acesso em: 03 nov 2014.

ITANI S.I. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I- $\beta$ . **Diabetes**, v.51, 2005.

IQBAL N, SESHADRI P, STERN L, LOH J, KUNDU S, JAFAR T, et al. Serum resistin is not associated with obesity or insulin resistance in humans. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**;9(3):161-165, 2005.

JANKE J, ENGELI S, GORZELNIAK K, LUFT CF, SHARMA AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. **Obes Res**;10(1):1-5, 2002.

JONES, S.A., HORIUCHI, S., TOPLEY, N., YAMAMOTO, N. & FULLER, G.M. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. **FASEB Journal**. Vol. 15 pp. 43–58, 2001.

JOHNSTON-COX H, KOUPENOVA M, YANG D, CORKEY B, GOKCE N, FARB MG, LEBRASSEUR N, RAVID K. The A2b adenosine receptor modulates glucose homeostasis and obesity. **PLoS One**.7(7):e40584; 2012.

JOURENKOVA-MIRONOVA N., VOHO A., BOUCHARDY C., WIKMAN H., DAYERP, BENHAMOU S., et al. Glutathione S-Transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 Genotypes and the Risk of Smoking-Related Oral and Pharyngeal Cancers. **Int. J. Cancer**.81:44–48, 1999.

KAMEI N. *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein–1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J BiolChem**, v.281, p.26602-14, 2006.

KADOWAKI T, YAMAUCHI T, KUBOTA N, HARA K, UEKI K, TOBE K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**. Jul;116(7):1784-92, 2006.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M.; Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**. v. 444, n. 7121, p. 840-6, 2006.

KAUFMAN E, LAMSTER IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*;13(2):197–212, 2002.

KARALIS, K. P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E. KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS J**. v. 276, n. 20, p. 5747-47, 2009.

KANWAL R, PANDEY M, BHASKARAN N, MACLENNAN GT, FU P, PONSKY LE, GUPTA S. Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1. **Mol Carcinog**. Jan;53(1):8-18; 2014.

KELLEY, D. E.; THAETE, F. L.; TROOST, F.; HUWE, T.; GOODPASTER, B. H. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 278, p. E941-E948, 2000.

KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **J Clin Endocrinol Metab**.;89(6):2548-56. 2004.

KISAKOL, G. et al. Effect of surgical weight loss on free radical and antioxidant balance: a preliminary report. **Obesity Surgery**, v.12, n.6, p.795-800, 2002.

KONDO H, SHIMOMURA I, MATSUKAWA Y, KUMADA M, TAKAHASHI M, MATSUDA M, et al. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. **Diabetes**. Jul;51(7):2325-8. 2002.

KOS K, WONG SP, HUDA MS, CAKIR M, JERNAS M, CARLSSON L, et al. In humans the adiponectin receptor R2 is expressed predominantly in adipose tissue and linked to the adipose tissue expression of MMIF-1. **Diabetes Obes Metab**. Apr;12(4):360-3. 2010.

KUNNARI A, UKKOLA O, PAIVANSALO M, KESANIEMI A. High plasma resistin level is associated with enhanced highly sensitive c-reactive protein and leukocytes. **J Clin Endocrinol Metab**;91(7):2755-2760, 2006.

KVITKO K., GASPAR P. A., TORRES M.R., WEIMER T.A., HUTZ M. H. CYP1A1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 Polymorphisms in an Afro-Brazilian Group. **Genetics Molecular Biology**. 29(4), 2006.

LAKKA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortal in middle-aged men. **JAMA**, v.288, n.21, p.2709-16, 2002.

LAMERS D.; FAMULLA, S.; WRONKOWITZ, N.; HARTWIG, S.; LEHR, D. MARGRIET, O.; KRISTIN, C.; JEAN M. K.; MIKAEL R.; STEFAN M.; FRANZ-GEORG H.; JOHANNES R.; PETER A.; HENRIKE S.; JUERGEN E. Dipeptidyl peptidase – 4 is a novel adipokine potentially Linking Obesity to the metabolic syndrome. **Diabetes**. Jul; 60(7): 1917–1925, 2011.

LARSSON, B.; SVÄRDSUDD, K.; WELIN, L.; WILHELMSEN, L.; BJÖRNTORP, P.; TIBBLIN, G. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. **British Medical Journal**, v. 288, p. 1401-1404, 1984.

LATINI, S.; PEDATA, F., Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **J Neurochem**, v. 79, p. 463-484, 2001.

LEE JM, GARON E, WONG DT. Salivary diagnostics. **Orthod Craniofac Res**. 12(3):206–11, 2009.

LEITE, L. D.; ROCHA, E. D. M.; NETO, J. B. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2009.

LEY R.E; BACKHED F.; TURNBAUGH P.; LOZUPONE C.A; KNIGHT R.D; GORDON J.I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci USA**. , v. 102, n. 31, 2005.

LEY R.E; TURNBAUGH P.J; KLEIN S.; GORDON J.I. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**.v. 44, p. 21-28, 2006.



- LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N., Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J. Ethnopharmacol.**, v. 92, p. 1-21, 2004.
- LI S, SHIN HJ, DING EL, VAN DAM RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**. Jul 8;302(2):179-88. 2009.
- LIMA, S. C. V. C.; ARRAIS, R. F.; ALMEIDA, M. G.; SOUZA, Z. M.; PEDROSA, L. F.C. Perfil lipídico e peroxidação de lipídeos no plasma em crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 1, p. 23-28, 2004.
- LISSAU, I.; OVERPECK, M. D.; RUAN, W. J.; DUE, P.; HOLSTEIN, B. E.; HEDIGER, M. L. Body mass index and overweight in adolescents in 13 European Countries, Israel, and The United States. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 158, p. 27-33, 2004.
- LOLMEDE K, DURAND DE SAINT FRONT V, GALITZKY J, LAFONTAN M, BOULOUMIÉ A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **Int J Obes Relat Metab Disord.**;27:1187-1195, 2003.
- LUPIDI, G. et al., Adenosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*: interaction with ground and transition state analogs. **Biochim Biophys Acta**, v. 1122, p. 311-316, 1992.
- MAAHS DM, OGDEN LG, KINNEY GL, WADWA P, SNELL-BERGEON JK, DABELEA D, et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. **Circulation**. Feb 15;111(6):747-53, 2005.
- MADDUX, B.A. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of  $\alpha$ -lipoic acid. **Diabetes**. 50, 404-410, 2001.
- MAIER H, BORN IA, MALL G. Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. **Klin. Wochenschr.** 66 Suppl 11:140-50, 1998.
- MAHMOUD, A.; AMER, MAIVEL H.; GHATTAS, DINA M.; ABO-ELMATTY, SOAD, H. ABOU-EL-ELA. Evaluation of glutathione S-transferase P1 genetic variants affecting type-2 diabetes susceptibility and glycemic control. **Clinical Research**. 8, 4: 631-636, 2012.
- MALAMUD D, RODRIGUEZ-CHAVEZ IR. Saliva as a diagnostic fluid. **Dent Clin North Am**;55:159-78, 2011.
- MANNUCCI E, PALA L, CIANI S, BARDINI G, PEZZATINI A, SPOSATO I, CREMASCO F, OGNIBENE A, ROTELLA CM. yperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. **Diabetologia**. Jun;48(6):1168-72, 2005.

MARNETT, L. J.; RIGGINS, J. N.; WEST, J. D.; Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **J. Clin. Invest.**, 111, 583, 2003.

MATHER KJ, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, EDELSTEIN S, BRAY GA, KAHN SE, et al. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. **Diabetes**. Apr;57(4):980-6, 2008.

MATSUBARA, M.; NAMIOKA, K.; KATAYOSE, S.; Decreased plasma adiponectin concentrations in women with low grade C-reactive protein elevation. **Eur J Endocrinol**, 148: 657-62, 2003.

MATOS, M. A. Efeitos de uma sessão de exercício físico aeróbico em componentes celulares e moleculares relacionados à resistência a insulina em indivíduos obesos [dissertação]. Diamantina – Minas Gerais: **Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**; 2012.

MELO, M. E. Doenças Desencadeadas ou Agravadas pela Obesidade. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO**. Disponível em: [http://www.abeso.org.br/pdf/Artigo%20-20Obesidade%20e%20Doencas%20associadas%20maio%](http://www.abeso.org.br/pdf/Artigo%20-20Obesidade%20e%20Doencas%20associadas%20maio%20). 2011.

MELONE M, WILSIE L, PALYHA O, STRACK A, RASHID S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. **J Am Coll Cardiol**. May 8;59(19):1697-705, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados referentes ao excesso de peso no Brasil. 2014

MINER, J.L. The adipocyte as an endocrine cell. **Journal of Animal Science**, v.82, n.3, p.935-941, 2004.

MOHN, A. et al. Increased oxidative stress in prepubertal severely obese children: effect of a dietary restriction-weight loss program. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, n.5, p.2653-2658, 2005.

MOHAMED-ALI, V.; FLOWER, L.; SETHI, J.; HOTAMISLIGIL, G. S.; GRAY, R.; HUMPHRIES, S. E. et al. Beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. **J Clin Endocrinol Metab**, 86: 5864-69, 2001.

MOON B, KWAN JJ, DUDDY N, SWEENEY G, BEGUM N Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 285: E106–E115, 2003.

MOREIRA CR, AZEVEDO LR, LAURIS JRP, TAGA R, DAMANTE JH. Quantitative age-related differences in human sublingual gland. **Arch. Oral Biol**;51(11):960–6, 2006.

MORISSON, P; NEVES, DD. Avaliação da adenosina desaminase no diagnóstico da tuberculose pleural: uma metanálise brasileira. **J. bras. pneumol.** vol.34 no.4 São Paulo Apr. 2008.

MOSCA P. R. F.; SILVEIRA P. P.; WERLANG I. C. R.; GOLDANI M. Z. Obesidade e genética. **Revista HCPA.** 32(3):318-331; 2012.

NANCI A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. 7th ed. **Mosby**; 2007.

NAGLER RM. Salivary glands and the aging process: mechanistic aspects, healthstatus and medicinal-efficacy monitoring. **Biogerontology**;5(4):223–33. 2004.

NELSON, DLI COX, MN. Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas. In: Lehninger: princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo: **Worth Publishers**, p. 639-681, 2002.

OHMORI R, MOMIYAMA Y, KATO R, TANIGUCHI H, OGURA M, AYAORI M, et al. Associations between serum resistin levels and insulin resistance. **J Am Coll Cardiol**; 46(2):379-380, 2005.

OLIVEIRA, D. M. Influência da Ingestão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo da glicose em ratos Wistar. USP; São Paulo. **Dissertação em Saúde Pública**; 2008

OLUSI, S.O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **International Journal of Obesity and related Metabolic Disorders**, v.26, n.9, p.1159-1164; 2002.

ORT T., A.A. ARJONA, J.R. MACDOUGALL, P.J. NELSON, M.E. ROTHENBERG, F. WU, A. EISEN, Y.D. HALVORSEN. Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice. **Endocrinology**. 146, p. 2200–2209, 2005.

OSAWA H, DOI Y, MAKINO H, NINOMIYA T, et al. Diabetes and hypertension markedly increased the risk of ischemic stroke associated with high serum resistin concentration in a general Japanese population: the Hisayama Study. **Cardiovasc Diabetol** 18: 60, 2009.

OST A, DANIELSSON A, LIDÉN M, et al. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. **FASEB J** 21(13): 3696-704, 2007.

PACHECO R, C. LLUIS, R. FRANCO. Role of CD26-adenosine deaminase interaction in Tcell-mediated immunity. Vol. 24 / Núm 2/ Abril-Junio: 235-245, 2005.

PANG S, LE Y. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. **Cell Mol Immunol**;3(1):29-34. 2006.

PARL F. F. Glutathione S-Transferase Genotypes and Cancer Risk. **Cancer Letters**. 221:123-129, 2005.

PESSIN J.E; SALTIEL A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, p.165-169, 2000.

PERCIVAL RS, CHALLACOMBE SJ, MARSH PD. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. **J. Dent. Res**;73(8):1416–20, 1994.

PIRES, A; MARTINS, P; PEREIRA, AM; MARINHO, J; VAZ SILVA, P; MARQUES, M; CASTELA, E; SENA, C; SEIÇA, R. Fatores pró-inflamatórios na obesidade infantil: correlação entre a leptina, adiponectina e proteína C-reativa num grupo de crianças portuguesas obesas. **Rev Port Cardiol.**;33:691-714.

PIYAMAS, A.; NISON, S.; NAWARAT, W.; WARANUCH, P.; WARAPORN, S.; SAEN GSO P.; SUWIMOL, T. Alanine Aminopeptidase and Dipeptidyl Peptidase IV in Saliva of Chronic Periodontitis Patients. **Journal of Periodontology**. Vol. 80, N. 11, Pages 1809-1814; 2009.

PRAVENEK M, KAZDOVA L, CAHOVA M, LANDA V, ZIDEK V, et al. Fat-specific transgenic expression of resistin in the spontaneously hypertensive rat impairs fatty acid re-esterification. **Int J Obes (Lond)** 30: 1157–1159, 2006.

PRABHU, K. S.; REDDY, P. V.; JONES, E. C.; LIKEN, A. D.; REDDY, C. C.; Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch.Biochem. Biophys.*, 424, 72, 2004.

PRADHAN, A. D.; MANSON, J. E.; RIFAI, N.; BURING, J. E.; RIDKER, P. M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 Diabetes Mellitus. **JAMA**, 286(3): 327-34, 2001.

RABE K, LEHRKE M, PARHOFER KG, BROEDL UC. Adipokines and insulin resistance. **Mol Med**. Nov-Dec;14(11-12):741-51, 2008.

RANKINEN, T. ZUBERI, A. CHAGNON, Y.C. WEISNAGEL, S.J. ET AL. The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity**. 14(4); 529-644. Review. 2006.

REILLY MP, IQBAL N, SCHUTTA M, WOLFE ML, SCALLY M, LOCALIO AR, et al. Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**;89(8):3872–3878, 2004.

ROBERTSON, R.P.; HARMON, J.; TRAN PO, TANAKA, Y.; TAKAHASHI, H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**. 52: 581-7, 2003.

ROMERO, C.E.M; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grealina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**. Campinas: n.19(1), p. 85-91, jan/fev. 2006.

ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L. The physiology of body weight regulation: relevance to the etiology of obesity in children. **Pediatrics**, v.101, p. 525-539, 2008.

ROSSINI A., RAPOZO C.M., AMORIM L.M.F., MACEDO J. M. B., MEDINA R., NETO J. F. N., et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**. 1 (3):233-240, 2002.

ROTTER,V. NAGAEV,I. SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **J. Biol. Chem.** V, 278, n. 46, p. 45777-84, 2003.

RUTKIEWICZ, J., GORSKI, J., On the role of insulin regulation of adenosine deaminase activity in rats tissues. **FEBS Lett.** v. 271, p. 79-80, 1990.

SARACOGLU, U.; GUVEN, O.; DURAK, I. Adenosine deaminase and 5'-nucleotidase activities in saliva from patients with oral and laryngeal cancer. **Oral Diseases**. 11, 323–325; 2005.

SATO, A. et al., Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, p. 1633-1640, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Hipertensão, São Paulo, v.7, n.4. 2004.

SELL H. et al. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. **Diabetes**,v.58, p.2731–40, 2009.

SINHA, R.; FISCH, G.; TEAGUE, B.; TAMBORLANE, W. V.; BANYAS, B.; ALLEN,K.; SAVOYE, M.; RIEGER, V.; TAKSALI, S.; BARBETTA, G.; SHERWIN, R. S.; CAPRIO, S. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n.11, p. 802-810, 2002.

SHENG CH, DI J, JIN Y, ZHANG YC, WU M, et al. Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin-resistance. **Endocrine** 33: 135–143. 2008.

SHIM CY, PARK S, KIM JS, et al. Association of plasma retinol-binding protein 4, adiponectin, and high molecular weight adiponectin with insulin resistance in non-diabetic hypertensive patients. **Yonsei Med J** 51(3): 375-84, 2010.

SCHMIDT MORTEN , SIGRUN A JOHANNESDOTTIR, STANLEY LEMESHOW, TIMOTHY L LASH, SINNA P ULRICHSEN, HANS ERIK BOTKER, HENRIK TOFT SORENSEN. Obesity in young men, and individual and combined risks of type 2 diabetes, cardiovascular morbidity and death before 55 years of age: a Danish 33-year follow-up study. **BMJ Open**, v3, 2013

SLYPER, A. H. The pediatric obesity epidemic: causes and controversies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2540-2547, 2004.

SOROF, J. M.; LAI, D.; TURNER, J.; POFFENBARGER, T.; PORTMAN, R. J. Overweight, ethnicity and the prevalence of hypertension in school-aged children. **Pediatrics**, v. 113, n. 3, p. 475-482, 2004.

STACK KM, PAPAS AS. Xerostomia: Etiology and Clinical Management. **Nutrition in Clinical Care**. 4(1):15-21. 2001.

STANILOVA S., MITEVA L. PRAKOVA G. Il-12pro and GSTP1 polymorphisms in Association with Silicosis. **Tissue Antigens**.; 71:169-174, 2007.

STEEMBURGO, T.; AZEVEDO, M. J.; MARTINEZ, J. A. Interação entre gene e nutriente e sua associação à obesidade e ao diabetes melito. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, vol.53, n.5, pp. 497-508, 2009.

STEPPAN CM, BROWN EJ, WRIGHT CM, BHAT S, BANERJE et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 502-506. 2001.

TAN, K. C.B.; WAT, N. M. S.; TAM, S. C. F.; JANUS, E. D.; LAM, T. H.; LAM, K. S. L. C-reactive protein predicts the deterioration of glycemia in chinese subjects with impaired glucose tolerance. **Diabetes Care**, 26(8): 2323-28, 2003.

TANIGUCHI, C.M; EMANUELLI, B.; C. RONALD KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews**, v.7, 2006.

TAUBES G: Insulin resistance. Prosperity's plague. **Science**, v.325, n.5938, p.256-60, 2009.

TILG H, MOSCHEN AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and Immunity. **Nature Publishing Group**.;6:772-83, 2006.

TITARENKO, O. T. et al., Adenosine deaminase in the complex diagnosis of different forms of extrapulmonary tuberculosis. **Probl Tuberk Bolezn Legk**. Review. v. 11, p.14-18, 2006.

TORRESAN C. Estudo dos Polimorfismos dos Genes GSTM1, GSTT1 e CYP1A1 em Cânceres Mamários Esporádicos. **Dissertação** (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, PR. 2006.

TRAYHURN P, WOOD IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**.92(3):347-55, 2004.

TRUJILLO, M. E.; SULLIVAN, S.; HARTEN, I.; SCHNEIDER, S. H.; GREENBERG, A. S.; FRIED, S. K. interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, 89(11): 5577-82, 2004.

TSCHONER A, STURM W, ENGL J, et al. Retinol-binding protein 4, visceral fat, and the metabolic syndrome: effects of weight loss. **Obesity** (Silver Spring) 16(11): 2439-44, 2008.

TSUKUMO M.D.; CARVALHO M.B.; CARVALHO-FILHO M.A.; SAAD M.J.A. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2009.

ULGEN F, HERDER C, KÜHN MC, WILLENBERG HS, et al. Association of serum levels of retinol-binding protein 4 with male sex but not with insulin resistance in obese patients. **Arch Physiol Biochem** 116(2): 57-62, 2010.

UNGER, R.H; ORCI L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.24, pS28–32, 2000.

UZUN, H. et al. Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. **Obesity Surgery**. V. 14, n. 5, p. 659-665, maio, 2004.

VENUGOPAL, S. K.; DEVARAJ, S.; YUHANNA, I.; SHAUL, P.; JIALAL, I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. **Circulation**, 106: 1439-41, 2002.

VIDAL, J.; GOMIS, R. Interrelaciones entre obesidad y aterotrombosis. **Rev Esp Cardiol Supl.**;8(C):3-11 - Vol. 8, 2008.

VIGUERIE NATHALIE, EMILIE MONTASTIER, JEAN-JOSÉ MAORET, BALBINE ROUSSEL, MARION COMBES, CARINE VALLE et al. Determinants of Human Adipose Tissue Gene Expression: Impact of Diet, Sex, Metabolic Status, and *Cis* Genetic Regulation. **PLoS Genet**. September; 8(9), 2012.

VENDRELL J, MAYMÓ-MASIP E, TINAHONES F, GARCÍA-ESPAÑA A, MEGIA A, CAUBET E, GARCÍA-FUENTES E, CHACÓN MR. Tumor Necrosis-Like Weak Inducer of Apoptosis as a Proinflammatory Cytokine in Human Adipocyte Cells: Up-Regulation in Severe Obesity Is Mediated by Inflammation But Not Hypoxia. **J Clin Endocrinol Metab**. 2010;

VINCENT, H.K.; TAYLOR, A.G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International Journal of Obesity**, v.30, n.3, p.400-418, 2006.

VIRKAMÄKI, A.; KORSHENINNIKOVA, E.; SEPPÄLÄ-LINDROOS, A.; VEHKAVAARA, S.; GOTO, T.; HALAVAARA, J.; HÄKKINEN, A. M.; YKI-JÄRVINEN, H. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 50, p. 2337-2343, 2001.

VIROONUDOMPHOL, D. et al. The relationships between anthropometric measurements, serum vitamin A and E concentrations and lipid profiles in overweight and obese subjects. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v,12, n.1, p.73–79, 2003.

VOZAROVA, B.; WEYER, C.; HANSON, K.; TATARANNI, P. A.; BOGARDUS, C.; PRATLEY, R. E. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action and insulin secretion. **Obesity Research**, 9(7): 414-17, 2001.

XU, B.; BERKICH, D. A.; CRIST, G. H.; LANOUE, K. F. A1 adenosine receptor antagonism improves glucose tolerance in Zucker rats. **Am J Physiol**. 274, E271-E279. 2003.

ZWAKA, T. P.; HOMBACH, V.; TORZEWSKI, J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages implications for atherosclerosis. **Circulation**, 103: 1194-7, 2001.

WALLEY A.J., P. JACOBSON, M. FALCHI, L. BOTTOLO, J.C. ANDERSSON, E. PETRETTO, A. et al. Differential co-expression analysis of obesity-associated networks in human subcutaneous adipose tissue. **Int J Obes** (Lond) Author manuscript. July 1. 2012

WANG, G.; ZHANG, L.; LI, Q. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. **Biochem Biophys Res Commun**. 341: 310-3, 2006;

WARDEN, N. A. S.; WARDEN, C. H. Biological influences on obesity. In: STYNE, D. M. Childhood and adolescent obesity. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 4, p. 879-891, 2001.

WATSON, R.T; PESSIN, J.E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. **Recent Prog Horm Res**, v.56, p.175-93, 2007.

WALSH NP, MONTAGUE JC, CALLOW N, ROWLANDS AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. **Arch. Oral Biol** ;49 (2): 149-54, 2004.

WONG D. Salivary Diagnostics. 1st ed. **Wiley-Blackwell**; 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: **WHO**; 2000. **OMS**, 2012.

WOLF, G.; PHIL, D. Serum retinol-binding protein: A link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. 251-256, 2007.

WU H, WEI L, BAO Y, LU J, et al. Fenofibrate reduces serum retinol-binding protein-4 by suppressing its expression in adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 296(4): E628-34, 2009.

YANG, Q.; GRAHAN, T.E.; MODY, N.; PREITNER, F.; PERONI, O. D.; ZABOLOTNY, Z. M.; KOTANI, K.; QUADRO, L.; KAHN, B. B. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature**. 436, (7049), 356-362, 2005.

YUKO, O.; MASAMI, K. A.; YOSHIHIRO, A.; HAYATO, K.; RYOHEI, Y. Exosome-Like vesículas com dipeptidil-peptidase IV na saliva humana. **Biol. Pharm. Bull**. 31 (6) 1059-1062; 2008.



YU, L. *et al.* PKC\_ inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser1101. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p. 45304-45307, 2004.