

# **BIOTRANS**

**Programa de Pós - Graduação em  
Biomedicina Translacional**

**Mestrado e Doutorado**



## **Perfil proteômico do plasma e da saliva em adultos jovens com obesidade e sobrepeso**

**Mestrando:** Carlos Vinicius Ferreira da Silva

**Orientadoras:** Eidy de Oliveira Santos e  
Carina Maciel da Silva Boghossian

**Duque de Caxias**

**2019**

**Carlos Vinicius Ferreira da Silva**

**Perfil proteômico do plasma e da saliva em adultos jovens com obesidade e sobrepeso**

Dissertação apresentada ao Programa em Biomedicina Translacional (Biotrans), como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Orientadores:**

Prof<sup>a</sup>. Eidy de Oliveira Santos

Prof<sup>a</sup>. Carina Maciel da Silva Boghossian

**Duque de Caxias**

2019

Carlos Vinicius Ferreira da Silva

Dissertação apresentada ao Programa em Biomedicina Translacional (Biotrans), como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

---

Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Eidy de Oliveira Santos

UEZO

Orientador

---

Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Carina Maciel da Silva  
Boghossian

UNIGRANRIO

Orientador

---

Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Cláudia Maria Pereira

UNIGRANRIO

---

Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

UERJ – Maracanã

---

Prof, Dr. Dário Eluan Kalume

Fiocruz

---

Prof<sup>a</sup>, Dr<sup>a</sup>. Virginia Genelhu de Abreu

Coordenadora Geral do Programa

Pós-Graduação em Biomedicina Translacional-BIOTRANS

Aos mestres pela sua força e apoio  
À minha família e amigos que sempre me ajudaram  
A todos que participaram dessa minha jornada sempre me apoiando

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus mestres espirituais por todo apoio, força, coragem e sabedoria necessária para prosseguir nessa jornada.

Aos meus pais, Marlene Gomes Ferreira (*in memoriam*) e Carlos José da Silva, ao meu irmão Carlos José Ferreira da Silva, ao meu tio Hugo José da Silva, a minha avó Helena Pereira da Silva, ao meu amigo Rafael Carvalho que é um irmão para mim.

À professora Eidy de Oliveira Santos, por todo seu apoio companheirismo e amizade. Agradeço imensamente por toda ajuda e conselhos, por todas as dicas e ensinamentos e por toda amizade que contruímos.

À professora Carina Maciel da Silva Boghossian por toda a sua ajuda e orientação nesses dois anos de mestrado. Foram diversas reuniões onde você sempre me auxiliou, obrigado por toda a sua amizade.

Aos professores Youssef Bacila Sade e Sandra Mara Naressi Scapin do Inmetro por toda sua ajuda e paciência, me ajudando e ensinado todos os fundamentos da espectrometria de massas.

A todos os professores do programa de Pós-graduação Biotrans e pelos ensinamentos e conselhos nessa jornada, pelo enriquecimento e por todo conhecimento que me foi ofertado.

À Dra Bianca Alves Pauletti e à Dra Adriana Franco Paes Leme e toda sua equipe por me receber no em Campinas no LNBio e por toda a parceria, me ajudando na última parte do nosso trabalho.

A todos os meus amigos Carlos Roberto, Gelia Havir, Juliana Rosa, Tamara, Danielle Voigt. Danielle Rodrigues, Ritiele, Guilherme Proença, Thuany, Elisangela, Beatriz, Romulo e Karine.

Aos voluntários que participaram do estudo.

Aos órgãos de fomento, Capes, CNPq e Faperj pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que me ajudaram direta e indiretamente não só no mestrado, mas em toda a minha vida.

“Se você poder conceber e acreditar,  
então você pode realizar”

Napoleon Hill

## Resumo

A obesidade é um estado crônico relacionado a múltiplas comorbidades como hipertensão, diabetes tipo 2, doenças periodontais e cardiovasculares. A obesidade acarreta em uma alteração na produção de adipocinas e citocinas, que podem ser encontradas no plasma sanguíneo e na saliva, criando um processo inflamatório prolongado e de baixa intensidade. O processo inflamatório apresentado na obesidade aumenta o risco para doenças cardiovasculares e periodontais. O objetivo do presente estudo é analisar o proteoma do plasma e da saliva de adultos jovens com obesidade e sobrepeso em comparação com indivíduos com peso normal, e determinar possíveis biomarcadores para as doenças periodontal e cardiovascular. A população de estudo foi constituída por 18 alunos e/ou funcionários da Unigranrio, Campus I, com idades entre 18 e 35 anos e pelo menos 20 dentes. Os indivíduos foram categorizados conforme suas medidas antropométricas nos grupos: Normal, Sobrepeso e Obeso. Os indivíduos responderam a questionários anamnésicos, e foram submetidos a exame periodontal, mensuração de medidas antropométricas, aferição da pressão arterial sistêmica e coleta de saliva e sangue periférico. As proteínas extraídas das amostras de saliva e sangue foram analisadas por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/TOF). Foram identificadas um total de 87 proteínas provenientes da saliva e do plasma. Desse total, 58 proteínas são exclusivas da saliva e 22 do plasma e a saliva e o plasma compartilharam, ainda, 7 proteínas. A maior parte das proteínas detectadas foram identificadas como participantes ou reguladores do sistema imunológico, resposta imune. Dentre as proteínas identificadas a Alfa actina de musculo cardíaco, a Actina de musculo liso aórtico, cadeia gama do fibrinogênio apresentaram relações com o desenvolvimento da doença cardiovascular. Duas proteínas no estudo apresentaram relação com o desenvolvimento de *Diabetes Mellitus* tipo 2 a Antitripsina alfa 1 e a proteína do sistema complemento C3. As alterações dessas proteínas demonstraram ser um indicativo para o potencial uso como biomarcadores precoces para o diagnóstico de doenças.

**Palavras-chave:** Obesidade, biomarcadores, plasma sanguíneo, saliva, proteoma.

**Abstract**

Obesity is a chronic condition related to multiple comorbidities such as hypertension, type 2 diabetes, periodontal and cardiovascular diseases. Obesity leads to an alteration in the production of adipokines and cytokines, which can be found in blood plasma and saliva, creating a prolonged inflammatory process of low intensity. The inflammatory process presented in obesity increases the risk for cardiovascular and periodontal diseases. The aim of the present study is to analyze the plasma and saliva proteome of young adults with obesity and overweight compared to normal weight individuals and to determine possible biomarkers for periodontal and cardiovascular diseases. The study population consisted of 18 students and / or employees of Unigranrio, Campus I, aged between 18 and 35 years and at least 20 teeth. Individuals were categorized according to their anthropometric measures in the Normal, Overweight and Obese groups. The individuals responded to anamnestic questionnaires, and underwent periodontal examination, measurement of anthropometric measurements, measurement of systemic arterial pressure and collection of saliva and peripheral blood. Proteins extracted from saliva and blood samples were analyzed by mass spectrometry (LC-ESI-MS / TOF). A total of 87 proteins from saliva and plasma were identified. Of this total, 58 proteins are unique to saliva and 22 from plasma and saliva and plasma have also shared 7 proteins. Most of the proteins detected were identified as participants or regulators of the immune system, immune response. Among the proteins identified the alpha actin of the cardiac muscle, Actin of aortic smooth muscle, fibrinogen gamma chain had relations with the development of cardiovascular disease. Two proteins in the study were related to the development of Diabetes Mellitus type 2 to Antitrypsin alpha 1 and the complement system protein C3. The alterations of these proteins have been shown to be indicative of the potential use as early biomarkers for the diagnosis of diseases.

**Keywords:** Obesity, biomarkers, blood plasma, saliva, proteome, diagnosis.



## LISTA DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Prevalência de sobrepeso e obesidade. Em A prevalência de obesos e sobrepeoso em 2014 e em B projeção daprevalência de obesos e sobrepesos em 2025.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 23 |
| <b>Figura 2.</b>  | Incidência de sobrepeso e obesidade em brasileiros do sexo masculino e feminino. Em A incidência de sobrepeso em adultos homens e mulheres e em B incidência de obesidade em adultos homens e mulheres.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 24 |
| <b>Figura 3.</b>  | Representação das células dos tecidos adiposos. Em A morfologia do tecido adiposo marrom, apresentando mitocôndrias, gotas lipídicas e núcleo, em B tecido adiposo bege, apresentando mitocôndrias, gotas lipídicas e núcleo e em C tecido adiposo branco, apresentando mitocôndrias, gotas lipídicas e núcleo.....                                                                                                                                                              | 26 |
| <b>Figura 4.</b>  | Influência do peso e restrição calórica na produção de adipocinas pró e anti-inflamatórios. Em A, a restrição calórica eleva a produção de adipocinas anti-inflamatórias e diminui a produção de adipocinas pró-inflamatórias, ocasionado uma maior susceptibilidade a infecções, em B em indivíduos magros há um equilíbrio na produção de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, em C em indivíduos obesos ocorre o aumento, levando a uma inflamação crônica..... | 28 |
| <b>Figura 5.</b>  | Adipocinas e suas influencias na proteção e patogênese do sistema cardiovascular.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 36 |
| <b>Figura 6.</b>  | Alterações nos níveis de adipocinas observadas em quadros de obesidade e periodontite.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 39 |
| <b>Figura 7.</b>  | Diagnóstico periodontal referente aos três grupos do estudo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 50 |
| <b>Figura 8.</b>  | Proteínas salivares e plasmáticas identificadas na espectrometria de massas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 52 |
| <b>Figura 9.</b>  | Distribuição quantitativa das proteínas identificadas de acordo com o grupo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 53 |
| <b>Figura 10.</b> | Distribuição das proteínas plasmáticas de acordo com os grupos estudados.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 60 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                                                              |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Classificação do peso em adultos segundo o IMC.....                                                                                          | 24 |
| <b>Tabela 2.</b> | Dados demográficos da população estudada .....                                                                                               | 47 |
| <b>Tabela 3.</b> | Dados antropométricos dos grupos estudados.....                                                                                              | 48 |
| <b>Tabela 4.</b> | Dados clínicos periodontais antropométricos dos grupos estudados.....                                                                        | 49 |
| <b>Tabela 5.</b> | Dados do exame sanguíneo e pressão arterial dos grupos estudados.....                                                                        | 50 |
| <b>Tabela 6.</b> | Proteínas salivares identificadas e apresentadas de acordo com superexpressão (↑) ou subexpressão (↓) na comparação entre os grupos.....     | 54 |
| <b>Tabela 7.</b> | Proteínas plasmáticas identificadas e apresentadas de acordo com hiperexpressão (↑) ou hipoexpressão (↓) na comparação entre os grupos ..... | 61 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAA- Aneurisma da aorta abdominal

AAT- Alpha-1-antitrypsin

A1G1- Alpha-1-acid glycoprotein

ABESO- Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica

ACTA2- Actin, aortic smooth muscle

ACTBL2- Beta-actin-like protein 2

ACTC1- Alpha Cardiac Muscle Actin 1

AGT- Angiotensinogen

ACTG2- Actin, gamma-enteric smooth muscle

ApoA- Apolipoprotein A

ASP- Proteína Estimuladora de Acilação

AVC- Acidente Vascular Cerebral

BPIFA2- BPI fold-containing family A member 2

BPIFB1- BPI fold-containing family B member 1

BPIFB2- BPI fold-containing family B member 2

BRCA 1- Breast câncer 1

BRCA 2- Breast câncer 2

BD- Biofilme Dental

CC- Circunferência de Cintura

CCP- Citrulinados Cíclicos

CP- Ceruloplasmin

CMH- Cadiomiopatia Hipertrofia

CQ- Circunferência de Quadril

CT- Colesterol Total

DM1- Diabetes Mellitus do tipo 1

DM2- Diabetes Mellitus do tipo 2

EDTA- Ethylenediamine Tetraacetic Acid

FG- Fluido Gengival

FDA- Food and Drug Administration

GC- globulina de componente específico do grupo

HDL- Hgh Density Lipoprotein

HER2- Human Epidermal growth factor Receptor-type 2

HOMA-IR- Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance

HPLC- Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

ICAM-1- Molécula de Adesão Intercelular 1

IGHA1- Immunoglobulin heavy constant alpha 1

IGHG2- Immunoglobulin heavy constant gamma 2

IGHG3- Immunoglobulin heavy constant gamma 3 IGLC2- Immunoglobulin lambda constant 2

IL-1 $\beta$ - Interleucina-1 $\beta$

IL-4- Interleucina-4

IL-5- Interleucina-5

IL-6- Interleucina 6

IL-8- Inteleucina-8

IMC- Índice de Massa Corporal

IRA- Insuficiência aguda renal

KDa- Kilo Dalton

LDL- Low Density Lipoprotein

LPS- Lipopolissacarídeo

ML- Mililitro

MM- Milimolar

MMP-8- Metaloproteinase de Matriz-8

MPO- Mieloperoxidase

MS- Espectometria de Massas

NCI- Nível Clínico de Inserção (NCI)

Ng- Nanograma

NIH- National Institutes of Health

NK- Natural Killer

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAGE- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PAI-1- Inibidor do Plasmogênio-1

PA- Pressão Arterial

PCR- Proteína C Reativa

PMSF- Phenilmetilsulfonil Fluoride

POTEE- POTE ankyrin domain family member

PRP- Proline-Rich Protein

PS- Profundidade de Sondagem

RAD-23- UV excision repair protein RAD23 homolog A

RCQ- Relação Cintura Quadril

TF- Serotransferrin

SDS- Sodium Dodecyl Sulfate

SG- Sangramento Gengival

SM- Síndrome Metabólica

SS- Sangramento à Sondagem

SU- Supuração à Sondagem

TAB-Tecido Adiposo Branco

TAM-Tecido Adiposo Marrom

TAS- Tecido Adiposo Subcutâneo

TAV-Tecido Adiposo Visceral

TGF $\beta$  - Fator de transformação do crescimento

TG-Triglicerídeos

TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TRIS- trisaminometano

UCP1- Proteína de Desacoplamento

Vcam-1- Molécula de adesão celular vascular-1

VIGITEL- Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VLDL- Very Low Density Lipoprotein

WHO- World Health Organization

µg- Micrograma

µL- Microlitro

µU- Micro Unidade

## Sumário

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>                                       | <b>17</b> |
| <b>2.1. Obesidade.....</b>                                       | <b>20</b> |
| 2.1.2. Tecido Adiposo .....                                      | 23        |
| 2.1.3. Obesidade e processo inflamatório.....                    | 25        |
| <b>2.2. Obesidade e Doenças Periodontais .....</b>               | <b>28</b> |
| <b>2.3. Obesidade e Doenças cardiovasculares .....</b>           | <b>30</b> |
| 2.4.1. Biomarcadores.....                                        | 31        |
| 2.4.2. Biomarcadores de doenças Cardiovasculares .....           | 34        |
| 2.4.3. Biomarcadores da Doença Periodontal .....                 | 36        |
| <b>3. Objetivos .....</b>                                        | <b>38</b> |
| 3.1 Objetivo Geral .....                                         | 38        |
| 3.2 Objetivos Específicos .....                                  | 38        |
| <b>4. Material e Métodos .....</b>                               | <b>39</b> |
| 4.1. Casuística .....                                            | 39        |
| 4.2. Dados anamnésicos .....                                     | 40        |
| 4.3. Avaliação Clínica .....                                     | 40        |
| 4.3.1. Exame intra-oral .....                                    | 40        |
| 4.3.2 Exame antropométrico .....                                 | 40        |
| 4.4 Aferição da pressão arterial .....                           | 41        |
| 4.5 Análises laboratoriais .....                                 | 42        |
| 4.6 Análise proteômica.....                                      | 43        |
| 4.7 Análise dos dados/ estatística .....                         | 45        |
| <b>5. Resultados .....</b>                                       | <b>46</b> |
| 5.1. Descrição da amostra .....                                  | 46        |
| 5.2. Dados Antropométricos.....                                  | 47        |
| 5.3. Diagnóstico periodontal .....                               | 48        |
| 5.4 Dados sanguíneos.....                                        | 49        |
| 5.5. Identificação das proteínas .....                           | 50        |
| <b>6. Discussão.....</b>                                         | <b>64</b> |
| 6.1. Proteínas salivares .....                                   | 65        |
| 6.1.1. Actinas .....                                             | 66        |
| 6.1.1.1 Proteína semelhante a beta-actina 2 (ACTBL2) .....       | 67        |
| 6.1.2. Proteínas da família BPIF.....                            | 68        |
| 6.1.3. Calicreína-1.....                                         | 70        |
| 6.1.5. Membros da família de domínio POTE ankirin E, I e F ..... | 71        |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1.6. Homólogo A da proteína RAD23 de reparo por excisão UV (RAD-23) | 72 |
| 6.2. Proteínas salivares e plasmáticas                                | 72 |
| 6.2.1 Hemoglobina subunidades alfa e beta                             | 72 |
| 6.2.2. Serotransferrina                                               | 73 |
| 6.2.3. Imunoglobulinas                                                | 74 |
| 6.2.4. Albumina                                                       | 75 |
| 6.3. Proteínas plasmáticas                                            | 76 |
| 6.3.1. Proteína de ligação à vitamina D                               | 76 |
| 6.3.2. Angiotensinogênio                                              | 76 |
| 6.3.3. Ceruloplasmina (CP)                                            | 77 |
| 6.3.4. Glicoproteína ácida alfa-1 (A1G1)                              | 77 |
| 6.3.5. Antitripsina alfa-1                                            | 78 |
| 6.3.5. Cadeia gama do Fibrinogênio                                    | 79 |
| 6.3.6. Proteína do sistema complemento                                | 79 |
| 7. Conclusão                                                          | 80 |
| 8. Referências bibliográficas                                         | 81 |



## 1. Introdução

A obesidade é definida segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)- como um acúmulo de gordura de forma anormal ou excessiva e que pode prejudicar a saúde do indivíduo (WHO, 2017a). Evidências apontam que na obesidade e em suas comorbidades há um crosstalk entre o sistema imune e o sistema metabólico, com os adipócitos exercendo funções imunológicas (KAU *et al.*, 2011). A obesidade influencia o aumento do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco em camundongos e humanos, criando uma inflamação local e sistêmica, e assim, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e resistência à insulina (WEISBERG *et al.*, 2003; CANCELLO *et al.*, 2005)

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência de sobrepeso e obesidade em adultos com idade a partir de 18 anos foram de cerca 39% e 13% respectivamente em 2016 (WHO, 2017a). Estes números têm aumentado ao longo do tempo, tendo dobrado nas últimas 4 décadas. Este cenário dramático pode representar um impacto importante na saúde pública devido às comorbidades associadas. As consequências comuns da obesidade são doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios musculoesqueléticos e alguns cânceres (BERG *et al.*, 2005; YUSUF *et al.*, 2005). Além disto, existe evidência de que há uma associação entre obesidade e um risco maior para periodontite em diferentes populações (KHADER *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2013; KONGSTAD *et al.*, 2009; REEVES *et al.*, 2006; SAITO *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2005; DALLA VECCHIA *et al.*, 2005; CHAFFEE *et al.*, 2010; MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2017). Nesse quadro, a medicina personalizada ganhou espaço, buscando fatores fisiológicos, ambientais e histórico médico de um indivíduo para utilização no tratamento (DUARTE *et al.*, 2016).

A medicina de precisão é considerada atualmente uma das tendências mais importantes da medicina, sendo um modelo que propõe o uso de terapias focadas no indivíduo. Essa temática não é nova, a definição da tipagem sanguínea tem sido utilizada há anos para auxiliar no processo de transfusão de sangue. Entretanto, a ideia de aplicar esse modelo de forma mais ampla se tornou possível devido ao avanço em técnicas laboratoriais de sequenciamento

do genoma humano, o que levou ao desenvolvendo de novos medicamentos e ferramentas que permitem a detecção de biomarcadores (COLLINS & VARMUS, 2015; LANDECK *et al.*, 2016). A medicina personalizada é baseada em farmacogenética, farmacogenômica, proteômica, metabolômica, transcriptômica, levando em conta informações individuais do paciente e fatores ambientais (JAIN, 2016). Um desafio para a medicina personalizada de precisão é o desenvolvimento de novos biomarcadores, utilizando a sensibilidade da espectrometria de massas para identificar biomarcadores de baixa concentração (DUARTE *et al.*, 2016).

Biomarcadores são definidos como substâncias que podem ser medidas e avaliadas experimentalmente e indicam uma condição normal ou patológica de um organismo ou de respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas (STRIMBU & TAVEL, 2011). Os biomarcadores podem ser de diversos tipos, como enzimas, proteínas, genes e células específicas. Os biomarcadores podem ser usados na área clínica para diagnóstico ou para identificar riscos para a ocorrência de doenças (BUYSE *et al.*, 2011; FOROUTAN, 2015).

Quanto maior a relação de um biomarcador com o processo de uma doença, mais preciso serão as informações, permitindo analisar e identificar processos patológicos ou monitorar o processo de uma terapia (DAVIS *et al.*, 2009; ONG *et al.*, 2012; MITIDIÈRE *et al.*, 2016).

O uso dos biomarcadores está relacionado ao diagnóstico, prognóstico e predição na medicina personalizada, através do uso de sangue, saliva, urina dentre outros (VAN DIJK *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2009; AN & GAO, 2015). Os biomarcadores proteicos vêm sendo utilizados para o estudo de diversas doenças, como câncer de mama, cólon ou pulmão, doença Alzheimer, doença Parkinson, assim como doenças cardiovasculares e periodontais, as quais são comorbidades relacionadas à obesidade (PINHO *et al.*, 2014; YOSHIZAWA *et al.*, 2013; MCGHEE *et al.*, 2014; CHAHINE *et al.*, 2014; HUYNH & MOHAN, 2017; CHIEN *et al.*, 2017). As técnicas de proteômica baseada na espectrometria de massas (MS) facilitam a descobertas de novos biomarcadores, resultando no aumento de potenciais candidatos a biomarcadores (ZOU *et al.*, 2013; WHITE *et al.*, 2014).

O termo proteoma se refere ao conjunto de proteínas produzidas a partir de um determinado genoma. Ao contrário do genoma, o proteoma é dinâmico e varia de acordo com o tempo, estímulo ambiental e com a condição fisiopatológica da célula (WILKINS *et al.*, 1996). A proteômica é a área de estudo tanto das proteínas expressas por uma célula ou organismo quanto da determinação da modulação da expressão proteica e sua localização celular (WILKINS *et al.*, 1996; ASLAM *et al.*, 2017).

O crescente número de informação gerada pelo sequenciamento do genoma humano aumentou a busca pela caracterização de moléculas funcionais, tais como proteínas, uma vez que estas são importantes na geração de doenças e como alvos de ação de medicamentos. Dessa forma, o avanço nos estudos de proteômica pode contribuir significativamente para melhoria da saúde e produção de novos medicamentos, contribuindo para o crescimento da medicina personalizada (JAIN, 2016).

A identificação de biomarcadores associados a obesidade tem despertado interesse no meio científico. Os biomarcadores podem fornecer novos entendimentos sobre as vias fisiopatológicas e auxiliar no monitoramento e acompanhamento da doença (ALEKSANDROVA *et al.*, 2017). O aumento da gordura visceral, subcutânea e hepática na obesidade influenciam no desenvolvimento da resistência a insulina, aumentando o risco para a hipertensão, dislipidemia, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, além de poder possuir um papel relevante em alguns tipos de câncer (KAHN and HULL., 2006; ALEKSANDROVA *et al.*, 2013; ALEKSANDROVA *et al.*, 2017). O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) tem sido relacionado ao risco de câncer, assim como aterosclerose e doenças cardiovasculares, apesar dos resultados ainda não conclusivos (ALEKSANDROVA *et al.*, 2014; HIGASHI *et al.*, 2014; JING *et al.*, 2015; NIMPTSCH and PISCHON., 2016).

O tecido adiposo apresenta uma variedade de células imunes, variando em abundância e fenótipo de acordo com massa corporal, especialmente na obesidade, estabelecendo uma relação entre a obesidade e o processo inflamatório. Além das adipocinas produzidas pelos adipócitos, as citocinas

possuem um papel no desequilíbrio dos efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (ALEKSANDROVA *et al.*, 2017).

Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar o perfil proteico de indivíduos com obesidade e sobrepeso em comparação com indivíduos normais, identificando possíveis biomarcadores associados à obesidade.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. Obesidade**

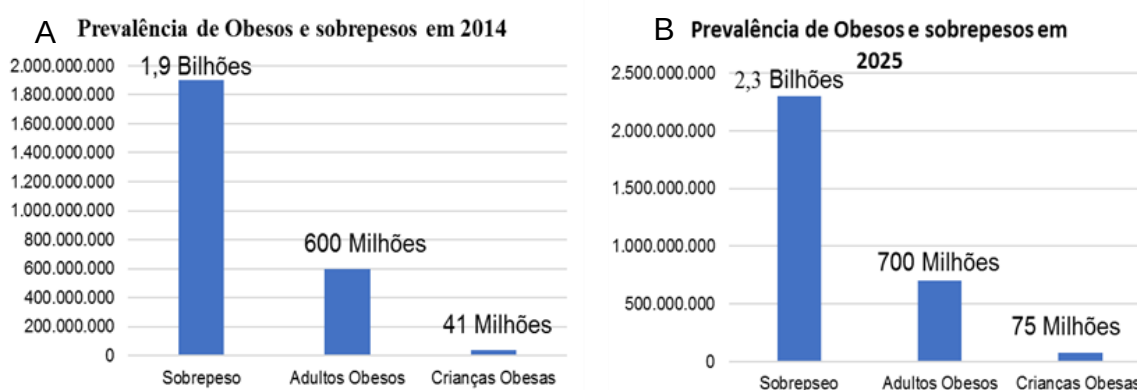
A obesidade e o sobrepeso são definidos pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura, representando um risco à saúde (SUVAN *et al.*, 2011). Estas condições estão relacionadas a múltiplas comorbidades, como doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, doença periodontal, hipertensão, diabetes tipo 2 (DM2). Desta forma, os portadores apresentam uma diminuição da saúde e perda da longevidade (SAITO & SHIMAZAKI, 2007; CHAFFEE *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2013; CARLUCCI *et al.*, 2013; DHANDA & TAHERI, 2017).

O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade nos países em desenvolvimento e desenvolvidos tem se agravado conforme o passar dos anos, tornando-se um grave problema para a saúde pública, sendo, inclusive, considerada um dos mais graves problemas de saúde do século 21 (BARNES *et al.*, 2007; STEVENS *et al.*, 2012; POPKIN *et al.*, 2012). A obesidade é uma epidemia de proporções globais, alcançando cerca de 2,8 milhões de morte por ano, devido ao excesso de peso ou obesidade (WHO, 2017c).

Em 2016, a estimativa era que 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos ou mais, apresentavam sobrepeso, sendo 650 milhões de adultos obesos. Naquele ano, cerca de 39% dos adultos tinham sobrepeso e 13% eram obesos. Além disto, em torno de 41 milhões de crianças na faixa de 5 anos tinham sobrepeso ou eram obesos. Entretanto, quando os dados de crianças e adolescentes, de 5 a 19 anos, são combinados, observa-se que mais de 340 milhões estão com sobrepeso ou são obesos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata,

ainda, que houve um aumento significativo no número de pessoas obesas no mundo entre 1975 e 2016, chegando quase ao triplo de pessoas (WHO, 2017a). Segundo a OMS, caso o quadro não se altere em 2025, haverá cerca de 2,3 bilhões de pessoas com sobrepeso, sendo 700 milhões de adultos e 75 milhões de crianças (Figura 1) com obesidade (ABESO, 2015).

**Figura 1.** Prevalência de sobrepeso e obesidade. Em A prevalência de obesos e sobrepeoso em 2014 e em B projeção daprevalência de obesos e sobrepesos em 2025.

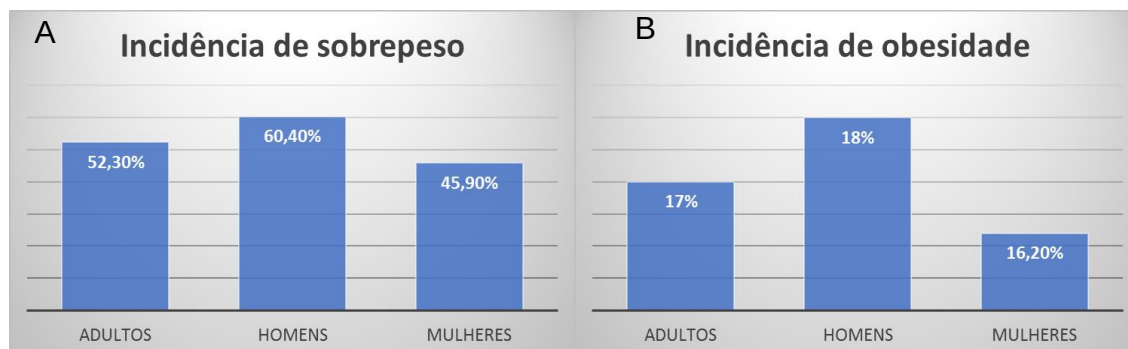


Fonte: World Health Organization, 2017.

A constatação da condição de obesidade é realizada através do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), avaliando a relação entre o peso e a altura elevada ao quadrado ( $\text{Kg/m}^2$ ). Segundo o IMC, adultos com índice menor que 18,5 estão abaixo do peso; o peso normal situa-se na faixa entre 18,5 e 24,9; o sobrepeso, entre 25 e 29,9; e a obesidade, igual ou maior a 30 (Tabela 1) (WHO, 2019d).

No Brasil, segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), em 2015, a taxa de sobrepeso nos adultos atingiu 52,3%, com maior prevalência nos homens (60,4%) do que nas mulheres (45,9%). A obesidade teve uma frequência de 17% nos adultos, sendo mais incidente nos homens (18%) do que nas mulheres (16,2%) (Figura 2). A pesquisa foi realizada nas 26 capitais da federação e no Distrito Federal, usando como base de dados de beneficiários de planos de saúde (VIGITEL, 2017).

**Figura 2.** Incidência de sobrepeso e obesidade em brasileiros do sexo masculino e feminino. Em A incidência de sobrepeso em adultos homens e mulheres e em B incidência de obesidade em adultos homens e mulheres.



Fonte: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, 2017).

**Tabela 1.** Classificação do peso em adultos segundo o IMC (WHO,2006).

| Classificação  | Índice de Massa Corporal |
|----------------|--------------------------|
| Baixo peso     | < 18,5                   |
| Peso Normal    | 18,5 - 24,9              |
| Sobrepeso      | 25 - 29,9                |
| Obeso Grau I   | 30 - 34,9                |
| Obeso Grau II  | 35 - 39,9                |
| Obeso Grau III | > 40                     |

Apesar de comumente utilizado, o IMC não consegue distinguir massa gordurosa de massa magra, causando conflitos, pois há uma superestimação em pessoas de maior massa muscular e uma falsa medida em idosos, devido à perda de massa magra. Além disso, o IMC não traduz como a gordura corporal está distribuída, sendo a distribuição da gordura corporal um fator de extrema importância na avaliação de sobrepeso e obesidade (ABESO, 2016). Outro método utilizado em combinação com o IMC, e que pode verificar as condições de saúde de uma pessoa e o grau de risco de desenvolvimento de problemas a saúde, é a mensuração de Circunferência de Cintura (CC) e de Quadril (CQ). A

Circunferência de Cintura e de Quadril são utilizadas para verificar o nível de gordura visceral. A partir destes dados, é possível obter a relação cintura-quadril (ABESO, 2016).

A obesidade é uma doença complexa, porém comumente relacionada ao aumento anormal de gordura no tecido adiposo (WHO, 2017a), podendo influenciar no desenvolvimento de DM2, apneia do sono e ocasionar acidente vascular cerebral (AVC). Esta doença é normalmente caracterizada pelo aumento de gordura corporal, denominado adiposidade. O aumento do tecido adiposo tem influência na produção de adipocinas, que apresentam um papel importante nas complicações cardiometabólicas (GREENBERG & OBIN, 2006; KANG *et al.*, 2016).

### **2.1.2. Tecido Adiposo**

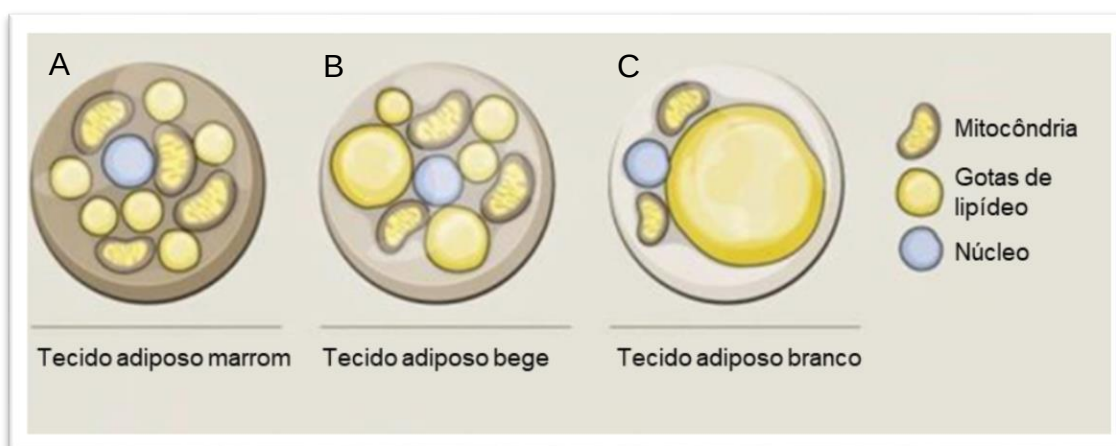
O tecido adiposo, apesar de apresentar em grande parte a função de estocar energia, também é responsável por diversas funções, como secreção de proteínas e peptídeos pelos adipócitos, sendo um órgão metabolicamente ativo e de grande importância para o organismo (SANTOS & TORRENT, 2010; SIPPEL *et al.*, 2014).

O tecido adiposo pode ser dividido de acordo com sua localização em Tecido Adiposo Visceral (TAV) e Tecido Adiposo subcutâneo (TAS), os quais apresentam características metabólicas diferentes. O TAS é encontrado no abdômen, nas regiões glúteas e femoral e em baixo da pele, produzindo adipocinas pró-inflamatórias, como leptina e proteína estimuladora de acetilação (ASP). O TAV, encontrado principalmente na área abdominal, secreta maior quantidade de adipocinas pró-inflamatórias, como: i) Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que é uma citocina com características pró-inflamatórias sintetizadas por neutrófilos, macrófagos e adipócitos, que atua em processos de apoptose, citotoxicidade, inflamação, ativação da lipólise e inibição da lipogênese; ii) Interleucina-6 (IL-6), que é uma citocina produzida por células do sistema imune como macrófagos e monócitos, além de adipócitos e fibroblastos, tendo a capacidade de induzir a produção de Proteína C Reativa (PCR) e aumentar a produção de *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL); e iii) Resistina, que é

produzida por macrófagos e adipócitos, está relacionada com resistência a insulina, realizando maior liberação de ácido graxo e lipólise (ALANIZ *et al.*, 2007; KONRAD *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2007; PORTER *et al.*, 2009; MOULIN *et al.*, 2009).

O tecido adiposo também pode ser dividido quanto a sua classificação morfofuncional em: Tecido Adiposo Branco (TAB), Tecido Adiposo Marrom (TAM) e tecido adiposo bege (Figura 3) (PRADO *et al.*, 2009; BOSTRÖM *et al.*, 2012).

**Figura 3.** Representação das células dos tecidos adiposos. Em A morfologia do tecido adiposo marrom, apresentando mitocôndrias, gotas lipídicas e núcleo, em B tecido adiposo bege, apresentando mitocôndrias, gotas lipídicas e núcleo e em C tecido adiposo branco, apresentando mitocôndrias, gotas lipídicas e núcleo.



Fonte: <https://crescimentoinfoco.wordpress.com/page/20/>

O TAB está situado em várias áreas do organismo, sendo considerado um órgão heterogêneo composto de diversos tipos de células, dentre estas, células progenitoras de adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e vários tipos de células imunes (SENGENES *et al.*, 2007; SCHIPPER *et al.*, 2012a). O TAB apresenta a função de armazenar energia, proteção contra choques mecânicos e equilíbrio da temperatura corporal, além de secretar adipocinas, moléculas bioativas responsáveis por processos fisiológicos e metabólicos do organismo (ALANIZ *et al.*, 2007). A obesidade impacta de forma complexa o TAB, levando



a diversas alterações nas populações de linfócitos e ativação do perfil pró-inflamatório dos macrófagos (WENTWORTH *et al.*, 2010; TRAVERS *et al.*, 2015)

O TAM é encontrado tanto em recém-nascidos quanto em adultos, apesar de sua identificação e relação com adultos serem mais recentes. Este é localizado próximo à região do pescoço, do tórax, da supra clavicular e da suprarrenal, e tem a capacidade de converter nutrientes em energia química na forma de calor, mantendo a temperatura corporal (KAJIMURA *et al.*, 2010; SAITO, 2013). A manutenção da temperatura corporal realizada pelo TAM é dada por uma abundância de mitocôndrias, através de proteínas especializadas como a termogenina ou proteína de desacoplamento 1 (UCP1) (CANNON & NEDERGAARD, 2004). Assim como o TAB, o TAM está presente em diversos locais e responde a influências ambientais, porém, os adipócitos marrons presentes no período neonatal são distintos dos que estão presentes na vida adulta (WU *et al.*, 2012).

O tecido adiposo bege é originado a partir do TAB, através do seu “escurecimento”. O tecido adiposo bege tem a característica de apresentar baixa expressão basal de termogenina ou UCP1, ocorrendo o mesmo no TAB. Além disso, o tecido adiposo bege apresenta sensibilidade especial ao hormônio irissina, liberado durante exercícios físicos (HANDSCHIN & SPIEGELMAN, 2008; BOSTRÖM *et al.*, 2012).

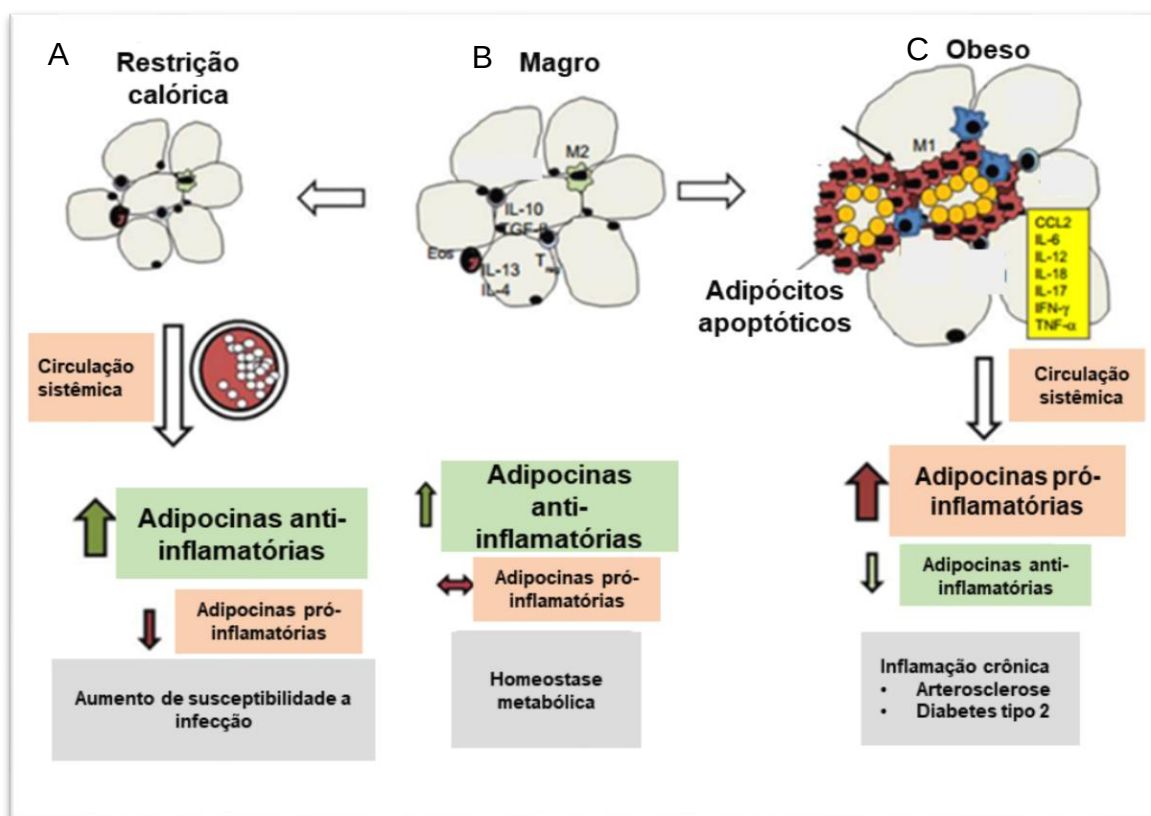
### **2.1.3. Obesidade e processo inflamatório**

Regularmente era creditado ao tecido adiposo um papel único para o armazenamento de energia na forma de lipídeos, no entanto esse tecido também possui um papel endócrino, através da liberação de adipocinas e citocinas (AHIMA and LAZAR., 2008). Essas moléculas funcionam como sinalizadores, atuando no metabolismo do musculo esquelético, fígado, cérebro, pâncreas e no próprio tecido adiposo (QATANANI and LAZAR., 2007). Na década de 1990, estudos mostraram que a obesidade é uma doença inflamatória, com maior expressão do gene responsável pela produção da adipocina e TNF- $\alpha$  no tecido no adiposo de ratos obesos em comparação com normais (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). Novos estudos se seguiram, relacionando a obesidade com

alterações nas funções endócrinas e metabólicas do tecido adiposo, mostrando um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-6, Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e outros (Figura 4) (BULLO *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2008).

Outra característica do processo inflamatório presente na obesidade é o crescente infiltrado de células imunológicas no tecido adiposo. O número de macrófagos se encontra elevado no tecido adiposo de camundongos obesos ou alimentados com dieta rica em gordura em comparação com camundongos normais, contribuindo para o aumento na expressão de adipocinas (XU *et al.*, 2003; WEISBERG *et al.*, 2003; ITO *et al.*, 2008).

**Figura 4.** Influência do peso e restrição calórica na produção de adipocinas pró e anti-inflamatórias. Em A, a restrição calórica eleva a produção de adipocinas anti-inflamatórias e diminui a produção de adipocinas pró-inflamatórias, ocasionando uma maior susceptibilidade a infecções, em B em indivíduos magros há um equilíbrio na produção de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, em C em indivíduos obesos ocorre o aumento, levando a uma inflamação crônica.



Fonte: Adaptado de Mancuso, 2016.

No tecido adiposo, o processo de ativação dos macrófagos pró-inflamatório e anti-inflamatório (respectivamente M1 e M2), é influenciado por fatores metabólicos. Foi relatado que em tecidos de ratos obesos houve um aumento na população de macrófagos M1, afetando negativamente a sensibilidade à insulina (OLEFSKY & GLASS, 2010; TATEYA *et al.*, 2013; CASTOLDI *et al.*, 2016). Não só os macrófagos, mas também as células *Natural Killers* (NK) estão aumentadas no tecido adiposo de obesos em comparação a magros, podendo contribuir para o meio inflamatório (LIU *et al.*, 2009; OHMURA *et al.*, 2010; SCHIPPER *et al.*, 2012b; WENSVEEN *et al.*, 2015a, 2015b).

Outra característica da inflamação, encontrada na obesidade, é sua cronicidade. O infiltrado de células imunológicas e expressão de citocinas pró-inflamatórias ocorrem gradualmente, contrastando com a resposta inflamatória aguda (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011). A inflamação observada em ratos já foi relatada em seres humanos. Diversos estudos descreveram processos inflamatórios de citocinas, infiltração de macrófagos e aumento da atividade de quinase no tecido adiposo de obesos em comparação a indivíduos magros (BOEHM *et al.*, 2007; BASHAN *et al.*, 2007). Foi relatado que níveis séricos elevados de mediadores inflamatórios, como o Inibidor do Plasmogênio-1 (PAI-1) e PCR, estão associados com DM2 (TABÁK *et al.*, 2010; YARMOLINSKY *et al.*, 2016). Estudos recentes de Brahimaj e colaboradores 2017, observaram que as proteínas S100A12 e IL-13 podem ser utilizadas como diagnóstico para pré-diabetes e que a IL-17 apesar de ainda ter um papel incerto, pode ser usada para o diagnóstico de diabetes tipo 2.

As adipocinas são citocinas liberadas pelo tecido adiposo, e são capazes de atuar em processos fisiopatológicos e fisiológicos, afetando o metabolismo de lipídios e glicose, saciedade e apetite, funções imunológicas e inflamação (LAGO *et al.*, 2007; WOZNIAK *et al.*, 2009; LAGO *et al.*, 2009). A atuação e produção das adipocinas são alteradas na obesidade, podendo levar a um estado de hiperinflamação (BALISTRERI *et al.*, 2010).

As adipocinas apresentam uma grande diversidade, existindo mais de cinquenta tipos, incluindo TNF- $\alpha$ , leptina, ASP, PCR, IL-6, resistina, termogenina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), adiponectina, apelina, visfatina (BALISTERI *et al.*, 2010; SIPPEL *et al.*, 2014).

Devido ao aumento no acúmulo de gordura, o sobrepeso e a obesidade representam um grave risco à saúde (SUVAN *et al.*, 2011), influenciando no desenvolvimento de doenças, cardiovasculares, DM2, hiperlipidemia, periodontite e hipertensão (SAITO & SHIMAZAKI, 2007; MORITA *et al.*, 2011).

A hiperplasia dos adipócitos, ocasionada em condições de sobrepeso e obesidade, aumenta a quantidade de adipocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF- $\alpha$  (KARMIRIS *et al.*, 2006; SATPATHY *et al.*, 2015), podendo levar ao desenvolvimento ou agravamento de doenças periodontais, como a periodontite, e de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (VERHAGEN, VISSEREN, 2011; GOCKE *et al.*, 2014).

## **2.2. Obesidade e Doenças periodontais**

Dentre as doenças infecto-inflamatórias, a doença periodontal ganha destaque, sendo uma das mais comuns (HUANG & GIBSON III, 2015). As doenças periodontais são doenças inflamatórias que acometem o periodonto, denominadas gengivite e periodontite (ARMITAGE, 1999). O fator etiológico destas doenças é o biofilme bacteriano dental (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

A gengivite se caracteriza por ser uma inflamação dos tecidos marginais, reversível e não destrutiva (EBERHARD *et al.*, 2013). Na gengivite, ocorre o acúmulo de placa bacteriana, apresentando edema gengival, eritema e sangramento à sondagem (ARMITAGE, 2004; KIM *et al.*, 2013), enquanto que a periodontite é caracterizada por uma inflamação destrutiva, na qual há perda irreversível de osso alveolar e ligamento periodontal (ARMITAGE, 1999; EBERHARD *et al.*, 2013). A demora no tratamento da periodontite pode levar à perda dentária, alterações na mastigação, aumento da mobilidade dentária e dor (PIHLSTROM *et al.*, 2005). A periodontite é modulada e ligada à resposta

inflamatória do indivíduo, evoluindo de uma condição de gengivite em indivíduos susceptíveis (KIM *et al.*, 2013; KAYAL, 2013).

A resposta imunológica é um fator crucial no desenvolvimento da periodontite (KAYAL, 2013), envolvendo moléculas sinalizadoras e células especializadas da resposta inflamatória (ZIA *et al.*, 2011). Inicialmente, a exposição à placa bacteriana gera uma lesão inflamatória local, ativando o sistema imune inato e liberando citocinas e outros mediadores inflamatórios (SERRA *et al.*, 2015).

Em 1997, Perlstein e colaboradores realizaram um estudo em ratos Zucker obesos com o objetivo de verificar se a obesidade poderia levar a alterações na histologia do periodonto na ausência de irritação e a alterações na resposta do periodonto na presença de irritação, através do contato de um fio de aço em torno do segundo molar superior. Durante o estudo, foi observado que em ratos obesos a inflamação e destruição do periodonto eram mais graves, tendo a obesidade contribuído para a maior gravidade da periodontite.

Em 2005, Genco e colaboradores analisaram os dados do levantamento epidemiológico nacional dos Estados Unidos (Third National Health and Nutrition Examination Survey), incluindo 12.367 indivíduos não-diabéticos. Na avaliação, IMC foi utilizado para mensurar a obesidade e o nível clínico de inserção foi utilizado para avaliar o *status* periodontal dos indivíduos. Quando os dados foram cruzados, foi observado que a obesidade poderia ser um fator de risco para a periodontite. Além disso, verificou-se aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , podendo ocasionar um estado hiperinflamatório, aumentando os riscos para a doença periodontal. Os dados da análise logística indicaram que esta associação entre IMC e periodontite talvez seja modulada pela resistência à insulina.

Alguns estudos têm sido realizados com enfoque na relação da periodontite e obesidade em crianças, demonstrando um aumento no índice de placa bacteriana e gengivite, conforme o aumento da massa corporal (FRANCHINI *et al.*, 2011; SFASCIOTTI *et al.*, 2016).

Tem-se demonstrado, como descrito acima, que a obesidade está relacionada ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- $\alpha$  e adipocinas como a leptina, envolvida no gasto energético, na regulação da

ingestão alimentar e funções neuroendócrinas. No entanto, estes mediadores inflamatórios levam a aumento da inflamação gengival e doenças periodontais. Essa alteração é influenciada pelo o aumento do tecido adiposo encontrado na obesidade e no sobrepeso e, consequente, aumento na produção de adipocinas pró-inflamatórias (SAITO *et al.*, 2008; SCORZETTI *et al.*, 2013; MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2017).

### **2.3. Obesidade e Doenças cardiovasculares**

Doenças cardiovasculares são um conjunto complexo e multifatorial de doenças, como AVC, hipertensão, arteriosclerose, trombose, dentre outras. Estas doenças levaram a óbito cerca de 17,7 milhões de pessoas em 2015, sendo a causa de 31% das mortes naquele ano (WHO, 2017b).

As doenças cardiovasculares estão intimamente relacionadas à inatividade física, uso de álcool, alimentação de baixa qualidade e fumo. No entanto, esse quadro pode ser revertido ou, pelo menos, em parte, por mudanças de hábito, por se priorizar o consumo de alimentos mais saudáveis e por cessação do uso de tabaco e álcool (world, 2017b).

O processo inflamatório é considerado um fator de grande importância para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SHRIVASTAVA *et al.*, 2015). A arteriosclerose é a patologia mais comum presente na doença coronariana. Análises sugerem que o processo de arteriosclerose é mediado por uma inflamação de baixo grau, através da alteração do endotélio das artérias coronarianas, que está ligado ao aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (MADJID & WILLERSON, 2011). Dentre as citocinas pró-inflamatórias ligadas à arteriosclerose, a PCR é a mais estudada, sendo uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado. Os níveis elevados dessa proteína são associados à obesidade, aumentando proporcionalmente com o IMC (BULLÓ *et al.*, 2003; TRAYHURN & WOOD, 2004; SCALABRO *et al.*, 2012).

A obesidade é listada como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MATSUZAWA, 2006a). Como já citado, o tecido adiposo produz uma variedade de adipocinas, que tem a capacidade de influenciar tecidos próximos ou distantes (NAKAMURA *et al.*, 2014). A maior

parte das adipocinas apresenta funções pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, atuando no estabelecimento de doenças relacionadas à obesidade (OUCHI *et al.*, 2016). Em oposição, algumas adipocinas apresentam um papel protetor em doenças cardiovasculares. Dessa forma, o desequilíbrio na síntese de adipocinas pode colaborar para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares (SHIBATA *et al.*, 2017).

A leptina foi a primeira adipocina a ser caracterizada. Esta é regulada por ingestão de comida, níveis de energia, hormônios e por mediadores inflamatórios (ZHANG *et al.*, 1994). Os níveis de leptina estão positivamente associados com a gordura corporal, estando sua concentração aumentada em pessoas obesas e reduzidas em pessoas com peso saudável (ENRIORI *et al.*, 2006). Estudos mostram que níveis elevados de leptina estão relacionados com AVC e infarto do miocárdio (JOHNSON *et al.*, 2007). Além disso, devido à sua ligação com o receptor de IL-6 solúvel e com PCR, dois mediadores inflamatórios relacionados à arteriosclerose, a leptina tem sido associada com o papel patogênico das placas de ateromas (ZWAKA *et al.*, 2001; SHEN *et al.*, 2005).

Frente ao exposto, doenças cardiovasculares são comuns em obesos. As relações metabólicas entre a obesidade e as doenças cardiovasculares permitiram um maior conhecimento sobre as adipocinas. O tecido adiposo inflamado tem efeitos particulares sobre as doenças cardiovasculares devido à sua influência sobre a fisiopatologia cardiovascular. As adipocinas apresentam um papel importante no sistema cardiovascular, ajudando na prevenção de doenças cardiovasculares. Entretanto, observa-se que as adipocinas têm funções antagônicas nas doenças cardiovasculares, como as funções da apelinina e visfatina (MATTU & RANDEVA, 2013). A apelinina, que é secretada pelo adipócito, pode atuar na proteção cardiovascular, atuando como mediador de controle cardiovascular. Já a visfatina, que é secretada pelo TAB, sendo secretada pelos macrófagos em infarto do miocárdio e em processos inflamatórios, contribui para inflamação endotelial e arteriosclerose (MATTU & RANDEVA, 2013).

#### **2.4.1. Biomarcadores**

Marcadores biológicos ou biomarcadores se referem a marcadores que podem ser mensurados, quantificados e relacionados a alguma condição ou estado biológico. O National Institutes of Health (NIH), nos Estados Unidos, estabelece os biomarcadores como mensurações biológicas, podendo ser obtido em diversos locais e fluidos, que podem ser utilizados para indicar processos patogênicos, processos normais ou respostas a fármacos (STRIMBU & TAVEL, 2010). Os biomarcadores incluem proteínas, RNAs não codificantes, genes, encontrados em diferentes fontes como tecidos e fluidos corporais (FOROUTAN, 2015)

A OMS definiu biomarcador como uma substância, processo ou estrutura que possa ser medido no organismo ou seus efeitos e prever ou influenciar o desfecho da doença (WHO, 2001). A definição de forma ampla pode ser aplicada em uma gama de características biológicas e moléculas provenientes de testes laboratoriais e bioimagem (FDA-NHI, 2016). O grande crescimento do conhecimento científico levou à descoberta de uma série de biomarcadores e revolucionou a medicina clínica e o desenvolvimento de drogas (SIMON, 2009; STOCKLEY, 2014)

Os biomarcadores podem ser divididos em quatro grupos, de acordo com suas características e variações: preventivo, diagnóstico, prognóstico e preditivo (ZIEGLER *et al.*, 2012; HE, 2015). O biomarcador preventivo auxilia na prevenção de uma doença. Este tipo de biomarcador é muito utilizado na prevenção de câncer (HE, 2015). Por exemplo, mutações no gene *breast cancer* 1 (BRCA 1) e *breast cancer* 2 (BRCA 2) têm maiores riscos para desenvolver câncer de mama hereditário, aumentando as chances em cerca de 56 a 87% (SRIVASTAVA *et al.*, 2001).

Os biomarcadores diagnósticos servem como indicativos clínicos para detectar e predeterminar a severidade de uma doença. Moléculas presentes em urina, sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, tecidos tumorais, fluidos pleural e sinovial podem ser usados como fonte para a detecção de biomarcadores (TOPALIAN *et al.*, 2012; JOANNA *et al.*, 2015). Um exemplo de biomarcadores diagnósticos são os anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (CCP), que são usados como diagnósticos de artrite reumatoide (SOUSLOVA *et al.*, 2013; HE, 2015).



Os biomarcadores prognósticos e preditivos são termos comumente usados quando relacionados a projetos de ensaios para biomarcadores. Estes estão relacionados a traços moleculares, celulares e genéticos de uma população específica. Os biomarcadores preditivos estão ligados à resposta dos fármacos, observando a resposta a tratamento específico. Por outro lado, os biomarcadores de diagnóstico são usados para aferir o estado da doença, prevendo o possível curso de uma doença (BUYSE *et al.*, 2010).

Dentre os biomarcadores de prognóstico, o *Mamma Print* é um teste que observa a atividade de 70 diferentes genes relacionados ao câncer de mama, detectando possíveis riscos de metástases (SLODKOWSKA & ROSS, 2009).

Os biomarcadores preditivos também são importantes no tratamento específico do câncer. O gene HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*), por exemplo, é usado como um marcador preditivo, tendo um papel importante na seleção da modalidade de um tratamento para o câncer de mama (DAVOLI *et al.*, 2010).

O plasma sanguíneo é um bom candidato para busca de biomarcadores proteicos, pois apresenta proteínas que circulam por todo organismo, refletindo o metabolismo sistêmico e o estado inflamatório (VAN DIJK *et al.*, 2010). Biomarcadores sanguíneos são utilizados como forma de diagnóstico para a doença de Parkinson, tendo a vantagem de ser menos invasivo, ocorrendo diversos avanços nos últimos anos (CHAHINE *et al.*, 2014). Baixos níveis de ácido úrico e ApoA (*Apolipoprotein A*) podem indicar um aumento no risco na doença de Parkinson. Baixos níveis plasmáticos do fator de crescimento epidérmico podem servir como um biomarcador para avaliar aumento no risco de comprometimentos cognitivos na doença de Parkinson. Biomarcadores pró-inflamatórios como PCR, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e IL6 estão claramente relacionados ao infarto do miocárdio (BOWRING *et al.*, 2008). A cistatina C,  $\beta$ 2-microglobulina e creatina são biomarcadores importantes para o risco de doenças das artérias periféricas (JOOSTEN *et al.*, 2014).

A saliva também é um bom fluido corporal para ser explorado como biomarcador proteico, pois é um fluido com fácil acesso, não demandando técnicas invasivas de coleta e, geralmente, bem aceita pelo paciente. Além disto, é um componente importante do sistema imune e pode ser uma fonte importante

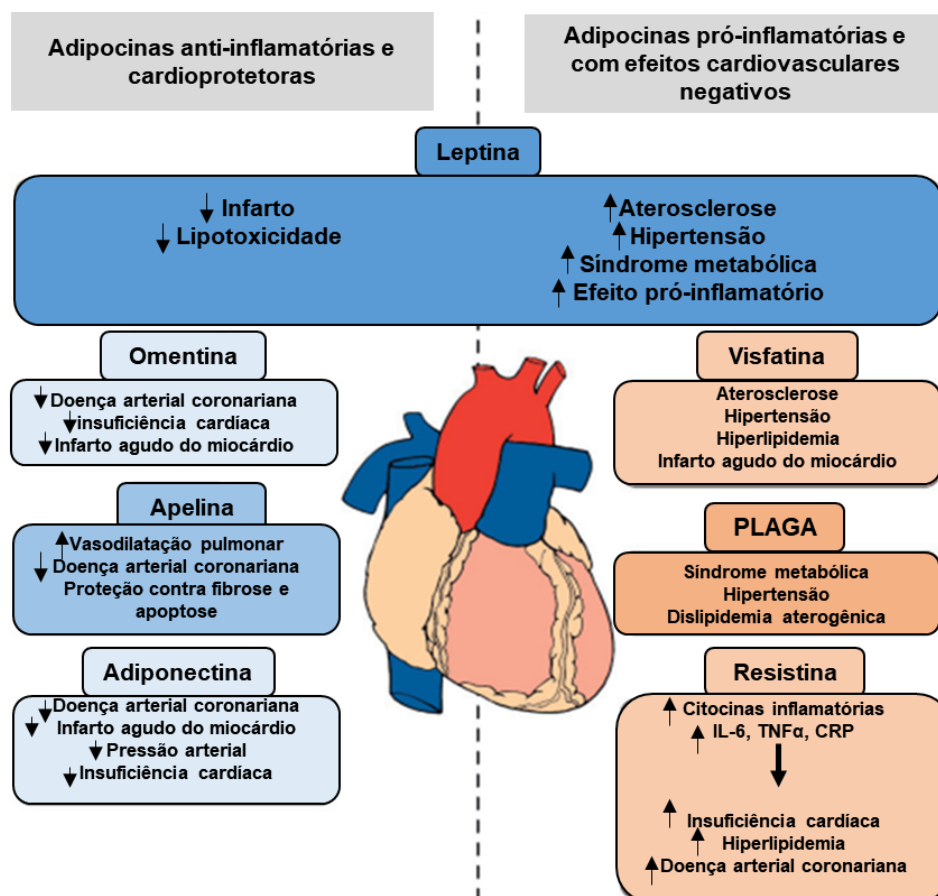
de biomarcadores, refletindo mudanças tanto na cavidade oral quanto na saúde geral (Wu *et al.*, 2009).

Biomarcadores salivares podem ser utilizados para o diagnóstico e prevenção de doenças periodontais. O IL-1 $\beta$ , por exemplo, é usado como marcador da resposta inflamatória. Os níveis combinados de metaloproteinase de matriz-8 (MMP-8), que degrada matriz colágena, e IL-1 $\beta$  aumentam o risco de doenças periodontais em até 45 vezes (KATHARIYA & PRADEEP, 2010). Biomarcadores salivares também podem ser utilizados para diagnosticar e prevenir doenças cardiovasculares, tais como mieloperoxidase (MPO), que combate infecções a partir de seu papel citotóxico, PCR e interleucinas, que são associados a infarto do miocárdio (FLORIANO *et al.*, 2009).

#### **2.4.2. Biomarcadores de Doenças Cardiovasculares**

As moléculas produzidas pelo tecido adiposo, as adipocinas, participam não só do metabolismo energético, mas também de uma grande quantidade de processos fisiológicos e patológicos (LAVIE *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2010). As alterações apresentadas na obesidade geram modificações morfológicas e funcionais significativas, podendo levar à insuficiência cardíaca (Figura 5) (GONÇALVES *et al.*, 2015).

**Figura 5.** Adipocinas e suas influências na proteção e patogênese do sistema cardiovascular.



Fonte: Adaptado de Smekal & Vaclavik, 2017.

As proteínas actinas, alfa actina de músculo cardíaco (ACTC1) e Actina de músculo liso aórtico (ACTA2) são relatadas como proteínas envolvidas em doenças cardiovasculares (CHENG *et al.*, 2017; BOUTILIER *et al.*, 2017). Ambas as proteínas foram relatadas na literatura possuindo mutações em seus genes, com a ACTA2 possuindo mais de 40 mutações (GUO *et al.*, 2007; REGLADO *et al.*, 2015). As mutações presentes na ACTC1 são relacionadas com o desenvolvimento de cardiomiopatia hipertrófica e cardiomiopatia inflamatória crônica, enquanto a ACTA2 está relacionada à doença arterial coronariana, aneurismas da aorta torácica, acidente vascular cerebral, juntamente com doença torácica da aorta (FRADE *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2017).

Estudos recentes apontam que concentrações elevadas de hemoglobina podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares e mortalidade (PANWAR *et al.*, 2016). No estudo de Kim e colaboradores em 2013 altos níveis de hemoglobina foram associados com maior incidência de doenças cardiovasculares, principalmente em homens. Os níveis de hemoglobina também mostraram uma correlação positiva entre o nível de IMC, glicemia de jejum, tabagismo, pressão arterial e colesterol total (KIM *et al.*, 2013)

As adipocinas liberadas pelo tecido adiposo têm a capacidade de penetrar nos vasos coronarianos (YUDKIN *et al.*, 2005). Além de atuar como uma fonte energética, o tecido adiposo possui efeitos protetores sobre os vasos e miocárdio, através da produção e secreção de vasodilatadores e adipocinas inotrópicas. Porém, com o aumento do tecido adiposo observado na obesidade, há um acréscimo na produção de mediadores pró-inflamatórios (IOZZO, 2011)

A leptina é uma proteína sintetizada principalmente pelas células adiposas em proporção com a quantidade de massa gordurosa (ESLER *et al.*, 1998). A leptina regula o apetite, através de um *feedback* negativo, evitando o ganho de peso (FRIEDMAN, 2000). No AVC a resistência à insulina pode desencadear alterações vasculares ateroscleróticas (WINDHAM, 2010). Um tratamento experimental, com o uso de leptina, foi utilizado em modelos animais, sendo realizada a adição de leptina intraperitoneal que diminuiu o volume de infarto após a oclusão da artéria cerebral média (ZHANG *et al.*, 2007).

A adiponectina é uma das adipocinas mais sintetizadas pelos adipócitos, e possui um papel fundamental na fisiologia vascular, modulando a interação entre as células musculares lisas, células endoteliais, plaquetas e leucócitos. Além disto, é importante para a homeostase vascular, protegendo de aterogênese e lesões vasculares (NISHIMURA *et al.*, 2008; VAIPOULOS *et al.*, 2012). Concentrações plasmáticas de adiponectina estão diminuídas em pacientes obesos, assim como em pacientes com doença arterial coronariana (KADOWAKI & YAMAUCHI, 2005; MATSUZAWA, 2007; HOPKINS *et al.*, 2007).

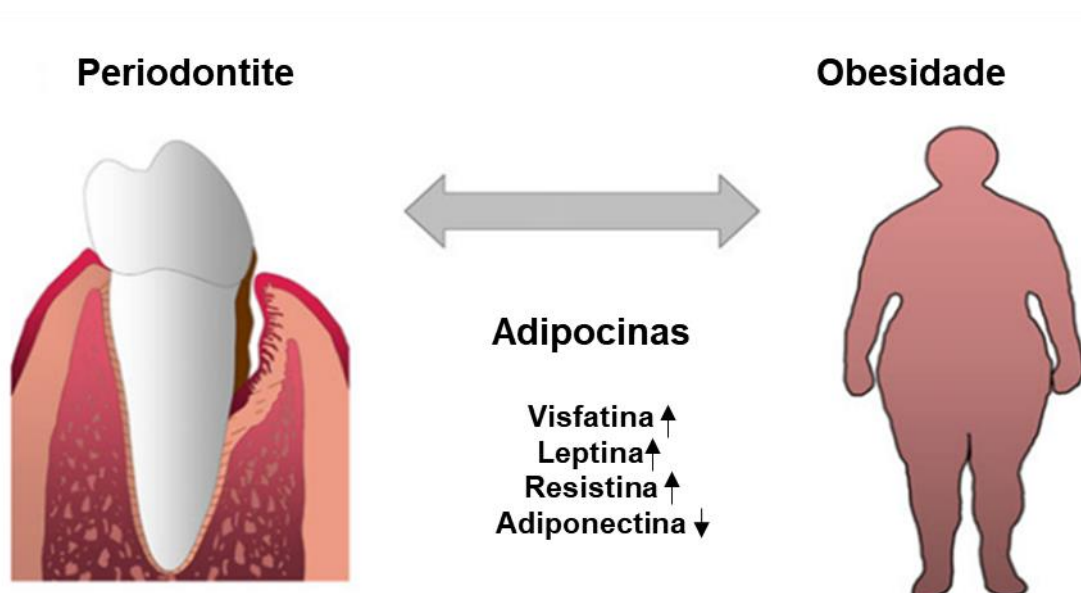
#### **2.4.3. Biomarcadores da Doença periodontal**

A doença periodontal é uma doença de característica inflamatória ocasionada pela presença de bactérias na placa dental que conseguem superar

as defesas imunológicas e provocar a doença. Na periodontite avançada, os níveis séricos de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, metaloproteinase de matriz (MMP) e TNF- $\alpha$  se mostram elevados (YUCEL-LINDBERG & BAGE, 2013).

Diversos estudos relacionaram a periodontite à obesidade, a qual vem aumentando nas últimas décadas (DESCHNER *et al.*, 2014). Perlstein e Bissada (1977) demonstraram, em um estudo com modelos animais, que o aumento de peso pode influenciar na gravidade da doença periodontal. Em 1998, Saito e colaboradores observaram, pela primeira vez, a relação entre periodontite e obesidade em seres humanos (Saito *et al.*, 1998). O aumento do tecido adiposo na obesidade eleva a síntese de adipocinas pró-inflamatórias e diminui a produção de adipocinas anti-inflamatórias (Figura 6). O desequilíbrio entre as adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, observado na obesidade, ocasiona um estado inflamatório de baixa intensidade, porém crônico (KRYSIK *et al.*, 2012)

**Figura 6.** Alterações nos níveis de adipocinas observadas em quadros de obesidade e periodontite.



Fonte: Adaptado de Deschner *et al.*, 2014

A visfatina é uma proteína produzida pelo tecido adiposo e por macrófagos, que possui a capacidade de estimulação de mediadores pró-

inflamatórios (MOSCHEN *et al.*, 2010). Valores elevados de visfatina foram observados em doenças inflamatórias, como DM2, aterosclerose, câncer, artrite e obesidade (CHANG *et al.*, 2011). Devido ao fato dos níveis de visfatina estarem aumentados na obesidade, estudos começaram a correlacionar essa adipocina com o aumento do risco de inflamação periodontal ou o comprometimento da saúde do periodontal de pacientes obesos. A visfatina também pode ser encontrada no fluido gengival (FG), no qual se encontra elevada em casos de gengivite e periodontite. No caso de avaliação após o tratamento periodontal, os níveis de visfatina diminuem no FG (PRADEEP *et al.*, 2011). Dessa forma, pode ser sugerido que a visfatina pode ser produzida no periodonto e ser regulada por processos inflamatórios, apresentando um papel na patogênese da periodontite (DESCHNER *et al.*, 2014).

Ao contrário da visfatina, a adiponectina possui níveis inferiores na obesidade, assim como na periodontite, sendo que após tratamento periodontal, seus níveis se elevam (WEYER *et al.*, 2001). A adiponectina apresenta funções metabólicas e imunes, dentre os quais, o estímulo à sensibilidade à insulina e a oxidação de ácidos graxos, além de seu envolvimento na diferenciação e proliferação celular (CARBONE *et al.*, 2012).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar o perfil do proteoma do plasma e da saliva de adultos jovens com obesidade e sobrepeso em comparação com indivíduos de peso normal, e verificar alterações nas proteínas apresentadas pelos grupos de estudo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar exames antropométricos e sanguíneos na população de estudo;
- Detectar proteínas distintas ou com expressão diferencial entre os proteomas de saliva e plasma.

- Caracterizar as proteínas presentes no plasma de adultos jovens com obesidade e sobrepeso e comparar com indivíduos de peso normal;
- Analisar de forma comparativa os proteomas da saliva de adultos jovens com peso normal, obesidade e sobrepeso

#### **4. Material e Métodos**

##### **4.1. Casuística**

A casuística foi constituída por indivíduos com sobrepeso, obesidade e normais, que foi selecionada por um período de 12 meses consecutivos. Os participantes são estudantes e/ ou funcionários da Unigranrio, que aceitarem o convite de participação voluntária, respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Os indivíduos selecionados foram informados sobre os detalhes do projeto e concordaram com a avaliação clínica, metabólica e molecular. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unigranrio, sob número 2.160.823 (documento em anexo).

Foram incluídos 18 indivíduos, categorizados de acordo com o IMC em magros ou com peso normal, com sobrepeso e obesos, constituindo, dessa forma, 3 grupos de avaliação.

##### **Critérios de inclusão**

Para participar do estudo, os indivíduos deveriam ter idade entre 18 e 35 anos,  $IMC \geq 18,5 \text{ kg/m}^2$  e  $\leq 24,9 \text{ kg/m}^2$  para peso normal;  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$  e  $\leq 29,9 \text{ kg/m}^2$  para o grupo com sobrepeso; e  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$  para o grupo obeso, além de apresentarem pelo menos 20 dentes.

##### **Critérios de exclusão**

Caso o voluntário apresentasse uma das seguintes condições, não era incluído no estudo: presença de intolerância à glicose ou DM2, hipertensão

arterial, hepatopatia, nefropatia, endocrinopatias, neoplasias e doenças cardiovasculares, autoimune, hematológica, psiquiátrica e inflamatória intestinal. Outros critérios de exclusão compreenderam: gestação e lactação, tabagismo, uso de fármacos que interferem com o peso corporal, metabolismo de carboidratos e lipídios e hipotensores. Uso de substâncias ilícitas. Necessitar de quimioprofilaxia para o atendimento odontológico ou ter feito uso de antimicrobianos nos últimos seis meses. Ou ter recebido tratamento periodontal no último ano. Além disto, não poderiam ser alunos do curso de odontologia.

#### **4.2. Dados anamnésicos**

Foram registrados em questionário anamnésico o gênero, a raça, a renda familiar, dados de saúde geral e odontológica.

#### **4.3. Avaliação Clínica**

##### **4.3.1. Exame intra-oral**

Os exames clínicos foram realizados por examinadores qualificados, e incluem registros dicotomizados da presença de biofilme dental supragengival, sangramento gengival; sangramento à sondagem e/ ou supuração à sondagem e mensuração da profundidade de sondagem (PS) e do nível clínico de inserção (NCI) em mm. O exame clínico foi iniciado pelo registro de presença de biofilme dental, que foi realizado através da visualização das superfícies dentárias após secas com jato de ar em campo sob isolamento relativo. A seguir, é feita a sondagem periodontal em seis sítios por elemento dentário com sonda periodontal milimetrada da Carolina do Norte (Hu-Friedy; Chicago). Os segundos sítios foram examinados: ângulo disto-vestibular, face vestibular, ângulo mésio-vestibular, ângulo mésio-palatino ou mésio-lingual, face palatina ou lingual e ângulo disto-palatino ou disto-lingual. Durante a sondagem periodontal foram registrados a PS e o NCI simultaneamente. Os terceiros molares não foram incluídos da avaliação clínica.

##### **4.3.2 Exame antropométrico**



**a) IMC**

Os indivíduos foram pesados e medidos em uma mesma balança com estadiômetro (balança antropométrica mecânica, Mod. 104A, Balmak). Esta balança é capaz de mensurar até 300 Kg e seu estadiômetro possui régua antropométrica retrátil, medindo até 2 m com graduação de 0,5 cm. Portanto, o peso foi registrado em kg e a altura em cm. Para a realização destas avaliações, os participantes estavam trajando roupas leves, descalços, sem acessórios ou bolsas e com os bolsos vazios. Ao subir na balança, o indivíduo distribui o peso em ambos os pés e olha para a linha do horizonte. O IMC foi calculado através da divisão do peso (em kg) pela altura ao quadrado (em m<sup>2</sup>).

**b) Circunferência da cintura (CC) e do quadril (CQ)**

Estas aferições foram realizadas com fita métrica metálica, graduada em centímetros, com o paciente em pé. A CC e a CQ são medidas, respectivamente, no ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal e na maior circunferência posterior das nádegas. A relação cintura-quadril (RCQ) foi obtida com a divisão da CC pela CQ.

**4.4 Aferição da pressão arterial**

A pressão arterial (PA) foi aferida por método oscilométrico, utilizando-se um monitor automático da marca OMRON. Os manguitos possuem tamanho apropriado ao braço dos participantes e os registros são feitos com o indivíduo sentado. Após 5 min de repouso, são realizadas três medidas sequenciais, com intervalos de 3 min, com vistas ao cálculo da média dos níveis pressóricos. São descartados valores que apresentam diferenças acima de 10 mmHg na PA sistólica e 5 mmHg na PA diastólica.

#### 4.5 Análises laboratoriais

Amostras de sangue foram coletadas após 12 h de jejum e alíquotas de plasma e soro foram estocadas a -20°C ou -80°C, conforme apropriado ao método.

##### a) Glicemia de jejum

A glicemia de jejum foi obtida pelo método enzimático (hexoquinase). Neste método foram utilizados tubos sem anticoagulantes, nos quais as amostras foram centrifugadas imediatamente após a coleta. Os valores são expressos em mg/dl.

##### b) Insulina

A insulina foi determinada por ELISA (Enzo Life Sciences), e seu valores expressos em  $\mu\text{U/ml}$ .

##### c) Índice de resistência à insulina

Para o estabelecimento do Índice de resistência à insulina, foi aplicada a fórmula do HOMA-IR (*homeostasis model assessment – insulin resistance*), em que a resistência foi determinada pelo produto da insulinemia ( $\mu\text{U/ml}$ ) e glicemia de jejum (mmol/l), dividido por 22,5. Esse índice possui alta correlação com o *clamp* euglicêmico/ hiperinsulinêmico. A resistência insulínica foi definida por um HOMA-IR  $\geq 2,71$ , de acordo com o observado em amostra da população brasileira de origem multiétnica.

##### d) Perfil lipídico

Colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C), e triglicerídeos (TG) foram determinados por método enzimático-colorimétrico. O LDL-C foi estimado pela fórmula de Friedwald para valores de TG inferiores a 400 mg/dl:  $(\text{CT} - \text{HDL-C} + \text{TG} / 5)$ . Os valores são expressos em mg/dl.

## 4.6 Análise proteômica

### a) Extração das proteínas da saliva

A saliva foi coletada como descrito por Gonçalves e colaboradores (2010), na parte da manhã e com o voluntário em jejum de 12 horas e sem consumir nenhum líquido por um período de 1 hora antes da coleta. Foram utilizados dois mL de água Milli-Q pelos participantes para que bochechassem por 5 min e depois cuspissem em um pote coletor universal estéril. Em seguida, a amostra foi homogeneizada com 1 mM de *fenilmetilsulfonil fluoride* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 mM de *ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA; Sigma-Aldrich). As amostras foram mantidas em gelo e rapidamente centrifugadas a 13.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e misturado com 1 mM de *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich).

O sobrenadante da saliva foi submetido à precipitação com TCA 20%, segundo SANTOS e colaboradores, 2011. As proteínas foram recuperadas pela adição de 300 µL de Bicarbonato de Amônia (50mM). Todo material biológico foi armazenado a -80°C.

### b) Extração das proteínas do plasma

As amostras de sangue (5 ml) foram coletadas por via intravenosa com o voluntário em jejum de 12 horas e armazenadas em tubos contendo EDTA com anticoagulante. O plasma foi separado por centrifugação a 4.500 rpm por 10 min a 25°C, e, após, foi transferido para tubos de 1,5 ml e homogeneizados com 1 mM *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich), sendo preservados a -80°C até o processamento. As amostras de plasma foram enriquecidas por depleção de

albumina, com o uso de colunas ProteoPrep Blue Albumin & IgG Depletion Kit (Sigma-Aldrich), utilizando 50 µl de plasma.

### **c) Caracterização das proteínas**

As concentrações das proteínas de saliva e plasma foram mensuradas com o uso do reagente de Brarford. Foi utilizado 158 µl de água Milli-Q, junto de 40 µl de reagente Bradford e 2 µl de amostra. As reações foram incubadas por 5 minutos em uma placa de Elisa e foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro com a absorvância de 595 nm (BRADFORD, 1976).

### **d) Análise por espectrometria de massa (LC-ESI-MS/TOF)**

Para cada amostra, o extrato total de proteínas foi analisado e caracterizado em conjunto por espectrometria de massas (MS). Cada mistura complexa de proteínas de saliva ou de plasma foi submetida à digestão com tripsina (método *shotgun*). Foi utilizado o protocolo do Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) para a digestão das proteínas por tripsina (CARNIELLI *et.al.*, 2018).

As amostras foram tratadas com 8 M de ureia, seguida de redução proteica com ditioneitol (5 mM por 25 min a 56 ° C) e alquilação com iodoacetamida (14 mM por 30 min à temperatura ambiente no escuro). Para a digestão de proteínas, a ureia foi diluída até uma concentração final de 1,6 M com bicarbonato de amônio 50 mM e 1 mM de cloreto de cálcio foi adicionado às amostras para digestão com tripsina por 16 h a 37 ° C (25 µg de tripsina). A reação foi extinta com ácido fórmico a 0,4%.

Como forma de se observar as modificações nas concentrações das proteínas, foram preparados 3 *pools* com as amostras coletadas: normal; sobrepeso e obeso. Cada pool contém amostras com a mesma concentração dos 6 voluntários de cada grupo.

Os peptidomas foram analisados por injeção direta no espectrômetro de massas para avaliação comparativa dos perfis de massas dos peptídeos presentes no plasma e na saliva. A análise por espectrometria de massa (MS) foi realizada usando uma coluna capilar de cromatografia líquida de alto desempenho (Nano-UPLC) de fase reversa.

As amostras de saliva foram analisadas no Sistema de Espectrometria de Massas ESI/MALDI-QTOF, em parceria com o Laboratório de Macromoléculas na Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (DIMAV)-Inmetro. Para corrida de MS, foi realizado uma primeira aplicação das amostras cada uma com 1 microlitro ( $\mu$ l). Após a primeira aplicação todas as amostras foram normalizadas. A normalização é um processo que permite equiparar as abundâncias das proteínas, mesmo com as diferenças de concentração das proteínas em cada amostra. O processo de normalização equiparou a concentração de todas as amostras com a amostra de menor concentração. Isso nos permitiu realizar não só uma identificação mais fidedigna como avaliar melhor as modificações nos valores de concentrações das proteínas de uma amostra para outra. Após a normalização as amostras foram aplicadas 3 vezes no espectrômetro.

#### **4.7 Análise dos dados/ estatística**

A análise dos dados foi realizada com o emprego do programa estatístico IBM SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”), versão 20.0. A frequência de sítios com sangramento e com biofilme, assim como a média da PS e NCI, foram calculadas para cada paciente, e, posteriormente, para cada um dos grupos estudados (grupos: normal, com sobrepeso e obeso). Os parâmetros PS e NCI foram categorizados em níveis rasos (0 – 3 mm), médios (4 – 6 mm) e profundos ( $\geq 7$  mm), e a média de suas frequências calculadas para cada paciente e nos grupos. Foram também calculadas a média de idade e a frequência das raças, do sexo, e dos níveis socioeconômicos nos grupos estudados. Diferenças significativas foram avaliadas pelos testes Kruskal-Wallis e Qui-quadrado.

Os dados obtidos com MS/ MS foram pesquisados no banco de dados de proteínas humanas no UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>), através da ferramenta Progenesis (Waters), utilizada no Inmetro, e Scaffold, usada no LNBio, para identificar e caracterizar as proteínas de cada amostra e detectar variações nos proteomas. As análises qualitativas das amostras salivares foram realizadas manualmente no programa Excel, já que não era possível fazer essa análise no programa Progenesis. Além dessas análises foi realizado o diagrama de venn ([bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/)) para organizar as proteínas identificadas.

Qualquer peptídeo não-tríptico, passando do critério do filtro, foi descartado, porque foi demonstrado que a maioria destas identificações de peptídeos é incorreta (Elias, *et al.*, 2005). Finalmente, apenas as proteínas para as quais um ou dois peptídeos únicos forem identificadas foram relatadas ao final deste estudo. O nível de significância foi estabelecido a 5%.

## 5. Resultados

### 5.1. Descrição da amostra

As variáveis demográficas dos grupos peso normal ( $n = 6$ ), sobrepeso ( $n = 6$ ) e obeso ( $n = 6$ ) estão apresentadas na Tabela 2. A idade média dos participantes foi de 24 anos ( $\pm 4,29$ ), sendo o grupo obeso com uma média de idade significativamente ( $p < 0,05$ ; teste Kruskal-Wallis) maior ( $28 \pm 3,2$ ) que os outros grupos. A maioria dos voluntários foi constituída de mulheres, totalizando 15 voluntários.

**Tabela 2.** Dados demográficos da população estudada.

| Variáveis                | Normal<br>(n=6)   | Sobrepeso<br>(n=6) | Obeso<br>(n=6) | Todos<br>(n=18)   | Valor<br>de $p^*$      |
|--------------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------------|------------------------|
| Idade média ( $\pm dp$ ) | 21,6 $\pm$<br>1,6 | 25 $\pm$ 5         | 28 $\pm$ 3,2   | 24,8 $\pm$<br>4,2 | <<br>0,05 <sup>†</sup> |
| Gênero (% Mulheres)      | 100               | 100                | 50,0           | 77,7              | <<br>0,05*             |
| Gênero (% Homens)        | 0                 | 0                  | 50,0           | 22,3              | NS                     |

|                              |       |       |      |      |    |
|------------------------------|-------|-------|------|------|----|
| <b>Raça%</b>                 |       |       |      |      |    |
| Branca                       | 33,3  | 16,7  | 83,3 | 44,4 | NS |
| Parda                        | 50    | 66,6  | 0    | 38,8 | NS |
| Preta                        | 16,6  | 16,7  | 16,6 | 16,6 | NS |
| <b>Ocupação (%)</b>          |       |       |      |      |    |
| Estudante                    | 100,0 | 75,0  | 50,0 | 78,6 | NS |
| Funcionário                  | 0     | 25,0  | 25,0 | 14,3 | NS |
| Estudante/<br>Funcionário    | 0     | 0     | 25,0 | 7,1  | NS |
| <b>Nível Educacional (%)</b> |       |       |      |      |    |
| Médio completo               | 50,0  | 100,0 | 25,0 | 57,1 | NS |
| Superior completo            | 50,0  | 0     | 75,5 | 42,9 | NS |

\*Teste do Qui-quadrado; †Teste Kruskal-Wallis; NS: Não significativa; dp: desvio-padrão.

## 5.2. Dados Antropométricos

Os dados de IMC, altura, peso, circunferência de cintura, circunferência de quadril e relação cintura quadril são apresentados na Tabela 3. Como esperado, houve diferença estatística para todas as variáveis antropométricas, com exceção da altura, entre os grupos avaliados.

**Tabela 3.** Dados antropométricos dos grupos estudados.

| Parâmetros               | Normal<br>(n = 6) | Sobrepeso<br>(n = 6) | Obeso<br>(n = 6) | Total<br>(n = 18) | Valor<br>de p* |
|--------------------------|-------------------|----------------------|------------------|-------------------|----------------|
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) | 21,4 ± 2,5        | 27,4 ± 0,26          | 35,6 ± 3,1       | 28,1 ± 6,3        | <<br>0,001     |
| Altura (m)               | 1,61 ± 10,3       | 1,6 ± 10             | 1,67 ± 7         | 1,62 ± 9          | NS             |
| Peso (Kg)                | 55,6 ± 8,3        | 68,3 ± 12,3          | 97,8 ±<br>14,6   | 74,1 ± 21         | 0,002          |
| CC (cm)                  | 69,4 ± 8,1        | 80,1 ± 5,2           | 101 ± 6,7        | 83,6 ± 13         | <0,001         |
| CQ (cm)                  | 90,3 ± 6,1        | 99,5 ± 3,0           | 114,1 ±<br>7,7   | 101,8 ± 11,5      | <0,001         |

|     |             |             |            |            |        |
|-----|-------------|-------------|------------|------------|--------|
| RCQ | 0,75 ± 0,04 | 0,80 ± 0,04 | 0,89 ± 0,1 | 0,81 ± 0,1 | <0,008 |
|-----|-------------|-------------|------------|------------|--------|

\*Teste Kruskal-Wallis; NS: Não significativa; CC: circunferência de cintura; CQ: circunferência de quadril; RCQ: relação cintura-quadril.

### 5.3. Diagnóstico periodontal

Os dados da avaliação periodontal estão apresentados na Tabela 4. Os dados clínicos médios dos grupos não diferiram significativamente. Os percentuais de cálculo dental variam entre mais ou menos 4,8% e 8,2%, enquanto os de biofilme dental variam entre 10,9% e 16,4%. Os percentuais de sangramento gengival demonstraram uma tendência a ser menor em indivíduos do grupo peso normal, de valor intermediário no grupo sobrepeso e maior no grupo obeso. O mesmo pode ser observado para o sangramento à sondagem, para o qual os valores dos grupos normal e sobrepeso foram relativamente menores do que no grupo obeso. Nenhum participante apresentou supuração à sondagem (dado não mostrado).

A Figura 7 apresenta a distribuição do diagnóstico periodontal de acordo com os grupos avaliados. Ao todo, 33,3% dos voluntários apresentaram gengivite.

**Tabela 4.** Dados clínicos periodontais da população estudada de acordo com o grupo.

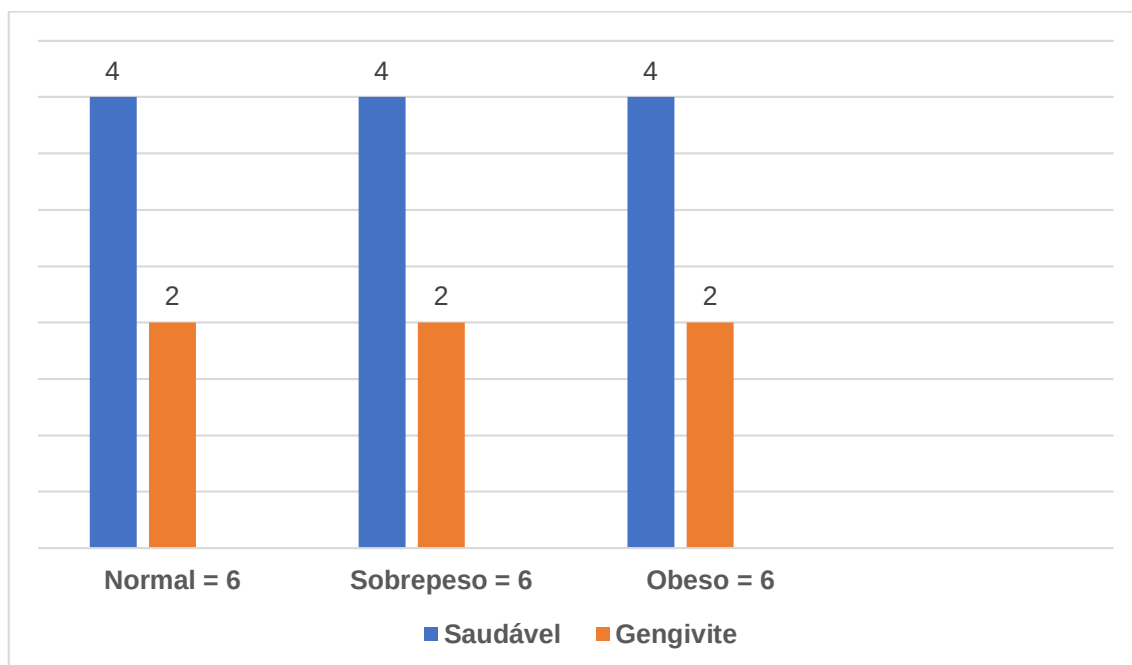
| Variáveis                     | Normal<br>(n = 6) | Sobrepeso<br>(n = 6) | Obeso<br>(n = 6) | Valor<br>de p* |
|-------------------------------|-------------------|----------------------|------------------|----------------|
| Cálculo dental (%)            | 7,7 ± 5,4         | 4,8 ± 4,1            | 8,2 ± 7,7        | NS             |
| Biofilme (%)                  | 10,9 ± 9,8        | 16,4 ± 15,9          | 14,5 ± 15,1      | NS             |
| Sangramento gengival<br>(%)   | 13,2 ± 14,9       | 21,8 ± 20,2          | 45,1 ± 36,1      | NS             |
| Sangramento à<br>sondagem (%) | 20,1 ± 11,5       | 21,3 ± 18,3          | 35,7 ± 30,2      | NS             |
| Média PS (mm)                 | 2 ± 0             | 2,3 ± 0,8            | 2,3 ± 0,5        | NS             |



|                |           |               |               |    |
|----------------|-----------|---------------|---------------|----|
| Média NCI (mm) | $2 \pm 0$ | $2,5 \pm 0,5$ | $2,3 \pm 0,5$ | NS |
|----------------|-----------|---------------|---------------|----|

\*Teste Kruskal-Wallis. NS: não significante

**Figura 7.** Diagnóstico periodontal de acordo com os grupos do estudados.



#### 5.4 Dados sanguíneos

As amostras sanguíneas foram utilizadas para a realização da identificação das proteínas e para a avaliação da saúde dos participantes Tabela 5. Os valores de de pressão sistólica e diastólica foram significativos entre os grupos. Os demais valores apresentados como LDL e HDL não apresentaram diferença significativa entre os grupos, esse resultado possivelmente está relacionado a diferença dos parâmetros entre os voluntários de cada grupo, aumentando o desvio padrão e diminuindo a diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 5.** Dados do exame sanguíneo e pressão arterial dos grupos estudados

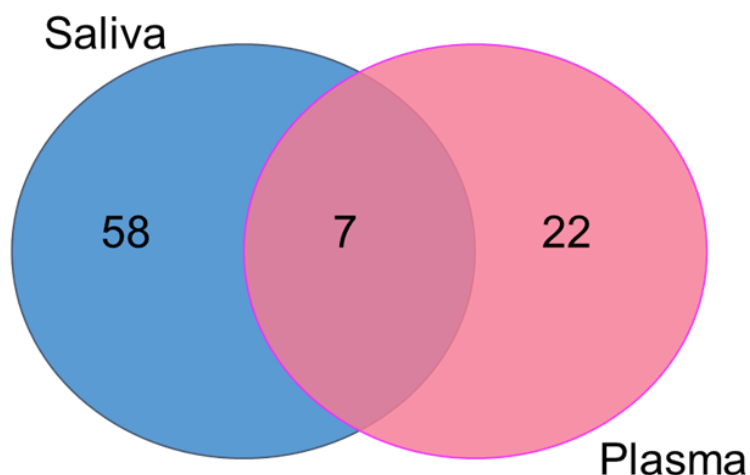
| Variáveis                | Grupos      |              |              | Valor de P |
|--------------------------|-------------|--------------|--------------|------------|
|                          | Normal      | Sobrepeso    | Obeso        |            |
| Colesterol Total mg/dl   | 159 ± 21,1  | 177,8 ± 35,2 | 187,1 ± 40   | NS         |
| HDL mg/dl                | 59 ± 11,9   | 53,8 ± 10,7  | 46,5 ± 6,3   | NS         |
| Triglicerídeos mg/dl     | 79,6 ± 26,4 | 121,5 ± 85,7 | 105,5 ± 65,4 | NS         |
| LDL mg/dl                | 84 ± 11,8   | 99,7 ± 30    | 119,5 ± 34,7 | NS         |
| Glicose mg/dl            | 91,6 ± 13,9 | 86,1 ± 5,5   | 92 ± 4,8     | NS         |
| Insulina mcUI/ml         | 9,2 ± 4,1   | 10,2 ± 3,6   | 11,2 ± 8,3   | NS         |
| HOMAIR                   | 2,1 ± 1,1   | 2,1 ± 0,7    | 2,6 ± 2,1    | NS         |
| Pressão Sistólica mmHg   | 100,8 ± 5,4 | 114,8 ± 11,5 | 125 ± 7,2    | 0,004      |
| Pressão Disastólica mmHg | 64,8 ± 5,7  | 74,8 ± 7,1   | 81,3 ± 4,5   | 0,004      |

### 5.5. Identificação das proteínas

Foram identificados um total de 65 proteínas salivares e 29 plasmáticas, das quais 7 proteínas são comuns aos dois fluidos (Figura 8), 58 exclusivamente identificadas na saliva e 22 no plasma. Dentre as proteínas comuns, estão as proteínas: hemoglobina subunidade alfa e beta; serotransferrina; albumina;

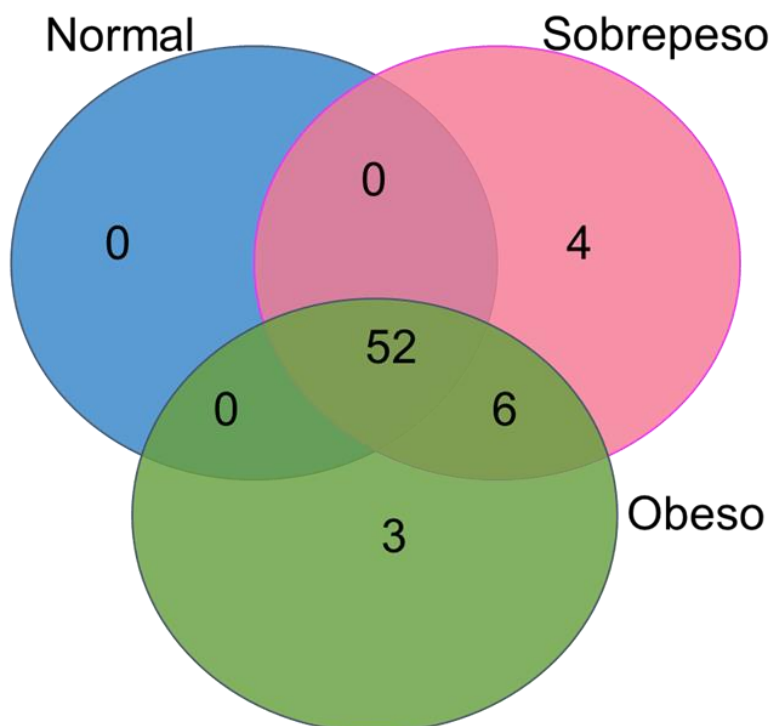
Imunoglobulina pesada constante gama 2, imunoglobulina lambda constante 2 e Imunoglobulina pesada constante alfa 1.

**Figura 8.** Proteínas salivares e plasmáticas identificadas na espectrometria de massas.



A partir da identificação das proteínas, foram realizadas comparações manuais entre os grupos para observar as mudanças qualitativas entre os dados proteicos. Das 65 proteínas salivares encontradas, 52 eram comuns aos três grupos de estudo (Figura 9). Interessantemente, 3 proteínas foram exclusivamente encontradas em obesos - Proteína semelhante a beta-actina 2; hemoglobina subunidade beta; hemoglobina subunidade alfa; 4 em sobrepeso - Calicreína-1; POTE membro da família de domínio ankyrin E; Membro da família do domínio ankyrin POTE I; POTE ankyrin membro da família de domínio F; e 6 compartilhadas entre o grupo dos obesos e sobrepesos, actina de músculo liso aórtico, actina de músculo cardíaco alfa 1, actina de músculo liso gama-entérico, proteína 1 rica em prolina salivar básica, membro 1 da família B com dobra BPI e membro 2 da família A com dobra BPI

**Figura 9.** Distribuição quantitativa das proteínas identificadas de acordo com o grupo.



Na Tabela 6 estão apresentadas as proteínas salivares identificadas. A superexpressão e subexpressão das proteínas foram avaliadas na comparação entre os grupos, dois a dois, com o uso dos programas de análise de dados de MS. As comparações realizadas foram: normal vs sobrepeso; normal vs obeso e sobrepeso vs obeso.

A maior parte das proteínas identificadas são relacionadas com resposta imune ou com outras funções não relacionadas ao sistema imune. Algumas proteínas apresentaram diferente expressão em comparação ao grupo Normal, tais como Lipocalina-1 e a Zinco-alfa-2-glicoproteína. Como exemplo, a proteína de transporte 1 semelhante a TOM1 estava significativamente superexpressa no grupo Sobrepeso e Obeso em relação ao grupo Normal, sendo a abundância relativa dessa proteína em obesos significativamente maior que no grupo sobrepeso. Além disso, houve proteínas exclusivas do grupo Sobrepeso e Obeso, como Membro 1 da família B com dobra BPI e Membro 2 da família A com dobra BPI.

**Tabela 6.** Proteínas salivares identificadas e apresentadas de acordo com superexpressão (↑) ou subexpressão (↓) na comparação entre os grupos.

| Acesso                | Proteína                            | Sobrepeso<br>/Normal | Valor de p | Obeso/<br>Normal | Valor de p | Obeso/<br>Sobrepeso | Valor de p |
|-----------------------|-------------------------------------|----------------------|------------|------------------|------------|---------------------|------------|
| <b>Transporte</b>     |                                     |                      |            |                  |            |                     |            |
| P31025                | Lipocalina-1                        | NS                   | NS         | 1,38↑            | 4,00E-03   | 1,23↓               | 4,00E-03   |
| P25311                | Zinco-alfa-2-glicoproteína          | ↑1,15                | 1,00E-03   | NS               | NS         | NS                  | NS         |
| P02787                | Serotransferrina                    | ↓1,29                | 1,00E-03   | 1,23↓            | 1,00E-03   | NS                  | NS         |
| O75674                | Proteína 1 semelhante a TOM1        | ↑1,68                | 3,00E-03   | 2,27↑            | 6,00E-04   | 1,35↑               | 1,00E-03   |
| P23280                | Anidrase carbônica 6                | ↑1,43                | 2,00E-04   | 1,50↑            | 6,00E-04   | 1,05↑               | 0.02       |
| <b>Resposta imune</b> |                                     |                      |            |                  |            |                     |            |
| P01857                | Imunoglobulina cadeia pesada gama 1 | ↑1,27                | 0.01       | NS               | NS         | 1,38↓               | 3,00E-04   |
| P0DOY-2               | Imunoglobulina cadeia lambda 2      | ↑1,58                | 2,00E-05   | 1,10↑            | 0.01       | 1,43↓               | 8,00E-06   |
| P02788                | Lactotransferrina                   | ↑1,17                | 0.03       | 1,23↓            | 0.01       | 1,43↓               | 2,00E-05   |
| Q8TAX7                | Mucina-7                            | ↓1,42                | 1,00E-03   | NS               | NS         | 1,34↑               | 4,00E-03   |

|        |                                                  |       |          |       |          |       |          |
|--------|--------------------------------------------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|
| P22079 | Lactoperoxidase                                  | ↑1,37 | 2,00E-03 | 1,53↑ | 8,00E-04 | 1,11↑ | 1,00E-03 |
| Q8N4F0 | Membro 2 da família B com dobra BPI              | ↑1,48 | 5,00E-04 | 1,77↑ | 4,00E-04 | 1,20↑ | 8,00E-03 |
| P05109 | Proteína S100-A8                                 | NS    | NS       | 1,09↓ | 0.04     | NS    | NS       |
| P06702 | Proteína S100-A9                                 | NS    | NS       | 1,20↓ | 0.01     | 1,26↓ | 1,00E-04 |
| P61626 | Lisozima C                                       | ↑1,41 | 2,00E-03 | 2.87↑ | 5,00E-05 | 2,05↑ | 6,00E-05 |
| P04083 | Anexina A1                                       | ↑1,79 | 2,00E-05 | 1,02↑ | NS       | 1,75↓ | 1,00E-09 |
| P02808 | Staterina                                        | ↑1,87 | 2,00E-03 | 2,71↓ | 5,00E-03 | 1,45↑ | NS       |
| P01876 | Imunoglobulina cadeia pesada alfa 1              | ↑1,74 | 4,00E-07 | NS    | NS       | 1,74↓ | 3,00E-05 |
| P01877 | Imunoglobulina cadeia pesada alfa 2              | ↑1,83 | 2,00E-05 | 1,19↑ | 5,00E-03 | 1,53↓ | 5,00E-05 |
| P04406 | Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato         | ↓1,34 | 2,00E-03 | 1,38↓ | 3,00E-04 | 1,03↓ | NS       |
| P59665 | Defensina de Neutrófilo 1                        | ↑1,48 | 1,60E-02 | ↓1,43 | 2,10E-03 | ↓2,12 | 2,80E-03 |
| Q9UGM3 | Proteína apagada em tumores cerebrais malignos 1 | NS    | NS       | ↓1,28 | 1,30E-02 | NS    | NS       |
| Q8TDL5 | Membro 1 da familia B com dobra BPI              | SO    | -        | OB    | -        | SO/OB | NS       |

| Q96DR                                      | Membro 2 da família A com dobra                   | SO    | -        | OB    | -        | SO/OB | -        |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|
| 5                                          | BPI                                               |       |          |       |          |       |          |
| P01591                                     | Imunoglobulina cadeia J                           | ↑1,27 | 2,00E-04 | NS    | NS       | 1,28↓ | 3,00E-05 |
| B9A064                                     | Polipeptídeo 5 semelhante a imunoglobulina lambda | ↑1,71 | 7,00E-06 | 1,06↑ | 0.03     | 1,61↓ | 1,00E-06 |
| P01859                                     | Imunoglobulina cadeia pesada gama 2               | ↑1,76 | 4,00E-04 | 1,63↓ | 3,00E-04 | 2,86↓ | 1,00E-04 |
| P15515                                     | Histatina-1                                       | ↑1,70 | 6,00E-04 | 2,07↑ | 4,00E-03 | NS    | NS       |
| <b>Glicolise</b>                           |                                                   |       |          |       |          |       |          |
| P06733                                     | Alfa enolase                                      | ↓1,36 | 1,00E-04 | 2,13↓ | 4,00E-06 | 1,57↓ | 3,00E-05 |
| <b>Processo metabólico</b>                 |                                                   |       |          |       |          |       |          |
| P02768                                     | Albumina sérica                                   | ↑1,16 | 1,00E-03 | 1,20↑ | 1,00E-03 | NS    | NS       |
| <b>Processo metabólico de carboidratos</b> |                                                   |       |          |       |          |       |          |
| P04745                                     | Alfa amilase 1                                    | ↓2,06 | 3,00E-07 | 1,34↑ | 8,00E-03 | 2,76↑ | 7,00E-05 |
| P19961                                     | Alfa amilase 2B                                   | ↓1,39 | 2,00E-03 | 1,68↑ | 5,00E-04 | 2,33↑ | 5,00E-06 |
| <b>Protease inhibitor</b>                  |                                                   |       |          |       |          |       |          |
| P01036                                     | Cistatina-S                                       | ↑1,37 | 2,00E-03 | 1,32↓ | 8,00E-03 | 1,81↓ | 1,00E-04 |
| P01037                                     | Cistatina-SN                                      | ↑1,68 | 1,00E-04 | NS    | NS       | 1,68↓ | 1,00E-04 |
| P01034                                     | Cistatina-C                                       | ↑1,63 | 2,00E-03 | 1,63↑ | 1,00E-03 | 1,00↓ | NS       |
| P28325                                     | Cistatina-D                                       | ↑2,86 | 1,00E-04 | 2,71↑ | 2,00E-04 | NS    | NS       |





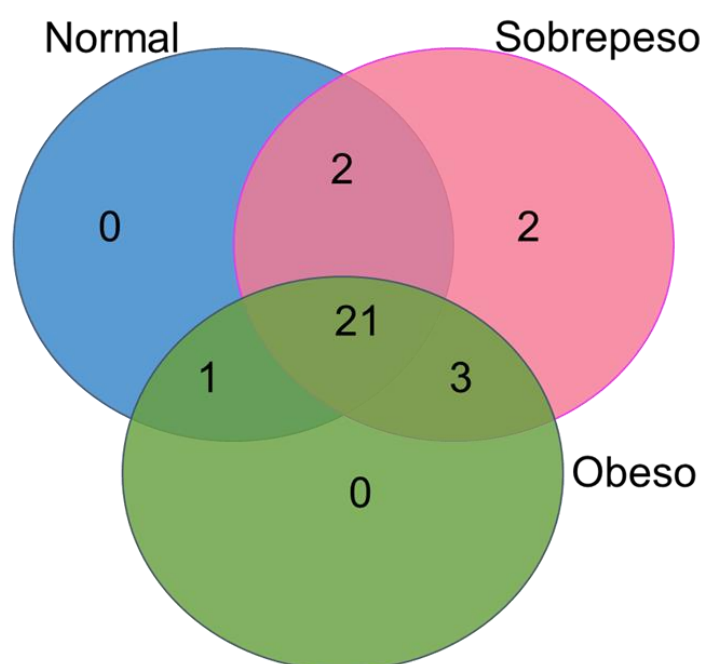
|            |                                                                                   |       |          |    |    |       |          |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|----------|----|----|-------|----------|
| P82970     | Proteína 5 contendo domínio de ligação ao nucleossomo do grupo de alta mobilidade | ↑1,24 | 0.03     | NS | NS | 1,25↓ | 0.03     |
| Q6S8J3     | Membro E da família de domínio POTE ankirina                                      | SO    | -        | -  | -  | SO    | -        |
| P0CG3<br>8 | Membro I da família de domínio POTE ankirina                                      | SO    | -        | -  | -  | SO    | -        |
| A5A3E0     | Membro F da família de domínio POTE ankirina                                      | SO    | -        | -  | -  | SO    | -        |
| P62736     | Actina de músculo liso aórtico                                                    | SO    | -        | OB | -  | SO-OB | -        |
| P68032     | Actina de músculo cardíaco alfa 1                                                 | SO    | -        | OB | -  | SO-OB | -        |
| P63267     | Actina de músculo liso gama-entérico                                              | SO    | -        | OB | -  | SO-OB | -        |
| P63261     | Actina_ citoplasmática 2                                                          | ↑1,17 | 0.01     | NS | NS | 1,20↓ | 0.01     |
| Q9HC8<br>4 | Mucina 5B                                                                         | ↑1,83 | 1,40E-02 | NS | NS | ↓1,64 | 2,00E-02 |
| P07737     | Profilin-1                                                                        | NS    | NS       | NS | NS | 1,44↓ | 4,00E-04 |
| Q96DA<br>0 | Proteína 16 granular de Zimogen homóloga B                                        | NS    | NS       | NS | NS | 1,44↑ | 4,00E-05 |

|            |                                                               |       |          |       |           |       |          |
|------------|---------------------------------------------------------------|-------|----------|-------|-----------|-------|----------|
| Q5VSP<br>4 | Proteína 1 tipo lipocalina 1, putativa                        | NS    | NS       | 1,46↑ | 7.09e-003 | 1,45↑ | 6,00E-03 |
| Q8WXA<br>9 | Proteína 1 reguladora de splicing<br>rica em glutamina/lisina | NS    | NS       | NS    | NS        | 1,12↓ | 0.02     |
| P18615     | Fator de alongamento negativo E                               | ↑1,37 | 1,00E-03 | 1,06↑ | NS        | 1,30↓ | 0.03     |
| Q6P5S2     | Homólogo de Proteína LEG1                                     | ↑2,45 | 9,00E-05 | 2,36↑ | 8,00E-04  | 1,04↓ | NS       |
| Q9BUR<br>4 | Proteína 1 do corpo da telomerase<br>cajal                    | ↓1,37 | 1,00E-04 | 1,43↓ | 1,00E-04  | 1,04↓ | NS       |
| Q14508     | Proteína 2 do domínio central de<br>quatro dissulfuretos WAP  | ↓1,10 | 0.03     | 1,59↓ | 4,00E-04  | 1,45↓ | 7,00E-04 |
| P54725     | Proteína de reparo por excisão UV<br>RAD23, homólogo A        | ↑9,57 | 1,00E-05 | 4,62↑ | 4,00E-05  | 2,07↓ | 1,00E-05 |
| P07098     | Triacilglicerol gástrico lipase                               | ↑1,57 | 1,00E-04 | 2,32↑ | 4,00E-04  | 1,48↑ | 6,00E-03 |

Legenda: NS: não significativa; - : proteínas exclusivas onde não houve comparação NO: normal; SO: sobrepeso; OB: obeso; (↑): hiperexpressão; (↓): hipoexpressão.

No plasma, foram identificadas 29 proteínas. Dessas, 21 foram encontradas em todos os grupos (Figura 10). Entre os grupos normal e obesos, somente 1 proteína foi compartilhada, enquanto que Normal com Sobrepeso, foram 2 proteínas. Os grupos Sobrepeso e Obeso compartilharam 3 proteínas. O grupo Sobrepeso ainda apresentou 2 proteínas exclusivas.

**Figura 10.** Distribuição das proteínas plasmáticas de acordo com os grupos estudados.



Na Tabela 7 estão apresentadas as proteínas plasmáticas identificadas. As mesmas comparações foram realizadas, assim como com as identificações de saliva, para detecção de quais proteínas foram quantificadas como mais ou menos abundantes em cada condição.

A proteína de transporte Serotransferrina está relacionada ao risco de doença cardíaca reumática e apresentou uma abundância significativamente maior no grupo Sobrepeso e Obeso, comparados ao grupo Normal. Essa mesma proteína também estava significativamente superexpressa no grupo Obeso na comparação com grupo Sobrepeso.

**Tabela 7.** Proteínas plasmáticas identificadas e apresentadas de acordo com hiperexpressão (↑) ou hipoexpressão (↓) na comparação entre os grupos.

| <b>Acesso</b>                   | <b>Proteína</b>                           | <b>Normal vs<br/>sobrepeso</b> | <b>Valor de p</b> | <b>Normal vs<br/>obeso</b> | <b>Valor de p</b> | <b>Sobrepeso vs<br/>obeso</b> | <b>Valor de p</b> |
|---------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| <b><i>Transporte</i></b>        |                                           |                                |                   |                            |                   |                               |                   |
| <b>P02787</b>                   | Serotransferrina                          | ↓1,3                           | 7,00E-03          | ↓1,47                      | 1,60E-03          | ↓1,13                         | 1,60E-02          |
| <b><i>Metabolic process</i></b> |                                           |                                |                   |                            |                   |                               |                   |
| <b>P02768</b>                   | Albumina sérica                           | NS                             | NS                | ↓2,24                      | 5,00E-04          | ↓2,1                          | 4,00E-04          |
| <b><i>Immune response</i></b>   |                                           |                                |                   |                            |                   |                               |                   |
| <b>P01876</b>                   | Imunoglobulina pesada<br>constante alfa 1 | ↓1,39                          | 1,00E-02          | ↓1,73                      | 4,00E-03          | NS                            | NS                |
| <b>P01834</b>                   | imunoglobulina<br>constante kappa         | ↓1,75                          | 1,00E-04          | ↓2,32                      | 1,00E-02          | NS                            | NS                |
| <b>P0DOY2</b>                   | Imunoglobulina<br>constante lambda de 2   | ↓1,4                           | 4,00E-03          | ↓1,55                      | 5,00E-04          | NS                            | NS                |
| <b>P01024</b>                   | Complemento C 3                           | ↑5,33                          | 1,00E-04          | ↑1,95                      | 3,00E-02          | ↓2,73                         | 1,00E-04          |
| <b>P02671</b>                   | Cadeia alfa de<br>fibrinogênio            | ↓2,9                           | 1,00E-02          | NS                         | NS                | ↑2,81                         | 1,00E-02          |
| <b>P01860</b>                   | Imunoglobulina pesada<br>constante gama 3 | NS                             | NS                | ↓1,96                      | 2,00E-03          | NS                            | NS                |





|                                                           |                                |    |    |      |          |       |          |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|----|----|------|----------|-------|----------|
| <b>P02749</b>                                             | Beta-2-glicoproteína 1         | NO | -  | ↑1,4 | 5,00E-03 | OB    | -        |
| <b><i>Processo metabólico de triglicérides</i></b>        |                                |    |    |      |          |       |          |
| <b>P02656</b>                                             | Apolipoproteína C-III          | NS | NS | NO   | -        | SO    | -        |
| <b><i>Resposta inflamatória</i></b>                       |                                |    |    |      |          |       |          |
| <b>P02763</b>                                             | Glicoproteína acida alfa 1     | SO | -  | OB   | -        | ↑6,84 | 4,00E-03 |
| <b><i>Desenvolvimento do tecido muscular cardíaco</i></b> |                                |    |    |      |          |       |          |
| <b>P02753</b>                                             | Proteína de ligação ao retinol | NS | NS | NO   | -        | SO    | -        |
| <b><i>Degranulação de plaquetas</i></b>                   |                                |    |    |      |          |       |          |
| <b>P01011</b>                                             | Alfa-1-antichimotripsina       | SO | -  | OB   | -        | ↓4,14 | 4,00E-02 |
| <b><i>Contração do musculo liso da artéria</i></b>        |                                |    |    |      |          |       |          |
| <b>P01019</b>                                             | Angiotensinogênio              | SO | -  | -    | -        | SO    | -        |

Legenda: NS: não significativa; -: proteínas exclusivas onde não houve comparação NO: normal; SO: sobrepeso; OB: obeso; (↑): hiperexpressão; (↓): hipoexpressão.

## 6. Discussão

Os dados clínicos foram avaliados, auxiliando na definição dos critérios de exclusão. Os dados periodontais serviram para avaliar a saúde ou doença dos voluntários, observando a presença de voluntários com gengivite ou saudáveis. Outra observação realizada foi a presença de dois voluntários que apresentavam síndrome metabólica (dados não apresentados) que serão estudados em trabalhos futuros.

A análise proteômica de saliva e plasma sanguíneo são ferramentas eficientes para investigação das variações na expressão e secreção de proteínas pelo organismo, em resposta à condição fisio-patológica. Neste estudo, foi possível detectar uma variedade de fatores proteicos envolvidos com diversas funções biológicas, como resposta imune, transporte, degranulação do neutrófilo e outros processos metabólicos.

Algumas modificações na metodologia foram imperativas para o aprimoramento das análises. Foi necessário o ajuste do protocolo de coleta de saliva, comparado a Golçalves *et al*, 2010. Observamos que o bochechar com 2 ml de água Milli-Q por 5 minutos proporcionava maior eficiência na extração de proteínas, gerando um aumento na concentração proteica obtida ao final do protocolo. Outra alteração necessária foi na depleção de albumina. Inicialmente usávamos 100 µl de plasma no kit de depleção de albumina, como recomendado pelo fabricante, o que proporcionou a identificação de apenas 4 proteínas diferentes. Seguimos então com subseqüentes volumes menores de amostra (75 e 50 µl), sendo que o volume de 50 µl de amostra depletada foi o mais promissor na identificação de maior variedade de proteínas ao final da análise.

Os ensaios de Espectrometria de Massas foram realizados em dois sistemas diferentes: no INMETRO o Synapt ESI/MALDI-QTOF (WATERS) foi utilizado para análise das proteínas de saliva, e no LNBIO, o Espectrômetro Q-TOF Premier (WATERS) a foi aplicado nas caracterizações das amostras de proteínas do plasma. Com isso, na etapa de identificação a partir dos dados de MS, foram utilizados dois programas diferentes, com diferentes ferramentas e testes estatísticos, devido às características de cada programa. O programa



Progenesis (Waters), presente na Plataforma de MS do INMETRO, usa o teste ANOVA para avaliação das diferenças entre os valores de abundância das proteínas identificadas. O programa Scaffold, do LNBIO, usa o teste T para validar estatisticamente as diferenças.

As proteínas salivares e plasmáticas apresentadas na discussão são proteínas exclusivas ou com uma significativa modificação, sendo as melhores para representar as duas amostras estudadas. O número de proteínas relacionadas a doença periodontal foi pequeno devido a mesma quantidade de voluntários com gengivite em cada grupo de IMC. Posteriormente serão realizadas comparações entre os grupos de doentes e saudáveis dentro de cada grupo de IMC.

### **6.1. Proteínas salivares**

A saliva possui diversas funções, que incluem lubrificação, defesa contra bactérias e digestão inicial de alimentos. Além disto, vem sendo usada como fonte de biomarcadores inflamatórios relacionados a doenças bucais e doenças sistêmicas. Neste contexto, já foi demonstrado que na saliva é possível a identificação de proteínas relacionadas a doenças cardiovasculares, e a diferentes tipos de câncer, como o de mama e o oral (LEE, 2009).

A possibilidade de uso da saliva como uma fonte de diagnóstico precoce de doenças, estimulou o presente estudo a buscar por indicações de que as proteínas salivares fossem semelhantes àquelas encontradas no plasma nos mesmos indivíduos. De acordo com os resultados, foram detectadas 7 proteínas nos dois fluidos biológicos de todos os indivíduos.

Nas análises comparativas, observou-se um grupo de proteínas exclusivas e específicas para cada condição fisio-patológica. Além disso, dentre as que eram comuns a todas as condições, muitas apresentaram variações expressivas e significativas nas concentrações, destas a maioria já foi descrita como relacionada à resposta imune, outras funções e transporte.

### 6.1.1. Actinas

No presente estudo, a proteína Actina de músculo liso aórtico (ACTA2 - actin aortic smooth muscle) foi observada apenas nas amostras de saliva de indivíduos com sobrepeso e obesos, não sendo detectada no grupo Normal. Essa alteração pode indicar uma possível relação entre a superexpressão de ACTA2 e o aumento do IMC. Esta proteína encontra-se na célula muscular lisa, representando 40% da proteína total dessa célula (LU et al., 2015). Mais de 40 mutações já foram observadas no gene ACTA2, sendo responsáveis por cerca de 15% dos aneurismas diagnosticados (REGALADO et al., 2015). Foi demonstrado, em estudos anteriores, que a proteína ACTA2 estava relacionada com doenças cardiovasculares devido as mutações encontradas no seu gene (GUO et al., 2007; CHEN et al., 2017). Entretanto, o aumento da proteína ainda não foi relacionado com doenças cardiovasculares. Assim, apesar de ter sido demonstrado que há influência do IMC sobre a concentração dessa proteína, ainda permanece sem esclarecimento se a hiperegulação da proteína também pode influenciar no risco de doenças cardiovasculares como já foi observado em mutações do gene ACTA2.

A alfa actina de músculo cardíaco (ACTC1) também foi observada somente nos grupos Obesos e Sobrepeso. ACTC1 é a isoforma de  $\alpha$ -actina estriada mais numerosa em corações maduros e dominante no músculo esquelético fetal. A ACTC1 desempenha um papel importante na regulação do movimento e na forma da célula (OLSON et al., 2000; MATSSON et al., 2008; ILKOVSKI et al., 2005). Em bebês, após o nascimento, a proteína ACTC1 no músculo esquelético tem sua expressão diminuída a níveis insignificantes, porém pode ser expressa em músculo esquelético maduro doente, como em distrofia muscular e em miofibras em regeneração (ROLAND et al., 2006; SENNIS et al., 2008).

Mutações na proteína ACTC1 tem sido relacionadas com o desenvolvimento de cardiomiopatia hipertrofia (CMH). Até o momento foram descobertas 12 mutações em pacientes com CMH. CMH é um grupo de doenças

relacionado a hipertrofia do miocárdio, apresentando fenótipos variáveis (SEMSARIAM et al., 2015; BAXI et al., 2016).

No estudo de Augière et al., 2015, foi relatado que uma mutação no gene ACTC1 resultou em defeitos cardíacos congênitos, além de arritmia. Em um outro estudo (YOSHIDA et al., 2016), sugere-se que uma mutação na proteína em questão pode levar a uma arritmia potencialmente fatal. Diferentemente dos estudos citados, no presente não foram estudadas mutações e, sim, a detecção das proteínas em saliva e plasma. Desta forma, estudos mais aprofundados são necessários para entender se o aumento dessa proteína está associado aos fenótipos estudados neste trabalho.

Assim como as outras actinas, a Actina de músculo liso gama entérico (ACTG2) também só foi identificada nos grupos Sobrepeso e Obeso. Duas actinas de músculo liso foram descritas, a  $\alpha$ SMA, que é codificada pelo gene ACTA2, e  $\gamma$ SMA, codificada pelo gene ACTG2. Estudos descreveram a  $\alpha$ SMA como predominante no músculo liso respiratório e vascular, enquanto que a  $\gamma$ SMA é predominante nas células musculares lisas dos tratos urogenital e gastrointestinal. Devido a seu padrão de expressão,  $\alpha$ SMA e  $\gamma$ SMA também são conhecidas como actinas  $\alpha$ -vasculares e  $\gamma$ -entéricas (ARNOLDI et al., 2013).

No estudo de Benzoubir et al., 2015, foi observado a relação da transição epitélio-mesenquimal (TEM) com os níveis de ACTG2. Naquele estudo, o carcinoma hepatocelular foi estudado, sendo as células tratadas com TGF- $\beta$ , uma citocina inibidora de tumor, e tendo a expressão de ACTG2 não identificada. Na etapa in vitro, a ACTG2 foi identificada como um marcador para TEM. Além disso, foi observado que a ACTG2 está relacionada com a agressividade de carcinoma hepatocelular e identificação deste câncer.

#### **6.1.1.1 Proteína semelhante a beta-actina 2 (ACTBL2)**

A proteína beta actina (ACTBL2) é considerada uma proteína tem sido usada como referência na quantificação de sua expressão em tumores. A ACTBL2 está relacionada a uma variedade de cânceres, estando desregulado na

leucemia e câncer de ovário (GUO et al., 2013). Nos presentes resultados, a proteína ACTBL2 só foi observada no grupo Obeso, não sendo possível a identificação nos demais grupos. No trabalho Ghazanfar et al., 2017, os autores relacionaram ACTBL2 com câncer colorretal, que é a terceira forma mais letal de câncer (SIEGEL et al., 2015). Naquele estudo, a ACBL2 foi encontrada em grande abundância em amostras de tumores colorretais, tanto por análise proteômica quanto histoquímica, indicando a possibilidade de ser usada como um potencial biomarcador associado a este tipo de câncer.

### **6.1.2. Proteínas da família BPIF**

As proteínas da família BPIF são localizadas em maior concentração em locais onde a defesa inata é importante, por exemplo, em brônquios, traqueia, passagens aéreas, e nas glândulas salivares. Na cavidade bucal, são produzidas pelas glândulas parótidas, sendo específicas desse local em mamíferos, incluindo os humanos. Tem pouca ou nenhuma expressão basal detectada em outros tecidos ou órgãos, como os rins (BINGLE & CRAVEN, 2002). Esta família de proteínas está relacionada com a neutralização da atividade de LPS de bactérias gram-negativas, destruindo a membrana celular e levando à lise da célula.

No presente estudo, a proteína BPIFB1 (BPI fold-containing family B member 1) foi identificada exclusivamente nos grupos Obeso e Sobrepeso, enquanto a proteína BPIFB2 (BPI fold-containing family B member 2) foi detectada como mais abundante nos em obesos e sobrepeso, em relação à indivíduos de IMC normal. Apesar da proteína BPIFB2 ser pouco estudada como biomarcador, a sua proximidade com a BPIFB1 é um fator que deve ser levado em consideração como um possível biomarcador. Essas proteínas estão ausentes em regiões alveolares saudáveis, além de exibir expressão limitada nas vias aéreas saudáveis (BINGLE et al., 2010; BINGLE et al., 2012). As proteínas da família BPIF têm sido relacionadas com doenças pulmonares crônicas, como fibrose cística (FC), uma doença hereditária, relacionada ao

acúmulo de muco, que pode danificar variados órgãos do corpo (BINGLE et al., 2012; NHI, 2018).

No estudo de Scheetz et al., 2004, foi observado aumento de BPIFB1 em células epiteliais de pacientes com FC. No estudo de Bingle et al., 2012, foi demonstrado que a proteína BPIFB1 está elevada em pacientes FC, assim como no modelo de murino usado no trabalho. Para os autores ainda não está claro se o aumento da proteína está relacionado com o desenvolvimento da doença, porém existe a possibilidade de que o aumento estaria respondendo a um remodelamento epitelial ocorrido na doença.

A proteína BPIFB1 também se encontrou elevada na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), que é um conjunto de doenças que ocasionam o fluxo restrito de ar e perda progressiva da função pulmonar. A DPOC apresenta uma resposta inflamatória excessiva, com produção de muco, que pode ocasionar bronquite crônica e enfisema (VESTBO et al., 2013; VOGELMEIER, et al., 2017). Nos estudos de Fernández-Blanco et al., 2018, e De Smet et al., 2018, foi observado que BPIFB1 estava aumentada em pacientes com DPOC em comparação com pacientes saudáveis. Em 2018, Fernández-Blanco e colaboradores verificaram que os níveis de BPIFB1 está inversamente relacionado com a capacidade respiratória, além de ter correlação com a gravidade da doença. No estudo de De Smet et al., 2018, o mRNA e a proteína BPIFB1 se mostraram elevados em pacientes com DPOC e, assim como Fernández-Blanco e colaboradores, também observaram que a proteína está inversamente correlacionada com a função pulmonar.

Nos achados descritos aqui, a proteína BPI fold-containing family A member 2 (BPIFA2) também se mostrou presente somente nos grupos Sobrepeso e Obeso. No estudo de Kota et al., 2017, a proteína BPIFA2 mostrou aumento de expressão em camundongos lacking Nur77 após 3 horas de lesão renal induzida, um aumento de 8 vezes com 6 horas e 7 vezes após 24 horas de lesão. Naquele estudo, foi observado aumento da proteína logo após sepse, isquemia e nefrotoxicidade na insuficiência renal aguda (IRA), além de ser um bom biomarcador para IRA em camundongos e humanos. Além disso, o estudo levantou uma hipótese de que o aumento na quantidade da BPIFA2 no sangue

e na urina dos camundongos tem ligação com a elevação da proteína na saliva. O aumento desta proteína também foi observado em nosso trabalho, o que poderia indicar a possibilidade de emprego desta como biomarcador em análises de saliva, assim como dos demais membros da família BPIF.

### **6.1.3. Calicreína-1**

O sistema calicreína é um importante modulador dos sistemas cardiovascular, nervoso e renal (GOLIAS et al., 2007). Essa proteína atua na indução de genes e na ativação de proenzimas, de moléculas relacionadas à vasodilatação, fibrinólise e coagulação (BRYANT and MADAR 2009). Já foi demonstrado que esta proteína apresenta uma relação inversa com doenças cardiovasculares (RAN et al., 2015). Em nossos resultados, a calicreína só foi identificada no grupo Sobrepeso, sendo observado um aumento de sua expressão nesse grupo em relação ao grupo normal. Este achado vai em direção oposta a outras proteínas encontradas, cujas alterações são mais relacionadas como indicação de doenças cardiovasculares. Há, entretanto, a possibilidade de uma associação entre a super expressão de Calicreína e as causas ou sintomas do aumento inicial de peso.

No estudo de Yiu e colaboradores de 2014, foi observado a característica pró-inflamatório da calicreína-1. O grupo observou uma superexpressão em tecido renal diabético humano e induzida por alto nível de glicose em células epiteliais tubulares proximais, mediando o processo inflamatório da doença. O resultado dessa pesquisa corrobora com nossos resultados, observando um aumento no grupo do sobrepeso.

### **6.1.4. Proteínas salivares básicas ricas em prolina 1 e 2**

As proteínas salivares básicas ricas em prolina (PRP) comumente chamadas de PRPs básicas são encontradas nas glândulas parótidas e em

secreções brônquicas e nasais. As PRPs básicas não possuem a capacidade de se aderir à superfície dos dentes, porém conseguem se ligar a bactérias (MATSUMOTO et al., 2008).

Em nosso estudo, a PRP 2 apresentou um expressivo aumento nos grupos Sobrepeso e Obeso, chegando a ser quase 30x mais abundante no grupo de sobrepeso, em relação à condição Peso normal. Por outro lado, a PRP 1 foi identificada exclusivamente nos indivíduos com sobrepeso e obesidade. No estudo de Ribeiro et al, 2012, foi observado que o peptídeo IB-4 de PRPs básicas estava aumentado em crianças com cáries, estando positivamente correlacionado àquela doença. No presente estudo, os dados parecem demonstrar que houve um grande impacto na expressão dessas proteínas com o aumento de peso. Dessa forma, estudos futuros, mais aprofundados, seriam necessários para analisar se essas proteínas podem ser usadas como biomarcadores para doenças orais, como a cárie dentária.

#### **6.1.5. Membros da família de domínio POTE ankirin E, I e F**

As proteínas POTE são expressas na próstata, no ovário, no testículo e na placenta. Essas proteínas são encontradas apenas em primatas, sendo identificados 13 parálogos para essa proteína. Além disto, são expressas, de forma elevada, em uma ampla variedade de cânceres, como de pulmão, cólon, ovário e pâncreas (BERA et al., 2002; BERA et al., 2004; BERA et al., 2006).

No estudo de Wang et al., 2015, a proteína POTE member E (POTEE), uma das três encontradas em nosso estudo, mostrou-se elevada em pacientes com câncer de pulmão. Outra observação daquele estudo foi que em pacientes com baixo POTEE houve maior sobrevida comparado a pacientes com maiores níveis de POTEE. Em nosso estudo, as três proteínas foram identificadas somente no grupo Sobrepeso. Apesar das três proteínas apresentarem a mesma alteração, não está claro se o aumento de peso influenciou na mudança dessas proteínas, uma vez que no grupo Obesos elas não foram identificadas.

#### **6.1.6. Homólogo A da proteína RAD23 de reparo por excisão UV (RAD-23)**

A proteína RAD-23 é conhecida por duas funções: poder se ligar a substratos ubiquitinados e ao proteossoma para ajudar na degradação de certos substratos (CHEN & MADURA, 2006), e auxiliar no início da reparação de excisão de nucleotídeos (BERGINK et al., 2012). Em nosso estudo, a RAD-23 foi identificada em todos os grupos, sendo observado superexpressão significativa nos grupos Sobrepeso e Obeso, em relação ao Normal. Em 2015, Jablonski e colaboradores relacionaram os níveis de RAD-23 com esclerose lateral amiotrófica (ELA). A ELA causa a morte dos neurônios motores inferiores e superiores, levando a uma paralisia (Rothstein, 2009). Na medula espinhal de pacientes com ELA, foi descoberto que a RAD-23 estava aumentada, e também foi observado que a diminuição da RAD-23 possui um efeito protetor contra proteínas que são conhecidas por se agregarem na ELA. Considera-se que a RAD-23 se liga a substratos ubiquitinados, impedindo sua degradação através da remodelação das cadeias de ubiquitina.

### **6.2. Proteínas salivares e plasmáticas**

No total, 7 proteínas foram identificadas tanto na saliva quanto no plasma: serotransferrina, imunoglobulina cadeia lambda 2, imunoglobulina cadeia pesada alfa 1, imunoglobulina cadeia pesada gama 2, albumina sérica, hemoglobina subunidades alfa e beta.

#### **6.2.1 Hemoglobina subunidades alfa e beta**

A hemoglobina é uma proteína essencial para a vida de seres aeróbicos, além de estar envolvida em uma grande variedade de processos biológicos (SAWICKI et al., 2015). A hemoglobina livre é propensa à oxidação e seus produtos possuem características pró-oxidantes e inflamatórias. Em nosso estudo, ambas subunidades salivares da hemoglobina foram identificadas somente no grupo Obeso, enquanto que a subunidade beta plasmática foi detectada apenas em indivíduos com sobrepeso e obesidade e a subunidade



alfa foi identificada em todos os grupos. Na literatura, foi observado que o aumento no nível de hemoglobina livre está associado com doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio (KIM et al., 2018; LEE et al., 2018). Além disto, foi observado que os níveis de hemoglobina estavam aumentados em pacientes com hipertensão arterial. Um dos fatores que relacionam a hemoglobina livre à hipertensão é a sua ligação ao óxido nítrico, um potente vasodilator (MAIO et al., 2011). Por outro lado, a hemoglobina livre também está envolvida no processo inflamatório. O endotélio vascular desempenha um papel importante na resposta inflamatória na indução da cascata de adesão leucocitária, e posterior diapedese. O aumento de hemoglobina regula positivamente as moléculas de adesão: molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1); molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), e E selectina (SILVA et al., 2009; GRAM et al., 2013). Essas características, assim como os dados sobre hemoglobina encontrados em nosso estudo, corroboram o aspecto inflamatório que pode estar presente no grupo Obeso.

#### **6.2.2. Serotransferrina**

A proteína serotransferrin (TF) está ligada ao transporte de ferro. Possui o papel de transportar o ferro dos locais absorção e de degradação de moléculas heme para os sítios de armazenamento e utilização. A TF atua como antagonista da insulina, podendo levar a hiperglicemia em ratos normoglicêmicos, além de estar envolvido em processos tumorais e na atividade antibacteriana. A proteína TF foi identificada em todos os grupos que estudamos, estando diminuída nos grupos Obeso e Sobrepeso, tanto na saliva quanto no plasma. No estudo de Gao et al., 2013, foi observado que a proteína TF estava diminuída em pacientes com doença cardíaca reumática (CARAPETIS et al., 2005). Para os autores, a diminuição da proteína TF pode tornar o organismo ou corpo susceptível ao *Streptococcus pyogenes*, responsável pela doença cardíaca reumática, assim podendo ser usada como um possível biomarcador para aquela doença. Vasko e colaboradores, 2016, estudaram a relação da proteína TF com a artrite reumatoide. Segundo o estudo, a proteína TF estava significativamente

diminuída em pacientes com artrite reumatoide, podendo estar implicada na patogênese da mesma, além de poder ser usada no seu diagnóstico.

### **6.2.3. Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são glicoproteínas secretas pelos linfócitos B ou aderidas à sua membrana. Atuam como receptores que desencadeiam expansão e diferenciação dos linfócitos B. No estudo de Ramella et al, 2018, foi analisada a relação da imunoglobulina cadeia pesada gama 2 (IGHG2) com aneurisma da aorta abdominal (AAA). O AAA representa 80% dos aneurismas aórticos, podendo ser ocasionado por inflamação ou aneurisma infeccioso (RAMELLA et al., 2018). Em nosso estudo, apesar da imunoglobulina cadeia pesada gama 3 (IGHG3) ter sido observada somente no plasma, sua alteração ocorreu de forma muito similar ao IGHG2, mostrando uma diminuição em seus níveis no grupo dos obesos em comparação ao grupo Normal. Já na saliva, IGHG2 apresentou aumento no grupo sobrepeso e diminuição no grupo Obeso. No trabalho de Ramella et al, os autores observaram uma diminuição nos níveis da IGHG2, semelhantemente ao encontrado em nosso estudo. Apesar dos autores não apresentarem a proteína IGHG3 em seu trabalho, talvez essa proteína possa desempenhar um papel parecido ao da IGHG2.

Em nosso trabalho, tanto a imunoglobulina cadeia lambda 2 (IGLC2) quanto a imunoglobulina cadeia pesada alfa 1 (IGHA1) plasmáticas apresentaram diminuição nos grupos Obeso e Sobrepeso. Entretanto, na saliva, IGHA1 encontrara-se aumentada significativamente no grupo Sobrepeso e IGCL2 em ambos os grupos IMC acima do normal. Tal diferença provavelmente está relacionada à microbiota/ ambiente ecológico da cavidade bucal. Os níveis plasmáticos de IGLC2 e IGHA1 em doenças está aumentado, como demonstrado nos estudos de Lee et al., 2016, onde os níveis de IGHA1 estavam diminuídos em pacientes com DPOC que foram tratados com corticoides. No estudo de Yi et al., 2016, os níveis estavam aumentados em pacientes com artrite reumatoide. A diminuição dessas proteínas no plasma provavelmente está relacionada com a elevação da massa corporal, já que ambas proteínas estão

dimuídas nos grupos Sobrepresso e Obeso estudados em comparação com o grupo Normal.

#### **6.2.4. Albumina**

A albumina é uma proteína produzida no fígado, encontrada em líquidos extracelulares, sendo a proteína mais abundante do sangue. Ela é essencial para a manutenção da pressão osmótica e para a distribuição dos fluidos corporais (GOPAL et al, 2010). Em nosso trabalho, os níveis de albumina plasmática apresentaram diminuição no grupo Obeso em comparação com o grupo Normal e Sobrepeso. Na saliva, houve aumento tanto no grupo Sobrepeso quanto no Obeso comparado ao Normal.

Estudos observaram associação entre a diminuição da albumina e a mortalidade cardiovascular (SCHALK et al., 2006). Nos trabalhos de Gopal et al., (2010) e de Chien et al., (2017), os níveis de albumina estavam diminuídos em pacientes com doenças cardiovasculares, estando associado a um pior prognóstico em pacientes com inflamação e doenças coronarianas. Esses resultados corroboram nossos achados em relação à albumina plasmática.

No estudo de Silva-Boghossian et al., (2013), o nível de albumina aumentou tanto na gengivite quanto na periodontite em comparação aos indivíduos saudáveis, sendo que na periodontite o nível estava mais elevado do que na gengivite. Em um outro estudo (NAGHSH et al., 2017), foi avaliado a relação entre a concentração de albumina com periodontite e gengivite. Os autores observaram que os níveis elevados de albumina estavam associados com a progressão da gengivite e da periodontite.

As diferenças entre o perfil da albumina na saliva e no plasma podem indicar que apesar de ser um potencial biomarcador, fontes diferentes podem indicar diferentes estados patológicos, sendo necessário um estudo prévio da fonte de pesquisa para determinar as possíveis alterações esperadas em anomalias ou doenças.

### **6.3. Proteínas plasmáticas**

#### **6.3.1. Proteína de ligação à vitamina D**

Evidências sugerem que o sistema da vitamina D tem diversas funções fisiológicas que podem afetar órgãos, processos metabólicos, controle de pressão arterial e controle da glicemia. A ação da vitamina D necessita da colaboração do receptor de Vitamina D, que por sua vez, necessita da cooperação da proteínas de ligação à Vitamin D, ou globulina de componente específico do grupo (GC), o transportador plasmático da vitamina D (DELANGHE et al, 2015). Em nosso estudo, a proteína GC mostrou uma diminuição dos seus níveis no grupo Obeso em comparação com Sobrepeso. Em Karuwanarint et al., 2018, os autores observaram que os níveis de GC estavam diminuídos em indivíduos com síndrome metabólica (SM) em comparação aos indivíduos saudáveis. Naquele estudo, foi encontrado relações negativas entre o nível de GC e glicose, contribuindo para o risco de SM. Em nosso estudo, o nível de GC foi observado diminuído no grupo Obeso sem SM (dado não apresentado), o que pode vir a configurar um possível biomarcador precoce para aquela condição.

#### **6.3.2. Angiotensinogênio**

O angiotensinogênio (AGT) é um componente essencial do sistema renina-angiotensina, um potente regulador da homeostase de fluidos corporais, pressão arterial e eletrólitos. Em nosso estudo, o AGT só foi identificado no grupo Sobrepeso, que pode indicar uma atividade precoce relacionada com causa ou efeito do ganho de peso. O aumento do AGT urinário tem sido relacionado com problemas renais, como insuficiência renal aguda (IRA) e nefrolitíase, uma condição que envolve o desenvolvimento de cálculos renais, com uma prevalência de 5-8% em todo o mundo (KEDDIS & RULE, 2013). No estudo de Yang et al., 2015, os níveis de AGT estavam aumentados em indivíduos com IRA, sendo um preditor para seu desenvolvimento. Em 2014, Sun et al.

observaram que AGT esva aumentado na nefrolitíase, sendo um biomarcador para pacientes com nefrolitíase, indicando lesão tubular renal.

### **6.3.3. Ceruloplasmina (CP)**

A ceruloplasmina (CP) é uma enzima produzida no fígado, que possui a função de oxidar a lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de diminuir a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (SHIVA et al., 2006; SHUKLA et al., 2006). A LDL oxidada possui papel pró-aterogênico na parede arterial, enquanto a diminuição da biodisponibilidade de NO promove disfunção endotelial, podendo levar à aterosclerose (SHUKLA et al., 2006). Dadu et al. (2013) e Bao et al. (2018) estudaram a relação dos níveis de CP com doenças cardiovasculares. Ambos estudos observaram que o aumento dessa proteína leva a um risco de insuficiência cardíaca e doença cardiovascular. Em nosso trabalho, a proteína CP só foi identificada exclusivamente no grupo Sobrepeso, essa elevação intermediária pode sugerir que a proteína seja um bom biomarcador precoce para doença cardiovascular..

### **6.3.4. Glicoproteína ácida alfa-1 (A1G1)**

A A1G1 é uma proteína de fase aguda, produzida pelo fígado em resposta a infecção e inflamação, e tem papel importante como agente anti-inflamatório (HOCHEPIED et al., 2003; MESTRINER et al., 2007). Estudos observaram a relação de A1G1 com doenças cardiovasculares (BERNTSSON et al., 2016; NAGHAM et al., 2016). Foi demonstrado que os níveis de A1G1 estavam aumentados em indivíduos com doenças cardiovasculares, AVC, além de estar associado com o aumento de lipídeos, disfunção vascular, lesão renal e controle glicêmico insuficiente. Em nossa análise, a A1G1 foi identificada somente nos grupos Sobrepeso e Obeso. Além disto, apresentou um aumento de mais de 6x na concentração em amostras do grupo Obeso, em relação ao grupo com sobrepeso. Frente ao relatado, esta proteína poderia ser um potencial

biomarcador para doenças cardiovasculares, devido a ausência em indivíduos com IMC normal e seu aumento gradativo em indivíduos com crescente aumento de IMC, sem doença cardiovascular.

#### **6.3.5. Antitripsina alfa-1**

A proteína antitripsina alfa (AAT) é sintetizada no fígado e circula na corrente sanguínea, podendo ser sintetizada em menor escala por monócitos, macrófagos, pâncreas, eritrócitos e células alveolares pulmonares. Apesar do mecanismo não estar claro, níveis baixos de AAT foram relacionados com DM2, talvez pelo fato de proteger as células  $\beta$  do pâncreas contra apoptose, através da inibição das caspases-3. Estudos observaram que o nível de AAT em indivíduos com DM2 é 50% menor que em indivíduos saudáveis (ZHANG et al., 2007; SANDSTRÖM et al., 2008).

Em modelos de ratos diabéticos, o AAT está 50% diminuído em comparação aos ratos normais; entretanto, recuperaram a glicemia normal após 14 dias de tratamento com AAT (KOULMANDA et al., 2008). Em outro estudo (BRENER et al., 2018), foram realizadas infusões de AAT em crianças e adolescentes com DM1. O tratamento não apresentou evento adverso grave, anormalidades clínicas ou laboratoriais. Foi demonstrado que 4 de 24 indivíduos (16,7%) apresentaram evidências de função de células  $\beta$  preservada. Além disso, episódios de cetoacidose diabética, incidência de hipoglicemia grave, e hospitalizações relacionadas ao diabetes foi menor. Em nosso estudo, os níveis de AAT estavam diminuídos no grupo Obeso em comparação ao Normal. Entretanto, é importante lembrar que nenhum participante tinha diagnóstico de DM1 ou DM2, dessa forma a diminuição de AAT em indivíduos saudáveis, mas com índices altos de IMC, pode configurar um potencial biomarcador para DM1 e DM2.

### **6.3.5. Cadeia gama do Fibrinogênio**

O fibrinogênio é uma proteína plasmática sintetizada no fígado, e desempenha um papel importante na coagulação, agregação de eritrócitos e na viscosidade do plasma. Assim, níveis elevados podem contribuir para um estado protrombótico, além de poderem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da SM (SOLA et al., 2007; KAPTOGE et al., 2007). Já foi observado que indivíduos do sexo feminino com sobrepeso e SM apresentam os níveis de fibrinogênio aumentados, o que poderia ser um possível biomarcador para a SM (DING et al., 2015).

Melander et al., 2015, relataram que os níveis de fibrinogênio estavam relacionados com a predição de doença cardiovascular, sendo que em indivíduos sem a ocorrência de doença e que durante o estudo a apresentaram, o nível de fibrinogênio foi maior. Em nosso estudo, a cadeia gama do fibrinogênio apresentou-se com grande diminuição no grupo Sobrepeso em comparação ao grupo Normal, e um aumento no grupo Obeso em comparação ao grupo Normal. Essa alteração no grupo do sobrepeso pode estar relacionada à transição no aumento de peso, indo de indivíduos magros para com sobrepeso, porém é necessário mais estudo para verificar essa alteração.

### **6.3.6. Proteína do sistema complemento**

A proteína C3 é produzida principalmente no fígado, sendo uma proteína importante do sistema imune. Em estudos a proteína C3 estava associada a obesidade abdominal e a alteração na pressão arterial, além de ter sido relacionado ao desenvolvimento de diabetes tipo 2. O aumento na concentração da proteína C3 estão envolvidas no desenvolvimento da adiposidade visceral (HERTLE et al., 2012).

Em nosso estudo a proteína C3 esta aumentada no grupo dos obesos e no grupo do sobrepeso em comparação com o grupo normal.

No estudo de Bao et al., 2016, os níveis plasmáticos da proteína C3 estava aumentado em indivíduos com pré diabetes, sendo um risco no desenvolvimento de diabetes tipo 2 em adultos. Esse estudo corrobora com as alterações na proteína C3 encontradas em nosso trabalho, dessa forma a proteína C3 pode ser um possível biomarcador precoce para a diabetes tipo 2.

## **7. Conclusão**

Diante dos resultados apresentados, as análises proteômicas proporcionaram a detecção de uma variedade de fatores proteicos envolvidos com diversas funções biológicas, como resposta imune, transporte, degranulação do neutrófilo e outros processos metabólicos. Diversos biomarcadores de potencial foram detectados, sendo relacionados a doenças inflamatórias bucais e cardiovasculares, ou possivelmente associados às consequências do ganho de peso e indução da inflamação sistêmica pela obesidade.

Foram identificadas diversas proteínas que podem ser biomarcadores para outras doenças que não as doenças periodontais e cardiovasculares, como câncer, DM1 e DM2, SM, fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite reumatoide, cárie e lesão renal aguda. Os dados obtidos e analisados no trabalho indicam que as análises proteômicas de saliva e plasma são promissoras para a identificação de biomarcadores, sendo primordial a realização de ensaios mais abrangentes para posterior confirmação de biomarcadores já existentes e na busca de novos biomarcadores para diversas doenças. Um próximo passo seria a seleção das proteínas obtidas com maior potencial de aplicabilidade clínica-diagnóstica para a execução do multiplexed targeted proteomics com um número maior de amostras biológicas. Com essa metodologia, seria possível aprofundar o conhecimento sobre a aplicabilidade dessas proteínas como biomarcadores diagnósticos.

Em relação as amostras salivares, confirma-se que a saliva é uma fonte rica em biomarcadores, podendo servir como uma alternativa na busca de novos biomarcadores para diagnóstico precoce.



## 8. Referências bibliográficas

- ABESO. Mapa da obesidade. 2015. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>>. Acesso em 29 dez. 2018.
- ADAMCZAK, M; WIECEK, A. The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Seminars in Nephrology*, v. 33, n. 1, p 2–13 2013.
- Reeves, A.F; Rees, J.M; Schiff; M et al. Total body weight and waist circumference associated with chronic periodontitis among adolescents in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med*, v. 160, n. 9, p 894-899, 2006.
- AKIL, L; AHMAD, H.A. Relationships between Obesity and Cardiovascular Diseases in Four Southern States and Colorado. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*, v. 22, n. 4, p 61–72, 2011.
- ALEXANDER, H; STEGNER, A.L; WAGNER-MANN, C; ALEXANDER, S; DU BOIS, GC; SAUTER, E.R. Proteomic Analysis to Identify Breast Cancer Biomarkers in Nipple Aspirate Fluid. *Clin Cancer Res*, v. 10, n 22, p 7500-7510, 2004.
- ALEKSANDROVA, K; NIMPTSCH, K; PISCHON, T. Influence of obesity and related metabolic alterations on colorectal cancer risk. *Curr Nutr Rep*, v. 2, n. 1, p 1–9, 2013.
- ALEKSANDROVA, K; DROGAN, D; BOEING, H; JENAB, M; BAS BUENO-DE-MESQUITA, H; JANSEN, E; et al. Adiposity, mediating biomarkers and risk of colon cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer*, v. 134, n. 3, p 612–621, 2014.
- ALEKSANDROVA, K; MOZAFFARIAN, D; PISCHON, T. Addressing the Perfect Storm: Biomarkers in Obesity and Pathophysiology of Cardiometabolic Risk. *Clinical Chemistry*, v 64, n. 1, 2017.
- ARMITAGE, G C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, v. 4, n. 1, p1-6, 1999.
- ARMITAGE, Gary C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases, v. 34, p 9-21, 2004.

ARNOLDI, R; HILTBRUNNER, A; DUGINA, V; et al. Smooth muscle actin isoforms: A tug of war between contraction and compliance. *European Journal of Cell Biology*, v. 92, n. 6-7, p187-200, 2013.

ASLAM, B; BASIT, M; NISAR, M.A; et al. Proteomics: Technologies and their applications. *J Chromatogr Sci*, v. 55, n. 2, p182-196, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009-2010. 2009.

BAO, X; BORNÉ, Y; JOHNSON, L; et al. Comparing the inflammatory profiles for incidence of diabetes mellitus and cardiovascular diseases: A prospective study exploring the “common soil” hypothesis. *Cardiovascular Diabetology*, v. 17, n. 87, 2018.

BAO, X; XIA, Y; ZHANG, Q; WU, HM; DU, HM; LIU, L; WANG, CJ; SHI, HB; GUO, XY; LIU, X; LI, CL; SU, Q; MENG, G; YU, B; SUN, SM<sup>2</sup>; WANG, X; ZHOU, M; JIA, QY; SONG, K; NIU, KJ. Elevated serum complement C3 levels are related to the development of prediabetes in an adult population: the Tianjin Chronic Low-Grade Systematic Inflammation and Health Cohort Study. *Diabet Med*, v. 33, n. 4, p446-453, 2016.

BARNESS, L.A.; OPITZ, J.M.; GILBERT, B.E. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. In: *American Journal of Medical Genetics, Part A. Am J Med Genet A*, v. 14A, n. 24p3016-34, 2007.

BASHAN, N; DORFMAN, K; TARNOVSCKI, T; et al. Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. *Endocrinology*, v, 148, n. 6, p 2955-62, 2007.

BAXI, A.J; RESTREPO, C.S.; VARGAS, D; et al. Hypertrophic Cardiomyopathy from A to Z: Genetics, Pathophysiology, Imaging, and Management. *RadioGraphics*, v. 36, n. 2, p335-54, 2016.

BELALCAZAR, L. Maria; HAFFNER, Steven M.; LANG, Wei; et al. Lifestyle intervention and/or statins for the reduction of C-reactive protein in type 2 diabetes: From the look AHEAD study. *Obesity*, v. 21, n. 5, p944-950, 2013.

BELLEI, Elisa; MONARI, Emanuela; OZBEN, Serkan; et al. Discovery of restless legs syndrome plasmatic biomarkers by proteomic analysis. *Brain and Behavior*, v. 8, n. 10, 2018.

BENZOUBIR, Nassima; MUSSINI, Charlotte; LEJAMTEL, Charlène; et al. Gamma-smooth muscle actin expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 2015.

BERA, T. K.; ZIMONJIC, D. B.; POPESCU, N. C.; et al. POTE, a highly homologous gene family located on numerous chromosomes and expressed in prostate, ovary, testis, placenta, and prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 26, p16975-16980, 2002.

BERA, Tapan K.; FLEUR, Ashley Saint; LEE, Yoomi; et al. POTE paralogs are induced and differentially expressed in many cancers. *Cancer Research*, v. 66, n. 1, p 52-60, 2006.

BERA, Tapan K.; HUYNH, Nancy; MAEDA, Hiroshi; et al. Five POTE paralogs and their splice variants are expressed in human prostate and encode proteins of different lengths. *Gene*, v. 337, p 45-53, 2004.

BERG, I. M.; SIMONSSON, Bo; RINGQVIST, Ivar. Social background, aspects of lifestyle, body image, relations, school situation, and somatic and psychological symptoms in obese and overweight 15-year-old boys in a county in Sweden. *Scandinavian Journal of Primary Health Care*, v. 23, n. 2, p 95-101, 2005.

BERGINK, Steven; TOUSSAINT, Wendy; LUIJSTERBURG, Martijn S.; et al. Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex. *Journal of Cell Biology*, v. 196, n. 6, p. 681–688, 2012.

BERNTSSON, John; ÖSTLING, Gerd; PERSSON, Margaretha; et al. Orosomucoid, carotid plaque, and incidence of stroke. *Stroke*, v. 47, n. 7, p. 1858–1863, 2016.

BINGLE, C D; CRAVEN, C J. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum.Mol.Genet*, v. 11, n. 8, p 937-43, 2002.

BINGLE, Colin D.; WILSON, Kirsty; LUNN, Hayley; et al. Human LPLUNC1 is a secreted product of goblet cells and minor glands of the respiratory and upper

aerodigestive tracts. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 133, n. 5, p 505-515, 2010.

BINGLE, L; WILSON, K; MUSA, M; *et al.* BPIFB1 (LPLUNC1) is upregulated in cystic fibrosis lung disease. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 138, n. 5, p 749-758, 2012.

BLASCHKE, Sabine; RINKE, Kathinka; MARING, Michael; *et al.* Haptoglobin- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, vitamin D-binding protein and apolipoprotein C-III as predictors of etanercept drug response in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, v. 17, n. 1, 2015.

BRADFORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, V. 72, n. 1, p, 248-254, 1976.

BOLYAROVA, K.T; STEFANOV, L. Relationship between periodontal disease and rheumatoid arthritis. *General Medicine*, v. 19, n. 2, p. 31–40, 2017.

BOSTROM, P; WU, J; JEDRYCHOWSKI, M P; *et al.* A PGC1  $\alpha$  dependent myokine that drives brown fat like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, v, 481, n. 7382, p 463-468, 2012.

BOUTILIERA, J.K; TAYLOR, R.L; RAM. NOWAK, K.J. Variable cardiac  $\alpha$ -actin (Actc1) expression in early adult skeletal muscle correlates with promoter methylation. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, V. 1860, p 1025–1036, 2017

BOWRING, J; MAHTO, M; MANDAL, D; *et al.* Stroke in pregnancy associated with syphilis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, v, 34, n. 3, p 405-407, 2008.

BRASIL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico - Vigitel 2016. 2017.

BRENER, A; LEBENTHAL, Y; INTERATOR, H; *et al.* Long-term safety of  $\alpha$ -1 antitrypsin therapy in children and adolescents with Type 1 diabetes. *Immunotherapy*, v. 10, n. 13, p. 1137–1148, 2018.

BULLO, M; CASAS-AGUSTENCH, P; AMIGO-CORREIG, P; *et al.* Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet 2. *Public Health Nutr*, v. 10, n. 10<sup>a</sup>, p 1164-1172, 2007.

BULLÓ, M; GARCÍA-LORDA, P; MEGIAS, I; et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*, v. 11, n. 4, p 525-531, 2003.

BUYSE, M; MICHIELS, S; SARGENT, D.J.; et al. Integrating biomarkers in clinical trials. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 11, n. 2, p 171-82, 2011.

BUYSE, M; SARGENT, D.J.; GROTHEY, A; et al. Biomarkers and surrogate end points-The challenge of statistical validation. *Nat Rev Clin Oncol*, v. 7, n. 6, p 309-317, 2010.

CALABRO, P; GOLIA, E; YEH, E T. Role of C-Reactive Protein in Acute Myocardial Infarction and Stroke: Possible Therapeutic Approaches. *Curr Pharm Biotechnol*, v, 13, n. 1, p 4-16, 2011.

CANCELLO, R; HENEGAR C, VIGUERIE N, TALEB S, POITOU C, ROUAULT C, COUPAYE M, PELLOUX V, HUGOL D, BOUILLOT JL, BOULOUMIÉ A, BARBATELLI G, CINTI S, SVENSSON PA, BARSH GS, ZUCKER JD, BASDEVANT A, LANGIN D, CLÉMENT K: Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005, v 54, n. 8, p 2277–2286.

CANNON, B; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews*, v, 84, n. 1, p 277-359, 2004.

CARAPETIS, J.R; STEER, A.C; MULHOLLAND, E.K; WEBER, M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*, v. 5, n. 11, p 685–694, 2005.

CARBONE, F; LA ROCCA, C; MATARESE, G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie*, 94, n. 10, p 2082-2088, 2012.

CARLUCCI, E.M.S; GOUVÊA, J.A.G.; OLIVEIRA, A.P.; et al. Obesidade e Sedentarismo: Fatores de Risco para Doença Cardiovascular. *Com. Ciências Saúde*, v, 24, n. 4, p 375-384, 2013.

CARNIELLI, C.M; MACEDO, C.C.S; ROSSI, T; LEME, A.F.P. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nature communications*, v. 9, n 3598, 2018.

- CARUSO, C; BALISTRERI, C.R; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, v. 2010, 2010.
- CASTOLDI, A; DE SOUZA, C.N; SARAIVA-CÂMARA, N.O; et al. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol*, v. 6, 2016.
- CECILIANI, F; POCACQUA, V. The acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Current Protein and Peptide Science*, v. 8, p. 91–108, 2007.
- CHAFFEE, B.W.; WESTON, S.J. Association Between Chronic Periodontal Disease and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*, v. 81, n. 12, p 1708-24, 2010.
- CHANG, Y.H; CHANG, D.M; LIN, K.C; et al. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v. 27, n. 6, p 515-527, 2011.
- CHEN, J; PETERS, A; PAPKE, C.L.; et al. Loss of Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin Leads to NF- $\kappa$ B-Dependent Increased Sensitivity to Angiotensin II in Smooth Muscle Cells and Aortic Enlargement. *Circulation Research*, v. 120, n. 12, p1903-1915, 2017.
- CHEN, L; MADURA, K. Evidence for distinct functions for human DNA repair factors hHR23A and hHR23B. *FEBS Letters*, v. 580, n. 14, p. 3401–3408, 2006.
- CHENG, J; ZHOU, X; JIANG, X; SUN, T. Deletion of ACTA2 in mice promotes angiotensin II induced pathogenesis of thoracic aortic aneurysms and dissections. *Journal of Thoracic Disease*, v. 10, n. 8, p 4733-4740, 2018
- CHIEN, S.C; CHEN, C.Y; LEU, H.B; et al. Association of low serum albumin concentration and adverse cardiovascular events in stable coronary heart disease. *International Journal of Cardiology*, v. 241, p. 1–5, 2017.
- CHIEN, Shih-Chieh; CHEN, Chun-Yen; LIN, Chao-Feng; et al. Critical appraisal of the role of serum albumin in cardiovascular disease. *Biomarker Research*, v. 5, n. 1, p. 31, 2017.
- COLLINS, Francis S.; VARMUS, Harold. A New Initiative on Precision Medicine. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 9, p 793-795, 2015.

DADU, R.T.; DODGE, R; NAMBI, V; et al. Ceruloplasmin and heart failure in the atherosclerosis risk in communities study. *Circulation: Heart Failure*, v. 6, n. 5, p. 936–943, 2013.

DALLA VECCHIA, C.F; SUSIN, C; RÖSING, C.K; et al. Overweight and Obesity as Risk Indicators for Periodontitis in Adults. *Journal of Periodontology*, v, 76, n. 10, p 1721-1728, 2005.

DAVIS, J.C.; FURSTENTHAL, L; DESAI, A.A.; et al. The microeconomics of personalized medicine: Today's challenge and tomorrow's promise. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 4, p 279-286, 2009.

De Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med*, v. 276, n. 4, p 311-35, 2014.

DE SOUZA, C.T.; ARAUJO, E.P.; BORDIN, Silvana; et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, v. 146, n. 10, p 4192-4209, 2005.

DELANGHE, J.R.; SPEECKAERT, R; SPEECKAERT, M.M. Behind the scenes of vitamin D binding protein: More than vitamin D binding. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, v. 29, n. 5, p 773-86, 2015.

DENNIS, R.A.; PRZYBYLA, B; GURLEY, C; et al. Aging alters gene expression of growth and remodeling factors in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Physiological Genomics*, v, 32, n. 3, p 393-400, 2008.

DESCHNER, J.; EICK, S.; DAMANAKI, A.; et al. The role of adipokines in periodontal infection and healing. *Molecular Oral Microbiology*, v. 29, n. 6, p 258-269, 2014.

DEVIC, I; SHI, M; SCHUBERT, M.M.; et al. Proteomic Analysis of Saliva from Patients with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v, 20, n. 7, p 1048-1055, 2014.

DHANDA, N.; TAHERI, S. A narrative review of obesity and hearing loss. *Int J Obes (Lond)*, v. 41, n. 7, p 1066-1073, 2017.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE/ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO. 4.ed. - São Paulo, SP., 2016.

DO PRADO, W.L; LOFRANO, M.C; OYAMA, L.M; et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 15, n. 5, 2009.

DOS SANTOS, L.C; TORRENT, I.F. O tecido adiposo e a produção de adipocinas. *SynThesis Revista Digital FAPAM*, , v.2, n.2, p 110-119, 2010.

DUARTE, T; SPENCER, C. Personalized Proteomics: The Future of Precision Medicine. *Proteomes*, v. 4, n.4, 2016.

EBERHARD, J; GROTE, K; LUCHTEFELD, M; et al. Experimental gingivitis induces systemic inflammatory markers in young healthy individuals: a single-subject interventional study. *Plos One*, v. 8, n. 2, 2013.

EHSES, J.A.; PERREN, A; EPPLER, E; et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 56, n. 9, p 2356-2370, 2007.

EL-BEBLAWY, N.M.S.; ANDRAWES, N.G.; ISMAIL, E.A.R; et al. Serum and Urinary Orosomucoid in Young Patients with Type 1 Diabetes: A Link between Inflammation, Microvascular Complications, and Subclinical Atherosclerosis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, v. 22, n. 8, p. 718–726, 2016.

ELIAS, J.E.; HAAS, W; FAHERTY, B.K.; et al. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nature Methods*, v. 2, n. 9, p. 667–675, 2005.

ENRIORI, Pj; EVANS, Ae; SINNAYAH, Puspha; et al. Leptin resistance and obesity. *Obesity*, v. 14, n. S8, p 245-258, 2006.

ESLER, M; VAZ, M; COLLIER, G; et al. Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidneys. *The Lancet*, v. 351, n. 9106, 1998.

FERNÁNDEZ-BLANCO, J.A; FAKIH, D; ARIKE, L; et al. Attached stratified mucus separates bacteria from the epithelial cells in COPD lungs. *JCI Insight*, v. 3, n. 17, 2018.

FERNANDEZ-SANCHEZ, A; MADRIGAL-SANTILLAN, E; BAUTISTA, M; et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*, v. 12, n. 5, p 3117–3132, 2011.

FLORIANO, P.N.; CHRISTODOULIDES, N; MILLER, C.S.; et al. Use of saliva-based nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: A feasibility study. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 8, p 1530-1538, 2009.



- FONSECA-ALANIZ, M.H; TAKADA, J; ALONSO-VALE, M.I.C; et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Jornal de Pediatria*, v. 83, n. 5, p 192-203, 2007.
- FOROUTAN, Behzad. Personalized Medicine: A Review with Regard to Biomarkers. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, v. 131, n. 10, p 1627–1638, 2015.
- FRADE, A.F; TEIXEIRA, F.C; IANNI, B.M; CHEVILLARD, C. Polymorphism in the Alpha Cardiac Muscle Actin 1 Gene Is Associated to Susceptibility to Chronic Inflammatory Cardiomyopathy. *Plos One*, 2013.
- FRANCHINI, R; PETRI, A; MIGLIARIO, M; et al. Poor oral hygiene and gingivitis are associated with obesity and overweight status in paediatric subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 38, n. 11, p 1021-1028, 2011.
- FRIEDMAN, J. M. Obesity in the new millennium. *Nature*, V. 404, n. 6778, p 632-634, 2000.
- GAO, G; XUAN, C; YANG, Q; et al. Identification of Altered Plasma Proteins by Proteomic Study in Valvular Heart Diseases and the Potential Clinical Significance. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, 2013.
- GENCO, R.J.; GROSSI, S.G.; HO, A; et al. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *Journal of Periodontology*, v. 76, n. 11, p 2075-2084, 2005.
- GHALAUT, P.; GHALAUT, V.; YADAV, S.; et al. Diagnostic applications of saliva. *V. 13, n. 2*, p 197-212, 2010.
- GHAZANFAR, S; FATIMA, I; ASLAM, M; et al. Identification of actin beta-like 2 (ACTBL2) as novel, upregulated protein in colorectal cancer. *Journal of Proteomics*, v. 152, p 33-40, 2017.
- GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE. *Gold 2017. Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease*, 2017.
- GOLIAS, Ch; CHARALABOPOULOS, A.; STAGIKAS, D.; et al. The kinin system-bradykinin: Biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system-bradykinin. *Hippokratia*, v. 11, n. 3, p 124-128, 2007.
- GONÇALVES, L.D.R; SOARES, M.R; NOGUEIRA, F.C.S; et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *Journal of Proteomics*, v. 73, n. 7, p 1334-1341, 2010.

GONCALVES, N; RONCON-ALBUQUERQUE JR., R; OLIVEIRA, M; et al. A high-calorie diet attenuates cachexia and adipose tissue inflammation in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Rev Port Cardiol*, v. 29, n. 3, p 391-400, 2010.

GONÇALVES, Nádia; FALCÃO-PIRES, Inês; LEITE-MOREIRA, Adelino Ferreira. Adipokines and their receptors: potential new targets in cardiovascular diseases. *Future Medicinal Chemistry*, 2015.

GOPAL, Deepa M.; KALOGEROPOULOS, Andreas P.; GEORGIOPOULOU, Vasiliki V.; et al. Serum albumin concentration and heart failure risk: The health, aging, and body composition study. *American Heart Journal*, v. 160, n. 2, p. 279–285, 2010.

GRANT, R.W, & DIXIT, V.D. Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity. Silver Spring*, v. 23, n. 3, p 512–518, 2015.

GREENBERG, Andrew S; OBIN, Martin S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 83, n. 2, p 461-465, 2006.

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

GUIMARÃES, D.E.D; SARDINHA, F.L.C; MIZURINI, D.M; et al. Adipocitocinas: Uma nova visão do tecido adiposo. *Revista de Nutricao*, v.20, n.5, p.549-559, 2007.

GUO, C; LIU, S; WANG, J; et al. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*, V. 417, p 39-44, 2013.

GUO, Dong Chuan; PANNU, Hariyadarshi; TRAN-FADULU, Van; et al. Mutations in smooth muscle  $\alpha$ -actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nature Genetics*, v. 39, n. 12, p 1488-1493, 2007.

HAN, T. S.; LEAN, M. E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovascular Disease*, 2016.

HANDSCHIN, C; SPIEGELMAN, B.M. The role of exercise and PGC1 $\alpha$  in inflammation and chronic disease. *Nature*, v. 454, n. 7203, p 463-469, 2008.

HANSON, D.R; GOTTESMAN, I.I; FAUST, D; et al. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Medical Genetics*, 2005.

- HARMAN-BOEHM, I; BLÜHER, M; REDEL, H; et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 92, n. 6, p 2240-7 ,2007.
- HARRIS, Mark F. The metabolic syndrome. *Australian family physician. Aust Fam Physician*, v 42, n. 8,p 524-527, 2013.
- HE, P. Personalized medicine: challenges in biomarker-related clinical trial design. *Clinical Investigation*, v. 5, n. 2, p 175–188, 2015.
- HIGASHI, Y; QUEVEDO, H.C; TIWARI, S; SUKHANOV, S; SHAI, S.Y; ANWAR, A; DELAFONTAINE, P. Interaction between insulin-like growth factor-1 and atherosclerosis and vascular aging. *Front Horm Res*, v. 43, p 107–24, 2014.
- HOCHEPIED, T; BERGER, F.G.; BAUMANN, H; et al.  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 14, n. 1, p 25-34, 2003.
- HOPKINS, T.A.; OUCHI, N; SHIBATA, R; et al. Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, v. 74, n. 1, p 11-18, 2007.
- HOTAMISLIGIL, G S; SHARGILL, N S; SPIEGELMAN, B M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, v. 259, n. 5091, p 87-91, 1993.
- HU, W.I; QIAO, S.; HOU, Q; et al. Plasma resistin is increased in patients with unstable angina. *Chinese medical journal*, v. 120, n. 10, p 871-875, 2007.
- HUANG, N; GIBSON, FC. Immuno-pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Curr Oral Health Rep*, v. 1, n. 2, p 124–132, 2014.
- HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, v. 2, n. 5–6, p. 231–237, 2009.
- HUYNH, R.A; MOHAN, C. Alzheimer's disease: Biomarkers in the genome, blood, and cerebrospinal fluid. 2017.
- ILKOVSKI, B; CLEMENT, S; SEWRY, C; et al. Defining  $\alpha$ -skeletal and  $\alpha$ -cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. *Neuromuscular Disorders*, v. 15, n. 12, p 829-835, 2005.
- IOZZO, Patricia. Myocardial, perivascular, and epicardial fat. *Diabetes care*, v. 34, n. 2, p 371-379, 2011.

- ITO, A; SUGANAMI, T; YAMAUCHI, A; et al. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 51, p 35715-35723, 2008.
- JAIN, K.K. Role of Proteomics in the Development of Personalized Medicine. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, v. 102, p 41-52, 2016.
- JABLONSKI, A.M; LAMITINA, T; LIACHKO, N.F; KALB, R.G. Loss of RAD-23 Protects Against Models of Motor Neuron Disease by Enhancing Mutant Protein Clearance. *J Neurosci*, v. 35, n. 42, p 4286-4306, 2015.
- JING, Z; HOU, X; WANG, Y; YANG, G; WANG, B; TIAN, X, et al. Association between insulin-like growth factor-1 and cardiovascular disease risk: evidence from a meta-analysis. *Int J Cardiol*, v. 198, p 1–5, 2015.
- JOOSTEN, M.M.; PAI, J.K.; BERTOIA, M.L.; et al.  $\beta$ 2-Microglobulin, cystatin C, and creatinine and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Journal of the American Heart Association*, v. 3, n. 4 2014.
- KADOWAKI, T; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Ver*, V. 26, n. 3, p 439-451, 2005.
- KAJIMURA, S; SEALE, P; SPIEGELMAN, B.M. Transcriptional Control of Brown Fat Development. *International Journal of Endocrinology*, 2010.
- KANG, Y.E; KIM, J.M; JOUNG, K.H; et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. *PLoS ONE*, v. 11, n. 4, 2016.
- 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 840–846, 2006.
- KAPTOGE, S.; WHITE, I. R.; THOMPSON, S. G.; et al. Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: Individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies. *American Journal of Epidemiology*, v. 166, n. 8, p. 867–879, 2007.
- KARMIRIS, K; KOUTROBAKIS, I E; XIDAKIS, C; et al. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 12, n. 2, p 100-105, 2006.

- Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI: Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, v. 474, . n 7351, p 327–336. 2011
- KARUWANARINT, P; PHONRAT, Bk; TUNGTRONGCHITR, A; et al. Vitamin D-binding protein and its polymorphisms as a predictor for metabolic syndrome. *Biomarkers in Medicine*, v. 12, n. 5, p. 465–473, 2018.
- KAYAL, R.A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed Research International*, 2013.
- KEDDIS, Mira T.; RULE, Andrew D. Nephrolithiasis and loss of kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 22, n. 4, p 390-396, 2013.
- KHADER, Y.S; BAWADI, H.A; HAROUN, T.F; et al. The association between periodontal disease and obesity among adults in Jordan. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 36, n. 1, p 18-24, 2009.
- KIM, J.J; KIM, C.J; CAMARGO, P.M. Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. *Journal of the California Dental Association*, . 41, n. 2, p 119-24, 2013.
- KIM, M.Y; JEE, S.H; YUN, J.E; BAEK, S.J; LEE, D.C. Hemoglobin Concentration and Risk of Cardiovascular Disease in Korean Men and Women - The Korean Heart Study. *Cardiovascular Disorders*, v. 28, p 1316-1322, 2013.
- KONRAD, A; LEHRKE, M; SCHACHINGER, V; et al. Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *European journal of gastroenterology & hepatology*, v. 19, n. 12, p 1070-1074, 2007.
- KOTA, S.K.; PERNICONE, E; LEAF, D.E.; et al. BPI Fold-Containing Family A Member 2/Parotid Secretory Protein Is an Early Biomarker of AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 28, n. 12, p 3473-3478, 2017.
- KOULMANDA, M.; BHASIN, M.; HOFFMAN, L.; et al. Curative and cell regenerative effects of 1-antitrypsin treatment in autoimmune diabetic NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 42, p. 16242–16247, 2008.
- KRYSIAK, R; HANDZLIK-ORLIK, G; OKOPIEN, B. The role of adipokines in connective tissue diseases. *Eur J Nutr*, v. 51, n. 5, p 513-528, 2012.
- LABBÉ, R.F.; DEWANJI, A. Iron assessment tests: Transferrin receptor vis-à-vis zinc protoporphyrin. *Clin Biochem*, v. 37, n. 3, p 165-174, 2004.

LAGO, F; DIEGUEZ, C; GÓMEZ-REINO, J; et al. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*, v. 3, n. 12, p 716-724, 2007.

LAGO, F; GÓMEZ, R; GÓMEZ-REINO, J.J.; et al. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* v. 34, n. 10, p 500-510, 2009.

LANDECK, L; KNEIP, C; REISCHL, J; et al. Biomarkers and personalized medicine: Current status and further perspectives with special focus on dermatology. *Experimental Dermatology*, v. 25, n. 5, p 333-339, 2016.

LAVIE, C.J.; MILANI, R.V.; VENTURA, H.O. Obesity and Cardiovascular Disease. Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *J Am Coll Cardiol*, v. 53, n. 21, p 1925-1932, 2009.

LEE, J.M; GARON, E; WONG, D.T. Salivary diagnostics. *Orthodontics & Craniofacial Research*, v. 12, n. 3, p 206-211, 2009.

LEE, G; CHOI, S; KIM, K; et al. Association between changes in hemoglobin concentration and cardiovascular risks and all-cause mortality among young women. *Journal of the American Heart Association*, v. 7, n. 16, 2018.

LEE, J; MACHIN, M; RUSSELL, K.E.; et al. Corticosteroid modulation of immunoglobulin expression and B-cell function in COPD. *FASEB Journal*, v. 30, n. 5, p. 2014–2026, 2016.

LIU, J; DIVOUX, A; SUN, J; et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nature Medicine*, v. 15, n. 8, p 940-945, 2009.

BORGES, L.P; TEREZAN, M.L.F; BITTENCOURT, M.S.P. Obesidade Como Fator De Risco À Doença Periodontal: Revisão De Literatura. *Braz J Periodontol*, v. 23, n. 2, p 33-38, 2013.

LU, H; FAGNANT, P.M.; BOOKWALTER, C.S.; et al Vascular disease-causing mutation R258C in ACTA2 disrupts actin dynamics and interaction with myosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 31, p 4168-4177, 2015.

LU, X; PAN, J; LI, S; et al. Establishment of a Predictive Genetic Model for Estimating Chemotherapy Sensitivity of Colorectal Cancer with Synchronous

Liver Metastasis. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, v. 28, n. 7, p 552–558, 2013.

MADJID, M; WILLERSON, J.T. Inflammatory markers in coronary heart disease. *British Medical Bulletin*, v. 100, n. 1, p 23-38, 2011.

MAIO, R; SCIACQUA, A; BRUNI, R; et al. Association between hemoglobin level and endothelial function in uncomplicated, untreated hypertensive patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 6, n. 3, p 648-655, 2011.

MARTINEZ, FO.; HELMING, L; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*, v. 2, p 451-483, 2009.

MARTINEZ-HERRERA, M; SILVESTRE-RANGIL, J; SILVESTRE, F. J. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, V. 22, n. 6, p 708-715, 2017.

MATSSON, H; EASON, J; BOOKWALTER, C.S.; et al. Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. *Human Molecular Genetics*, v. 17, n. 2, p 256-265, 2008.

MATSUMOTO-NAKANO, M.; TSUJI, M.; AMANO, A.; et al. Molecular interactions of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen c in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 23, n. 4, p 265-270, 2008.

MATSUZAWA, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *Expert Review of Clinical Immunology*, v. 580, n. 12, p 2917-2921, 2007.

MATSUZAWA, Y. Therapy insight: Adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, v. 3, n. 1, p 35-42, 2006.

MATTU, H S; RANDEVA, H S. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol*, v. 216, n. 1, p 17-36, 2013.

MCGHEE, D.J.M.; RITCHIE, C.W.; THOMPSON, P.A.; et al. A Systematic Review of Biomarkers for Disease Progression in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.

- MESTRINER, F L a C; SPILLER, F; LAURE, H J; et al. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Proc Natl Acad Sci U S A, v. 104, n. 49, p. 19595–19600, 2007.
- MITIDIERI, T.L; GOMES, R.Pinho; PIMENTEL, V.P; et al. Medicina personalizada : um novo paradigma da P & D farmacêutica ? BNDES Setorial, n. 43, p 5-40, 2016.
- MOLL, R; HOLZHAUSEN, H.J; MENNEL, H.D; et al. The cardiac isoform of  $\alpha$ -actin in regenerating and atrophic skeletal muscle, myopathies and rhabdomyomatous tumors: An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Virchows Archiv*, v. 449, n. 2, p 175-191, 2006.
- MOSCHEN, A.R; GERNER, R.R; TILG, H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. *Current pharmaceutical design*, v. 16, n. 17, p 1913-1920, 2010.
- MOULIN, C.M; MARGUTI, I; PERON, J.P.S; et al. Impact of adiposity on immunological parameters. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v. 53, n.2, p 183-189, 2009.
- NAKAMURA, K; FUSTER, J.J.; WALSH, K. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol*, v. 63, n.4, p 250-9, 2014.
- NISHIDA, N; TANAKA, M; HAYASHI, N; et al. Determination of Smoking and Obesity as Periodontitis Risks Using the Classification and Regression Tree Method. *Journal of Periodontology*, v. 76, n.6, p 923-928, 2005.
- NISHIMURA, M; IZUMIYA, Y; HIGUCHI, A; et al. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation*, v. 117, n. 2, p 216-223, 2008.
- OHMURA, K; ISHIMORI, N; OHMURA, Y; et al. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 30, n. 2, p 193-199, 2010.
- OLEFSKY, J.M.; GLASS, C.K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annual Review of Physiology*, v. 72, n. 219-246, 2010.



- OLSON, T.M.; DOAN, T.P.; KISHIMOTO, N.Y.; et al. Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 32, . 9, p 1687-1694, 2000.
- ONAT, A; HERGENC, G; CAN, G; KAYA, Z; YUKSEL, H. Serum complement C3: a determinant of cardiometabolic risk, additive to the metabolic syndrome, in middle-aged population. *Metabolism*, v. 59, n. 5, p 628–634, 2010.
- ONG, Frank S.; DEIGNAN, Joshua L.; KUO, Jane Z.; et al. Clinical utility of pharmacogenetic biomarkers in cardiovascular therapeutics: A challenge for clinical implementation. *Pharmacogenomics*, v. 13, n. 4, p 465-75, 2012.
- OUCHI, N; OHASHI, K; SHIBATA, R; et al. Protective Roles of Adipocytokines and Myokines in Cardiovascular Disease. *Circulation Journal*, v. 80, n. 10, p 2073-2080, 2016.
- PERLSTEIN, Meyer I.; BISSADA, Nabil F. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1977.
- PHILLIPS, C.M.; PERRY, I.J. Does inflammation determine metabolic health status in obese and nonobese adults? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 98, n. 10, p 1610-1619, 2013.
- PIHLSTROM, B L; MICHALOWICZ, B S; JOHNSON, N W. Periodontal diseases. *The Lancet*, v. 366, n. 9499, p 1809-1820, 2005.
- PINHO, J.R.R; SITNIK, R; MANGUEIRA, C.L.P. Personalized medicine and the clinical laboratory. *Einstein*, v. 12, n. 3, p 366-373, 2014.
- PISCHON T, HU FB, GIRMAN CJ, RIFAI N, MANSON JE, REXRODE KM, RIMM EB. Plasma total and high molecular weight adiponectin levels and risk of coronary heart disease in women. *Atherosclerosis*, v. 219, n. 1, p 322–329, 2011.
- POPKIN, B.M.; ADAIR, L.S.; NG, S.W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, v. 70, n. 1, p 3-21, 2012.
- PORTER, S.A.; MASSARO, J.M.; HOFFMANN, U; et al. Abdominal subcutaneous adipose tissue: A protective fat depot? *Diabetes Care*, v. 32, n. 6, p 1068-1075, 2009.
- PRADEEP, A.R; RAGHAVENDRA, N.M; PRASAD, M.V Ramchandra; et al. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in

periodontal health and disease. *Journal of periodontology*, v. 82, n. 9, p 1314-1319, 2011.

PUCHAU, B; ZULET, M.A; Gonzalez, E.A; Navarro-Blasco, I; Martinez, J. A. Selenium intake reduces serum C3, an early marker of metabolic syndrome manifestations, in healthy young adults. *Eur. J. Clin. Nutr*, v. 63, n. 7, p 858–864, 2009.

RAMELLA, M; BERNARDI, P; FUSARO, L; et al. Relevance of inflammation and matrix remodeling in abdominal aortic aneurysm (AAA) and popliteal artery aneurysm (PAA) progression. *American Journal of Translational Research*, v. 10, n. 10, p. 3265–3275, 2018.

REGALADO, E.S.; GUO, D.C; PRAKASH, S; et al. Aortic Disease Presentation and Outcome Associated with ACTA2 Mutations. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, v. 8, n. 3, p 457-464, 2015.

ROTHSTEIN, J.D. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, v. 65, n. 1, p 3-9, 2009.

SAITO, M. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes Metab J*, v.37, n. 1, p 22–29, 2013.

SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y.; KIOHARA, Y.; et al. Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: The Hisayama study. *J Periodontal Res*, 40, n. 4, p 346-353, 2005.

SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y.; KOGA, T.; et al. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *Journal of Dental Research*, v. 80, n. 7, p 1631-1636, 2001.

SAITO, T.; YAMAGUCHI, N.; SHIMAZAKI, Y.; et al. Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: The hisayama study. *Journal of Dental Research*, v. 87, n. 4, p 319-22, 2008.

SAITO, T; SHIMAZAKI, Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *V*. 43, n. 1, p 254-266, 2007.

SAITO, T; SHIMAZAKI, Y; SAKAMOTO, M. Obesity and periodontitis. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 7, p 482-483, 1998.

SANDSTRÖM, C. S.; OHLSSON, B.; MELANDER, O.; et al. An association between Type 2 diabetes and  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Diabetic Medicine*, v. 25, n. 11, p. 1370–1373, 2008.

SANTOS, E.O; JR, N.A; DIAS, G.M; MAZOTTO, A.M; VERMELHO, A; VORA, G.J; WILSON, B; BELTRAN, V.H; BOURNE, D.G; ROUX, F.R.L; THOMPSON, F.L. Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. *The ISME Journal*, v. 5, n. 9, p 1471-83, 2011.

SATPATHY, A; RAVINDRA, S; THAKUR, S; et al. Serum interleukin-1 $\beta$  in subjects with abdominal obesity and periodontitis. *Obesity Research and Clinical Practice*, v. 9, n. 5, p 513-521, 2015.

SAWICKI, K.T; CHANG, H.C; ARDEHALI, H. Role of heme in cardiovascular physiology and disease. *J Am Heart Assoc*, v. 4, n. 1, 2015.

SCHALK, .

BW.M.; VISSER, M.; BREMMER, M. A.; et al. Change of serum albumin and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: Longitudinal Aging Study Amsterdam. *American Journal of Epidemiology*, v. 164, n. 10, p. 969–977, 2006.

SCHIPPER, Henk S.; PRAKKEN, Berent; KALKHOVEN, Eric; et al. Adipose tissue-resident immune cells: Key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab*, v. 23, n. 8, p 407-415, 2012.

SCHIPPER, H.S; RAKHSHANDEHROO, M; VAN DE GRAAF, S. F.J; et al. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, v. 122, n. 9, p 3343-3354, 2012.

SEMSARIAN, C; INGLES, J; MARON, M.S.; et al. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, v. 65, n. 12, p 1249-1254, 2015.

SENGENÈS, C; MIRANVILLE, A; MAUMUS, M; et al. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem cells*, v. 25, n. 9, p 2269-2276, 2007.

SFASCIOTTI, G.L. Childhood overweight-obesity and periodontal diseases: is there a real correlation? *Annali di Stomatologia*, v. 7, n. 3, p 65–72, 2016.

SHAH, A; MEHTA, N; REILLY, M.P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, v. 32, n. 6, p 638-644, 2008.

SHEN, J; SAKAIDA, I; UCHIDA, K; et al. Leptin enhances TNF- $\alpha$  production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sciences*, v. 77, n. 13, p 1502-1515, 2005.

SHIBATA, R; OUCHI, N; OHASHI, K; et al. The role of adipokines in cardiovascular disease. *J Cardiol*, v. 70, n. 4, p 329-334, 2017.

SHIVA, S; WANG, X; RINGWOOD, L A.; et al. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nature Chemical Biology*, v. 2, n. 9, p. 486–493, 2006.

SHRIVASTAVA, A.K; SINGH, H.V; RAIZADA, A; et al. C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *Tex Heart Inst J*, v. 32, n. 3, 384–386, 2015.

SHUKLA, N; MAHER, John; MASTERS, Joseph; et al. Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? [s.l.: s.n.], 2006.

SIEGEL, Rebecca L; MILLER, Kimberly D; JEMAL, Ahmedin. *Cancer Statistics*, 2017. CA: a cancer journal for clinicians, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SIERRA-JOHNSON, J; ROMERO-CORRAL, A; LOPEZ-JIMENEZ, Fr; et al. Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *The American journal of cardiology*, v. 100, n. 2, p 234–239, 2007.

SIMON, R. Advances in clinical trial designs for predictive biomarker discovery and validation. *Current Breast Cancer Reports*, v. 1, n. 4, p 216–221, 2009.

SIPPEL, C; MUNDSTOCK, A.B.R; GIOVANELLA, J; et al. PROCESSOS INFLAMATÓRIOS DA OBESIDADE. *Revista de Atenção à Saúde*, v. 12, n 42, p 48-56, 2014.

SLODKOWSKA, E.A.; ROSS, J.S. MammaPrint<sup>TM</sup> 70-gene signature: Another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn*, v. 9, n. 5, p 417-422, 2009.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology *Periodontol* 2000, v. 38, n. 1, p 135-187, 2005.

SOLA, E; VAYA, A; SIMO, M; et al. Canadian Cardiovascular Society and Choosing Wisely Canada: The Road to Creating a List of Five Things Physicians

and Patients Should Question. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 30, n. 8, p. 949–955, 2014.

SOUSLOVA, T; MARPLE, T C.; SPIEKERMAN, A.M; et al. Personalized medicine in Alzheimer's disease and depression. *Contemp Clin Trials*, v. 36, n. 2, p 616-623, 2013.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, v. 409, n. 6818, p 307-312, 2001.

STEVENS, G.A.; SINGH, G.M.; LU, Y; et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Population Health Metrics*, v. 10, n. 1, 2012.

STOCKLEY, R.A. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease: confusing or useful? *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, v. 9, n. 1, p 163-177, 2014.

STRIMBU, K; TAVEL, J.A. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, v. 5, n. 6, p 463–466, 2010.

SUN, W; FENG, Y; YAO, X.D; et al. Urinary angiotensinogen is elevated in patients with nephrolithiasis. *BioMed Research International*, 2014.

SUVAN, J; D'AIUTO, F; MOLES, D.R.; et al. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Ver*, v. 12, n. 5, p 381-404, 2011.

TABÁK, A.G.; KIVIMÄKI, M.; BRUNNER, E.J.; et al. Changes in C-reactive protein levels before type 2 diabetes and cardiovascular death: The Whitehall II study. *European Journal of Endocrinology*, v. 163, n. 1, p 89-95, 2010.

TANG, H.Y; BEER, L.A; TANYI, J.L; ZHANG, R; LIU, Q; SPEICHER, D.W. Protein isoform-specific validation defines multiple chloride intracellular channel and tropomyosin isoforms as serological biomarkers of ovarian cancer. *J Proteomics*, v. 89, n 26, p 165-178, 2013.

TATEYA, S; KIM, F; TAMORI, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol*, v., 8, n. 4, 2013.

TOPALIAN, S.L.; HODI, F.S; BRAHMER, J.R.; et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 366, n. 26, p 2443-54 2012.

TRAVERS, R. L.; MOTTA, A. C.; BETTS, J. A.; et al. The impact of adiposity on adipose tissue-resident lymphocyte activation in humans. *International Journal of Obesity*, v. 39, n. 5, p 762-769, 2015.

TRAYHURN, P; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, v. 92, n. 3, p 347-355, 2004.

UNIPROT, 2018. Disponível em: < <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DOY2>>. Acesso em: 29 dez. 2018.

VAIOPOULOS, A.G.; MARINOU, K; CHRISTODOULIDES, C; et al. The role of adiponectin in human vascular physiology. *Int J Cardiol*, v. 155, n. 2, p 188-193, 2012.

VAN DIJK, S.J.; FESKENS, E.J.M.; GEERT HEIDEMA, A.; et al. Plasma protein profiling reveals protein clusters related to BMI and insulin levels in middle-aged overweight subjects. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, 2010.

VAN GAAL, L F; MERTENS, I L; DE BLOCK, C E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, v. 444, n. 712, p 875-880, 2006.

VASKO, R; BLASCHKE, S; DIHAZI, H et al. Comparative Serum Proteomic Analysis of Differentially Regulated Proteins in Patients with Rheumatoid Arthritis and Healthy Volunteers. *Journal of Arthritis*, v. 5, n. 3, 2016.

VERHAGEN, S.N.; VISSEREN, F.L.J. Perivascular adipose tissue as a cause of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 214, n. 1, p 3-10, 2011.

VESTBO, J; HURD, S.S; AGUSTI, A.G; et al. Global strategy for the diagnosis , management , and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.187, n. 4, p 347-365, 2013.

WANG, Q; LI, X; REN, S; et al. Serum levels of the cancer-testis antigen POTEE and its clinical significance in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE*, v. 10, n 4, 2015.

WATSON, M.B.; LIND, M.J.; SMITH, L; et al. Expression microarray analysis reveals genes associated with in vitro resistance to cisplatin in a cell line model. *Acta Oncologica*, v. 46, n. 5, p 651-658, 2007.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D; DESAI, M; et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, p 1796-1808, 2003.

WENSVEEN, F.M.; JELENČIĆ, V; VALENTIĆ, S; et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nature Immunology*, v. 16, n. 4, p 376-385, 2015.

WENSVEEN, F.M.; VALENTIĆ, S; ŠESTAN, M; et al. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur J Immunol*, v. 45, n. 9, p 2446-2456, 2015.

WENTWORTH, J.M.; NASELLI, G; BROWN, W.A.; et al. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes*, v. 59, n. 7, p 1648-1656, 2010.

WEYER, C; FUNAHASHI, T; TANAKA, S; et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 86, n. 5, p 1930-1935, 2001.

WHITE, N.M; MASUI, O; DESOUZA, L.V; KRAKOVSKA, O; METIAS, S; ROMASCHIN, A.D; HONEY, R.J; STEWART, R; PACE, K; LEE, J; JEWETT, M.A; BJARNASON, G.A; SIU, K.W; YOUSEF, G.M. Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma. *Oncotarget*, v. 5, n. 2, p 506–518, 2014.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C; GOOLEY, A.A.; et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 13, n. 1, p 19-50, 1996.

WILLIS, J.C.D.; LORD, G.M. Immune biomarkers: The promises and pitfalls of personalized medicine. *Nat Rev Immunol*, v. 5, n. 5, p 323-329, 2015.

WINDHAM, B.G; GRISWOLD, M.E.; FARASAT, S.M; et al. Influence of leptin, adiponectin, and resistin on the association between abdominal adiposity and arterial stiffness. *American Journal of Hypertension*, v. 23, n. 5, p 501-507, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>.

Acesso em 13 de fevereiro de 2019(a).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular disease. Disponível em: <[https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/)>. Acesso em 13 de fevereiro de 2019(b).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 facts on obesity. Disponível em: <[https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/)>. Acesso em 13 de fevereiro de 2019(c).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. BMI classification. Disponível em: <[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)>. Acesso em 13 de fevereiro de 2019(d).

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Environmental Health, 2001.

WOZNIAK, S.E.; GEE, L.L.; WACHTEL, M.S.; et al. Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article. Dig Dis Sci, v.54, n. 9, p 1847-1856, 2009.

WU, Jun; BOSTRÖM, Pontus; SPARKS, Lauren M.; et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell, 2012.

WU, L; YANG, M; FENG, X; JIN, L; WU, C; CUI, S; ZHOU, Z; ZHONG, X; SHI, M; YANG, Z; CAO, W. WU, Y.; SHU, R.; LUO, L. J.; et al. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. Journal of Periodontal Research, v. 44, n. 5, p 636-644, 2009.

XU, H; BARNES, G.T; YANG, Q; et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of clinical investigation, v.112, n. 12, p 1821-1830, 2003.

YANG, X.; CHEN, C.; TIAN, J.; et al. Urinary Angiotensinogen Level Predicts AKI in Acute Decompensated Heart Failure: A Prospective, Two-Stage Study. Journal of the American Society of Nephrology, v. 26, n. 8, p. 2032–2041, 2015.

YARMOLINSKY, J; BORDIN BARBIERI, N; WEINMANN, T; et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of observational studies. Scientific Reports, v. 6, 2016.

YI, L; HAO, M; LU, T; et al. Increased Kappa/Lambda Hybrid Antibody in Serum Is a Novel Biomarker Related to Disease Activity and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. Mediators of Inflammation, 2016.

YIU, W.H; WONG, D.W. L; CHAN L.Y. Y; LEUNG J. C. K; CHAN, K. W; LAN,H.Y; LAI, K.H; TANG, S.C.W. Tissue Kallikrein Mediates Pro-Inflammatory Pathways



and Activation of Protease-Activated Receptor-4 in Proximal Tubular Epithelial Cells. *Plos One*, 2014.

YUCEL-LINDBERG, T; BVA AGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 15, 2013.

YUDKIN, J.S.; ERINGA, E; STEHOUWER, C.D.A. “Vasocrine” signalling from perivascular fat: A mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *The Lancet*, v. 365, n. 9473, p 1817-1820, 2005.

YUSUF, S; HAWKEN, S; OUNPUU, S; et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*, v. 366, n. 9497, p 1640-1649, 2005.

ZHANG, B; LU, Y; CAMPBELL-THOMPSON, M; et al. A1-Antitrypsin Protects B-Cells From Apoptosis. *Diabetes*, v. 56, n. 5, p. 1316–1323, 2007.

ZHANG, F; WANG, S; SIGNORE, A P; et al. Neuroprotective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-glucose deprivation and transient cerebral ischemia. *Stroke*, v 38, n. 8, p 2329-2333, 2007.

ZHANG, Y; PROENCA, R; MAFFEI, M; et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v. 372, n. 6505, p 425-432, 1994.

ZIEGLER, A; KOCH, A; KROCKENBERGER, K; et al. Personalized medicine using DNA biomarkers: A review. *Hum Genet*, v. 131, n. 10, p 1627-1638, 2012.

ZOU, X; FENG, B; DONG, T; YAN, G; TAN, B; SHEN, H; HUANG, A; ZHANG, X; ZHANG, M; YANG, P; ZHENG, M; ZHANG, Y. Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis. *J Proteomics*, v. 94, p 473–485, 2-13.

ZWAKA, T.P.; HOMBACH, V; TORZEWSKI, J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: Implications for atherosclerosis. *Circulation*, v. 103, n. 9, p 1194-1197, 2001.



## **Anexo 1**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Proteoma do plasma e da saliva em adultos jovens com obesidade e sobrepeso como possível biomarcador precoce de doença periodontal e cardiovascular”**. Você foi selecionado por ordem de chegada e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição (Unigranrio).

Os objetivos deste estudo são estudar as associações entre o exame clínico das gengivas, sua massa corporal (peso), pressão sanguínea arterial e a identificação do perfil das proteínas presentes no sangue e na saliva.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário sobre dados pessoais e de saúde geral e bucal, ser examinado pelo dentista (gengivas e dentes), fornecer amostras de sangue, ser pesado e medido (altura e circunferência da cintura e do quadril).

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos.

Os benefícios relacionados com a sua participação um melhor conhecimento do seu estado de saúde bucal e geral e encaminhamento para tratamento das necessidades encontradas.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de

forma a possibilitar sua identificação. Os resultados de seus exames serão confidenciais, ou seja, somente o pesquisador terá acesso a suas informações e serão utilizados somente para o objetivo do presente estudo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Carlos Vinicius Ferreira da Silva no telefone 974807050 ou no e-mail [cviniciusbio@gmail.com](mailto:cviniciusbio@gmail.com), ou com Carina Maciel da Silva Boghossian no telefone 26727776 ou e-mail [carinabogho@unigranrio.edu.br](mailto:carinabogho@unigranrio.edu.br), ou com Eidy de Oliveira Santos no telefone 2333-6961 ou e-mail [eidynos@gmail.com](mailto:eidynos@gmail.com).

---

Pesquisador Responsável: Carlos Vinicius Ferreira da Silva

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO: [cep@unigranrio.com.br](mailto:cep@unigranrio.com.br)

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Sujeito da pesquisa

## Anexo 2

UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Proteoma do plasma e da saliva em adultos jovens com obesidade e sobrepeso como possível biomarcador precoce de doença periodontal e cardiovascular

**Pesquisador:** CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 68741617.0.0000.5283

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.160.823

#### Apresentação do Projeto:

A obesidade é um estado crônico relacionado a múltiplas comorbidades como hipertensão, diabetes tipo 2, doenças periodontais e cardiovasculares. A obesidade acarreta um aumento na liberação de proteínas denominadas adipocinas, que podem ser encontradas no plasma sanguíneo e na saliva, criando um processo inflamatório prolongado e de baixa intensidade. O processo inflamatório apresentado na obesidade aumenta o risco para doenças cardiovasculares e periodontais. O objetivo do presente estudo é analisar o proteoma do plasma e da saliva de adultos jovens com obesidade e sobrepeso em comparação com indivíduos eutróficos, e determinar possíveis biomarcadores para as doenças periodontal e cardiovascular. A população de estudo será constituída por 45 alunos e/ou funcionários da Unigranrio, Campus I. Serão incluídos indivíduos com idades entre 18 e 35 anos com pelo menos 20 dentes. Os indivíduos serão categorizados conforme suas medidas antropométricas em eutróficos, com sobrepeso ou obesos. Os indivíduos responderão a questionários anamnésicos; serão examinados quanto à saúde odontológica; terão suas medidas antropométricas mensuradas; terão sua pressão arterial sistêmica aferida; além de serem submetidos à coleta de saliva e de sangue periférico. As amostras de saliva e de sangue coletadas serão submetidas a extração proteica segundo protocolos padronizados. A concentração das proteínas de saliva e plasma serão mensuradas por kits

**Endereço:** Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

**Bairro:** 25 de Agosto

**CEP:** 25.071-202

**UF:** RJ

**Município:** DUQUE DE CAXIAS

**Telefone:** (21)2672-7733

**Fax:** (21)2672-7733

**E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 2.160.823

comerciais e caracterizadas por espectrometria de massas. Diferenças significativas nos parâmetros clínicos entre os grupos de saúde e doença periodontal e cardiovascular serão avaliadas pelos testes Kruskal-Wallis e/ ou ANOVA. Os dados categóricos serão avaliados através do teste Qui-quadrado e/ou teste exato de Fischer. O nível de significância a ser utilizado será 5%.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo do presente estudo é analisar o proteoma do plasma e da saliva de adultos jovens com obesidade e sobrepeso, e determinar possíveis biomarcadores para as doenças periodontal e cardiovascular.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos, pois serão realizados procedimentos de exame de rotina e coleta de sangue e saliva seguindo normas de biossegurança.

Os benefícios para o participante serão um melhor conhecimento de seu estado de saúde bucal e geral e encaminhamento para tratamento das necessidades encontradas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante que pretende avaliar que Indivíduos obesos e com sobrepeso apresentam biomarcadores protéticos para doença periodontal e/ ou cardiovascular comparados a eutróficos. Adultos jovens serão submetidos a questionário anamnésico, mensurações antropométricas e de pressão arterial, e coletas de sangue e de saliva. As mensurações antropométricas serão utilizadas para classificar os indivíduos em eutróficos (n = 15), obesos (n = 15) e com sobrepeso (n = 15). As amostras de sangue e saliva serão analisadas através de técnicas bioquímicas e de espectrometria de massa para a determinação de seus proteomas. Finalmente, apenas as proteínas para as quais um ou dois peptídeos únicos forem identificadas serão relatadas ao final deste estudo na identificação de possíveis biomarcadores das condições clínicas estudadas (doenças periodontal e cardiovascular).

Encontram-se claramente delineados no projeto de pesquisa os critérios de inclusão e de exclusão dos participantes da pesquisa.

A casuística será uma amostra de conveniência constituída por indivíduos com sobrepeso, obesidade e eutróficos. A população do estudo será selecionada por um período de 6 meses consecutivos, entre estudantes e funcionários da Unigranrio que aceitarem o convite de participação voluntária, respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão. Estima-se que neste

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160  
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202  
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS  
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br



UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 2.160.823

período sejam incluídos aproximadamente 30 indivíduos distribuídos, respectivamente, pelos três grupos – eutróficos, com sobrepeso e obesos. Os indivíduos selecionados serão informados sobre os detalhes do projeto e deverão concordar com a avaliação clínica, metabólica e molecular. Todos assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Serão registrados em questionário anamnésico o gênero, a raça, a renda familiar, dados de saúde geral e odontológica. Avaliação Clínica: Exame intra-oral (exame periodontal e dentário), antropométrico (peso e altura para cálculo do IMC, circunferência de cintura e quadril) e mensuração da pressão arterial. Análise do sangue - bioquímica: a) Glicemia de jejum – Método enzimático (hexoquinase). b) Insulina – Determinada por ELISA. c) Índice de resistência à insulina – aplicação da fórmula do HOMA-IR d) Perfil lipídico. Análise proteômica: a) Extração das proteínas da saliva) Extração das proteínas do plasma) Caracterização das proteínas) Digestão das proteínas em In-Gele) Análise por Espectrometria de massa (LC-ESI-MS/MS).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os Termos de apresentação obrigatória encontram-se corretamente inseridos na Plataforma Brasil em consonância com a Resolução CNS nº 466/2012.

**Recomendações:**

Recomendo que os resultados da pesquisa, favoráveis ou não, sejam divulgados em eventos científicos e publicações na forma de artigos e textos em revistas indexadas pelo Qualis.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O protocolo de pesquisa em apreço atende aos requisitos da Resolução CNS nº 466/2012 inexistindo, portanto, pendências ou inadequações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comitê de ética em Pesquisa da Unigranrio atendendo o previsto na Resolução nº 466/12 do CNS/MS aprovou o referido projeto na reunião ocorrida em 08 de julho de 2017. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa será necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160  
Bairro: 25 de Agosto CEP: 25.071-202  
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS  
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br

**UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO**



Continuação do Parecer: 2.160.023

Cordialmente,  
CEP/Unigranrio.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                                           | Arquivo                                      | Postagem               | Autor                             | Situação |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                           | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_918589.pdf | 23/05/2017<br>13:11:08 |                                   | Aceito   |
| Folha de Rosto                                           | fohaderosto.docx                             | 23/05/2017<br>13:07:26 | CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA | Aceito   |
| Outros                                                   | CartadaAnuência.jpg                          | 23/05/2017<br>12:48:01 | CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                | projeto.docx                                 | 23/05/2017<br>12:44:00 | CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA | Aceito   |
| Orçamento                                                | Orcamento.jpg                                | 17/05/2017<br>21:33:44 | CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA | Aceito   |
| TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tce/Vinicius.doc                             | 16/05/2017<br>15:04:43 | CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA | Aceito   |
| Cronograma                                               | cronogramacep/Vinicius.docx                  | 16/05/2017<br>15:01:36 | CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA | Aceito   |

Situação do Parecer:  
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:  
Não

DUQUE DE CAXIAS, 06 de Julho de 2017

---

Assinado por:  
Renato Genquira Zambrotti  
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160  
Bairro: 25 de Agosto CEP: 28.071-202  
UF: RJ Município: DUQUE DE CAXIAS  
Telefone: (21)2672-7733 Fax: (21)2672-7733 E-mail: cep@unigranrio.com.br