



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TÉCNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Avaliação de alterações na composição e função proteica da saliva induzidas por perda de peso

Carla Sofia da Silva Simões

Orientação: Doutora Elsa Lamy

Professora Doutora Ana Rodrigues Costa

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TÉCNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Avaliação de alterações na composição e função proteica da saliva induzidas por perda de peso

Carla Sofia da Silva Simões

Orientação: Doutora Elsa Lamy

Professora Doutora Ana Rodrigues Costa

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Agradecimentos

Gostaria de expressar um agradecimento especial às orientadoras Dra. Elsa Lamy e Professora Ana Costa por todo o apoio, dedicação e compreensão ao longo da orientação na realização deste trabalho.

Da mesma forma, agradeço todo o apoio, atenção e ajuda prestada pela professora Dra. Célia Antunes, bem como a todos os colegas que integraram o grupo de Obesidade & Diabetes e técnicas de laboratório, que permitiram o desenvolvimento do meu trabalho, ajudaram a ultrapassar dificuldades e a criar momentos de lazer bastante gratificantes.

Agradeço a todos os amigos e colegas que me apoiaram no decorrer deste trabalho, ao longo de todo o percurso académico e que me permitiram o culminar desta fase da melhor forma, bem como contribuíram para a minha formação quer académica quer pessoal.

Por fim, agradeço à minha família por todo o apoio que me deram no decorrer deste trabalho, percurso académico e de toda a minha vida, em especial à minha irmã por todo o carinho, disponibilidade e ajuda. E um eterno agradecimento à minha avó Sara pela força, dedicação, amor e valores que me transmitiu.

Avaliação de alterações na composição e função proteica da saliva induzidas por perda de peso

Palavras-Chave:

Anidrase Carbónica; Obesidade; Perda de peso; Proteómica; Saliva

Resumo

A obesidade é um desafio de saúde pública. Sendo a saliva base de potenciais biomarcadores patológicos e/ou de estados fisiológicos, propomos a análise de possíveis alterações no proteoma salivar decorrente de obesidade e associadas a perda de peso por exercício físico e restrição calórica. Serão ainda analisadas as atividade e expressão da anidrase carbónica VI, dado o seu papel relevante na percepção gustativa e na saúde oral.

A análise do perfil proteico bidimensional das amostras de saliva em estudo revelou 63 *spots* diferencialmente expressos, 11 deles possíveis “biomarcadores” de obesidade e/ou perda de peso por exercício físico e dieta. Observou-se, por western blot, um aumento da expressão da CAVI com a perda de peso, que não se refletiu em alteração de atividade enzimática.

Estes resultados mostram alterações de proteoma salivar associadas à perda de peso, em particular da CAVI. Será relevante de futuro relacionar estas alterações com as preferências/escolhas alimentares.

Evaluation of changes in saliva protein composition and function induced by weight loss

Keywords:

Carbonic Anhydrase; Obesity, Proteomic, Saliva, Weight Loss

Abstract

Obesity is a public health challenge. Being saliva a source of potential biomarkers pathological and/or of physiological conditions, we propose an analysis of the possible changes in salivary proteome resulting from obesity and associated with weight loss by exercise and caloric restriction. The activity and expression of carbonic anhydrase VI (CA VI), will be also analysed, given the role of this protein in taste perception and oral health.

The analysis of two-dimensional protein profile of saliva samples under study revealed 63 differentially expressed spots, from which 11 are potential "biomarkers" of obesity and/or weight loss by exercise and diet. It was observed, by western blot analysis, an increased expression of CAVI with weight loss, without alteration on its enzymatic activity.

These results points to changes in salivary proteome associated with weight loss, particularly at CAVI level. It will be relevant, in the future, to relate these changes with preferences/food choices.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice	IV
Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	X
Índice de Anexos	X
Abreviaturas e acrónimos	XI
Fundamento Teórico	1
Obesidade	1
Epidemiologia	1
Definição & Classificação	1
Consequências da obesidade	3
Causas da obesidade	3
Influência genética	4
Influência do Metabolismo	4
Influência Ambiental	4
Intervenção na obesidade - Exercício físico e Restrição calórica.	5
Saliva	7
Descrição & Funções	7
Interesse	11
Anidrase carbónica	12
Anidrase carbónica na saliva – CA VI	13
Alterações da cavidade oral decorrentes da obesidade, perda de peso e restrição calórica	16
Enquadramento	17

Objetivos	18
Métodos & Técnicas	19
Caracterização da amostra & Material biológico	19
Doseamento da proteína total - Método de Bradford	20
Princípio	20
Metodologia	20
Padrões de BSA	20
Tratamento da amostra	20
Análise de dados	21
Análise de perfis proteicos - Eletroforese bi-dimensional	22
Princípio	22
Metodologia	22
Análise de dados	24
Expressão da CA VI- Imunodeteção por Western blot	24
Princípio	24
Metodologia	24
Análise de dados	26
Atividade enzimática CA	26
Considerações gerais sobre cinética enzimática	26
Metodologia	26
A. Otimização	27
Preparação do substrato	27
Preparação do tampão	27
Abordagens em teste	28
Confirmação do comprimento de onda (λ) e determinação do percurso ótico em microplaca	29
I. Estudo da influência da concentração de proteína	29
II. Influência da concentração de substrato	29
III. Influência do pH do sistema tampão	30

B. Aplicação do método proposto às amostras em estudo	30
Tratamento estatístico	30
Resultados & Discussão	31
Caraterização da amostra em estudo	31
Doseamento da proteína total	33
Análise do perfil bi-dimensional	36
Análise da expressão CA VI - Imunomarcação por western blot	40
Atividade enzimática da anidrase carbónica	45
A. Otimização.....	45
Abordagem A	45
Estudo da influência da concentração de proteína	46
Estudo da concentração de substrato	47
Abordagem B	49
Estudo da concentração de proteína	51
Estudo da concentração de substrato	51
Estudo do efeito do pH	55
B. Aplicação do método proposto às amostras em estudo	55
Conclusões	60
Perspetivas Futuras	62
Referências Bibliográficas	63
Anexos	70

Índice de Figuras

Figura 1. Problemas associados ao excesso de peso e obesidade (adaptada de Jebb S., 2004).	3
Figura 2. Funções da saliva de acordo com a superfície, dentes ou mucosa. Retirado e adaptado de (Carpenter G., 2013).	7
Figura 3. Contribuição das diferentes proteínas nas funções da saliva na cavidade oral. Retirado e adaptado de Mese & Matsuo, (2007).	9
Figura 4. Localização anatômica das glândulas salivares maiores. 1-Parótidas, 2-Submandibulares, 3-Sublinguais (retirado de Aps & Martens, 2005).	9
Figura 5. Processo de secreção salivar (adaptado de Catalán <i>et al.</i> , 2009).	10
Figura 6. Exemplo de curva de padrões de BSA usada para determinação da concentração em proteína total.	21
Figura 7. Esquema da reação da degradação do ião 4-nitrofenilacetado a 4-nitrofenilato.	27
Figura 8. Espectro de absorção para amostra em estudo.	29
Figura 9. Peso e IMC dos indivíduos antes e depois do programa de perda de peso e dos indivíduos controlo. (Valores médios \pm EPM). A1: Peso em kg de cada individuo em estudo; A2: Peso médio em kg para cada grupo em estudo (Antes, Depois e Controlo); B1: IMC para cada individuo em estudo; B2: IMC médio em cada grupo em estudo (Antes, Depois, Controlo); letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, para ($P < 0,05$).	32
Figura 10. Percentagem de perda de peso para cada individuo em estudo, ao fim de 8 semanas em programa de perda de peso.	33
Figura 11. Concentração em proteína total da saliva mista. A – Concentração em proteína total dos indivíduos em programa de perda de peso nas situações antes e depois da perda de peso. B - Concentração em proteína total média de cada grupo em estudo (Média \pm erro padrão).	35
Figura 12. Géis bi-dimensionais. Géis representativos de amostras de indivíduos em programa de perda de peso por exercício físico e restrição calórica (A) Antes da perda de peso, (B) Depois da perda de peso, (C) Controlo. <i>Spots</i> a Preto: <i>Spots</i> alterados em indivíduos obesos comparativamente a normoponderais; <i>Spots</i> a Vermelho: <i>Spots</i> não alterados em indivíduos obesos mas com alterações após perda de peso; <i>Spots</i> a azul: <i>Spots</i> alterados em indivíduos obesos antes e depois perda de peso comparativamente a normoponderais; <i>Spots</i> a branco: outros <i>spots</i> sem contribuição... ..	39
Figura 13. Membrana marcada com anticorpo CA VI, com identificação da banda com 42kDa correspondente à anidrase carbónica VI. A - amostras referentes ao grupo 'Antes'; D - amostras referentes ao grupo 'Depois' e C - amostra referente ao grupo	

'Controlo' com a respetiva identificação do individuo a que pertence. MW - marcador de massas moleculares.	41
Figura 14. Expressão da anidrase carbónica VI para os diferentes indivíduos em estudo. A - Expressão individual da anidrase carbónica VI; B – imagem representativa das marcações observadas nas membranas; C – comparação entre os grupos em estudo; * diferenças significativas ($P < 0,05$).	42
Figura 15. Correlações entre expressão da anidrase carbónica VI e o IMC, considerando dados de todos os indivíduos em estudo. Marcador azul: controlo; marcador verde: Depois; marcador vermelho: Antes.	43
Figura 16. Correlação entre expressão da anidrase carbónica VI e o IMC, considerando mulheres numa situação anterior à perda de peso.	44
Figura 17. Correlação entre a expressão da anidrase carbónica VI e a percentagem de perda de peso considerando homens.	45
Figura 18. Curva de progressão de três réplicas duma amostra de saliva de individuo normoponderal, mostrando a linearidade do ensaio. A - curva de progressão ao longo de 60 minutos; B - Curva de progressão ajustada para zona linear.	46
Figura 19. Representação de atividade enzimática da CA em três amostras de saliva de indivíduos normoponderais em função da concentração proteica. A, B e C – Gráficos representativos da atividade da CA em função da concentração proteica para todas as concentrações de substrato em estudo, para cada amostra individual C2, C3 e C4, respetivamente; D – Gráfico que evidencia as zonas lineares para as três amostras em estudo. Valores de atividade médios de 3 réplicas para cada diluição em estudo.	47
Figura 20. Curvas de progressão de reação para comparação das velocidades iniciais de reação na presença ou ausência de enzima. Estão representadas curvas de progressão de reação obtidas na presença de uma mesma amostra de saliva (pontos a cheio) na presença de duas concentrações de 4-NPA (1,05mM nas amostras e branco representadas a verde; 0,033mM nas amostras e branco a azul). Os brancos respetivos (pontos vazios), são obtidos na ausência de saliva.	48
Figura 21. Contribuição da atividade do branco e amostra para ensaio realizado em condições estéreis e não estéreis.	49
Figura 22. Curva de progressão para a amostra C10 de saliva de indivíduos normoponderais, ensaio com 5 réplicas.	49
Figura 23. Curvas de progressão de reação para comparação das velocidades iniciais de reação na presença ou ausência de enzima. Estão representadas curvas de progressão de reação obtidas na presença de uma mesma amostra de saliva (pontos a cheio) na presença de duas concentrações de 4-NPA (1,05mM nas amostras e branco representadas a azul; 0,033mM nas amostras e branco a verde). Os brancos respetivos (pontos vazios) são obtidos na ausência de saliva.	50

Figura 24. Atividade enzimática para uma mesma amostra de saliva doseada nas duas abordagens em estudo (A e B), para duas concentrações de 4-NPA diferentes, respetivamente 1,05mM e 0,033mM.	50
Figura 25. Representação da atividade da anidrase carbónica em função da concentração de proteína. Esta avaliação foi feita para duas amostras de saliva de indivíduos normoponderais. Valores de atividade médios \pm DP.	51
Figura 26. Atividade enzimática CA em função da concentração do substrato 4NPA. Nesta avaliação foi utilizada uma amostra de saliva de um individuo normoponderal (amostra C10). Estão representadas médias \pm DP.	52
Figura 27. Representações gráficas da aplicação dos modelos de linearização de Lineweaver-burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf e ainda do método direto ou de Eisenthal e Cornish-Bowden.	53
Figura 28. Influência do pH do Tampão Tris-HCL para a atividade da anidrase carbónica.	55
Figura 29. Atividade enzimática da CA em amostras de saliva de 5 indivíduos em programa de perda de peso (Antes e Depois), e em 5 indivíduos controlo. Atividades enzimáticas médias \pm EPM (ensaio em triplicado).....	56
Figura 30. Atividade enzimática da CA média para as diferentes situações em estudo. Média das atividades \pm EPM.	56
Figura 31. Atividade enzimática em CA para os indivíduos em programa de perda de peso e restrição calórica, situação antes e depois.	57
Figura 32. Correlação entre a atividade CA e o IMC. Marcador vermelho: Antes; Marcador verde: Depois; Marcador azul: Controlo.	57
Figura 33. Correlação atividade enzimática de CA com a expressão de CA VI na saliva para todos os indivíduos em estudo. Marcador vermelho: Antes; Marcador verde: Depois; Marcador azul: Controlo.	58

Índice de Tabela

Tabela 1. Classificação dos IMC e riscos associados (WHO, 2004, adaptada).	1
Tabela 2. Contribuição das principais proteínas presentes na saliva (Retirado de Palo <i>et al.</i> , 2007).	8
Tabela 3. Funções maioritárias, locais de expressão e massas moleculares dos isoenzimas anidrase carbónica em humanos (adaptado de (Hassan <i>et al.</i> , 2012))	14
Tabela 4. Condições de ensaio e soluções utilizadas em cada abordagem em estudo (A e B).	28
Tabela 5. Registo de dados antropométricos dos indivíduos no estudo antes do programa de perda de peso e exercício físico e depois do mesmo programa.	31
Tabela 6. Registo de informações referentes aos participantes controlo.	31
Tabela 7. Concentrações de proteína total das amostras de saliva mista, para todos os indivíduos em estudo. Concentrações proteicas médias e respetivos desvios-padrão, relativos à análise das amostras em triplicado.	34
Tabela 8. <i>Spots</i> proteicos diferencialmente expressos em saliva mista, nos diferentes grupos experimentais. Valores médios da % de volume \pm EPM.	36
Tabela 9. Modelos Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf e Método direto ou de Eisenthal e Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1995).	52
Tabela 10. Velocidade máxima e constante de Michaelis determinadas a partir de cada linearização em estudo.	53
Tabela 11. Constantes de Michaelis determinadas para diferentes isoenzimas, utilizando substratos diferentes.	54

Índice de Anexos

Anexo I. Dados antropométricos e de concentração proteica salivar dos indivíduos normoponderais usados na otimização do método para a atividade da CA.	70
Anexo II. Determinação dos pontos isoelectricos dos spots proteicos observados em géis 2-DE para tiras (IPG strips) de 13 cm, gama de pH 3-10 não linear.	71
Anexo III. Imagens de membranas para a expressão da CA VI, nas diferentes amostras em estudo.	72
Anexo IV. Correlações de Pearson e níveis de significância para os diferentes grupos e ensaios em estudo.	73

Abreviaturas e Acrónimos

AVC - Acidente vascular cerebral

BSA - Albumina de soro bovina

CA - Anidrase carbónica

CBB - Azul Brilhante de *Coomasie*

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

DGS - Direção Geral de Saúde

DP - Desvio-padrão

DTT - Ditioneitol

E.C 4.2.1.1 – Índice da Comissão de Enzimas Anidrase carbónica

EPM – Erro padrão da média

hCA - anidrase carbónica humana

ID - Identificação

IgA - Imunoglobulina A

IMC - Índice de massa corporal

K_M - Constante de Michaelis

MM/MW - Massa molecular

MS-MS- Espetrometria de massa tandem

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde

PC1 - Pró-hormona convertase 1

pI - Ponto isoelétrico

PPAR - recetor de ativação de proliferação de peroxissomas

PROP - 6-n-Propil-tiouracil

PRPs - Proteínas ricas em prolina

PVDF- Fluoreto Polivinidileno

R_f Mobilidade eletroforética relativa

SDS-PAGE - Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (duodecil sulfato de sódio)

V_{máx} - Velocidade máxima

4-NPA - 4-nitrofenilacetato

2D-PAGE- Eletroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida

Fundamento Teórico

Obesidade

Epidemiologia

A obesidade constitui um dos grandes desafios de saúde pública do século XXI. Esta é vista pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma pandemia global, dada a sua prevalência em países desenvolvidos e em desenvolvimento, tendo um elevado contributo para o aumento da morbilidade e mortalidade e para os gastos nos sistemas de saúde.

Dados de 2008 apontam mais de 1,4 mil milhões de adultos (com idade superior a 20 anos) acima do peso, destes mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres apresentam obesidade (OMS, 2013). Dados de 2011 apontam ainda para mais de 40 milhões de crianças com idade pré-escolar acima do peso (OMS, 2013). Estima-se ainda, que até 2025, mais de 50% da população total mundial será obesa (DGS, 2005).

Em Portugal, a taxa de prevalência de excesso de peso e obesidade assemelha-se à restante imagem mundial. Entre 2003 e 2005, 53,8% dos portugueses acima dos 18 anos apresentavam excesso de peso e 14,9% eram obesos (do Carmo *et al.*, 2008). Por outro lado a obesidade infantil constitui uma das situações mais alarmantes na Europa, apresenta uma prevalência de cerca de 31,5% de excesso de peso e obesidade em crianças entre os 7-9 anos (Padez *et al.* 2004).

Definição & Classificação

A obesidade pode ser definida como um estado de desequilíbrio energético entre a energia ingerida e a energia gasta, que leva ao excesso ou anormal acumulação de gordura traduzindo-se num aumento de peso (Selassie & Sinha, 2011; Nammi *et al.*, 2004; Romero & Zanesco, 2006).

Como medida de controlo do grau de obesidade, variados métodos para se avaliar a condição corporal de um indivíduo foram criados (Loureiro J., 2007).

O Índice de Massa Corporal (IMC) é um dos sistemas mais simples e mais amplamente utilizados, baseia-se numa relação entre o peso, em quilogramas, e o quadrado da altura, em metros, e é uma medida utilizada para ambos os sexos e para

todas as idades adultas (Tabela 1). Este método deve ser visto apenas como guia, já que diferentes indivíduos e géneros apresentam graus de adiposidade que podem não coincidir nem permitir obter uma avaliação correta a partir desta classificação (Pinheiro *et al.*, 2004).

Tabela 1. Classificação dos IMC e riscos associados (WHO, 2004, adaptada).

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidades
Baixo – Peso	<18.50	
Magreza severa	<16.00	Baixo (Outros problemas clínicos)
Magreza Moderada	16.00 - 16.99	
Magreza Suave	17.00 - 18.49	
Peso – Normal	18.50 - 24.99	Médio
Excesso de Peso	≥ 25.00	
Pré-obeso	25.00 - 29.99	Aumentado
Obesidade	≥ 30.00	
Grau I	30.00 - 34.99	Moderado
Grau II	35.00 - 39.99	Grave
Grau III	≥40.00	Muito grave

A percentagem de massa gorda corporal deve ser também uma medida a ter em conta no que diz respeito à avaliação corporal, já que para a maioria das populações se observa uma correlação favorável entre esta e o IMC, podendo-se recorrer à seguinte equação:

$$\% \text{ Massa gorda} = 1,2 (\text{IMC}) + 0,23 (\text{idade}) - 10,8 (\text{género}) - 5,4$$

(género = "1" para homens, "0" para mulheres)

Verifica-se que para uma dada altura e peso, a percentagem de massa gorda é cerca de 10% superior nas mulheres, comparativamente aos homens. A razão para tal deve-se ao excesso de gordura corporal distribuída sob a forma de gordura subcutânea e periférica (coxas, nádegas, seios). Nos homens quando há um excesso de gordura, esta é principalmente armazenada na cavidade abdominal (Nammi *et al.*, 2004).

Outros parâmetros utilizados para a classificação da condição corporal são baseados em simples medidas antropométricas, nomeadamente perímetro abdominal, adiposidade total, gordura intra-abdominal, relação cintura-quadril, as quais fornecem informações acerca do grau e da distribuição da obesidade (Loureiro J., 2007, Nammi *et al.*, 2004).

Existem também diversos métodos tecnológicos para estimar a composição corporal, tais como densitometria com emissão de raios-X de feixe duplo (DEXA), pletismografia, hidrodensitometria, ressonância magnética, tomografia computadorizada e bioimpedância (Paracchini *et al.*, 2005; Selassie & Sinha, 2011).

Consequências da obesidade

O aumento da prevalência de excesso de peso e obesidade está associado a variadas doenças crônicas (Nammi *et al.*, 2004), acarretando desta forma um risco aumentado de morbidade e mortalidade.

O excesso de peso e obesidade tem sido visto como tendo efeitos em quase todos os órgãos do corpo (Figura 1), efeitos estes acentuados em diversas patologias com destaque nas doenças cardiovasculares (hipertensão, doenças coronárias e AVC), respiratórias (apneia de sono, falta de ar, síndrome de hipoventilação), metabólicas (hiperlipidémias, diabetes *mellitus*, insulino-resistência), gastrointestinais (cálculos biliares, fígado gordo, cirrose) e em diversos cancros (cancro da mama, colo-retal, cervical, próstata) (Jebb S., 2004; Nammi *et al.*, 2004).

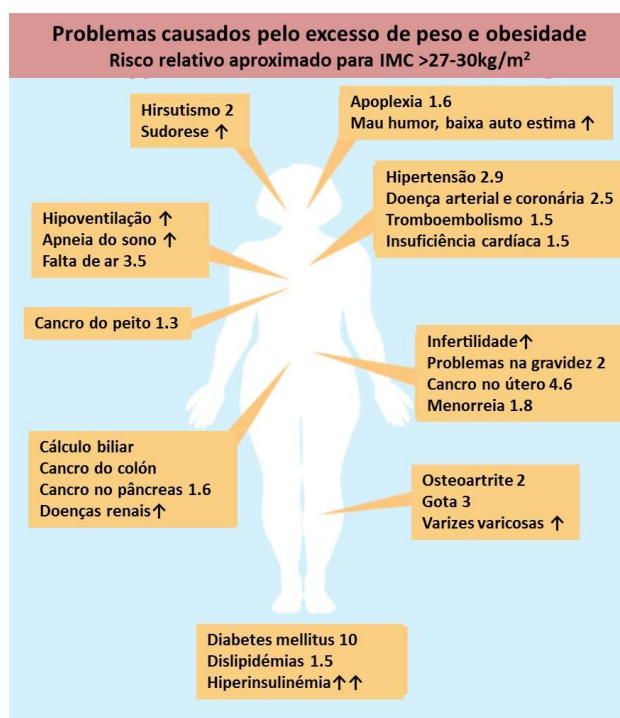


Figura 1. Problemas associados ao excesso de peso e obesidade (adaptada de Jebb S., 2004).

Causas da obesidade

A obesidade tem sido vista como resultado da falta de força de vontade, ou muitas vezes como estilo de vida - uma opção de comer em excesso e minimizar o exercício (Nammi *et al.*, 2004).

Mas, a sua etiologia não é de fácil identificação. Esta patologia é caracterizada como uma doença multifatorial, ou seja, é resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos (Romero & Zanesco, 2006; Nammi *et al*, 2004).

Influência genética

Uma pequena porção de casos de obesidade surgem associados a fatores genéticos. A contribuição monogénica na obesidade inclui mutações no recetor de melanocortina 4 (responsável por suprimir a ingestão alimentar), no gene da leptina ou no seu recetor (responsável pela regulação do peso corporal e dos depósitos adiposos), no gene do recetor de ativação de proliferação de peroxissomas (PPAR) e no gene da pró-hormona convertase 1 (PC-1) (Jebb S., 2004; Selassie & Sinha, 2011). Apesar da identificação do contributo destas causas na obesidade, a maior parte da população afetada com obesidade é por influência poligenica. Mais de 250 genes e regiões cromossómicas são associados com a obesidade e com a provável codificação de proteínas que influenciam o consumo ou gasto de energia (Selassie & Sinha, 2011). Estudos de hereditariedade têm sugerido a contribuição destes fatores em aproximadamente um terço da variação do IMC, sendo ainda sugeridos que determinadas características comportamentais têm uma forte componente genética, nomeadamente preferências alimentares ou hábitos de exercício (Jebb S., 2004).

Influência do Metabolismo

Durante muitos anos as pesquisas na obesidade focaram-se na procura de defeitos metabólicos em pessoas obesas. Acreditava-se que pessoas obesas tinham uma taxa metabólica menor quando comparados com normoponderais, isto porque se afirmava que as quantidades de alimentos ingeridos eram similares ou até inferiores. No entanto alguns estudos têm mostrado o oposto, com observação de que a taxa metabólica é proporcional ao aumento da massa de tecido mole. Portanto os baixos registos de ingestão auto-relatados pelas pessoas obesas são fisiologicamente improváveis, o que poderá ter a ver com dificuldades na quantificação do consumo de energia e o controlo do apetite e comportamento alimentar (Jebb S., 2004).

Influência Ambiental

No decorrer da história a escassez de alimentos e a elevada atividade física, praticada pelo homem, fez com que ocorresse uma seleção dos indivíduos que apresentassem mecanismos orgânicos mais eficientes de armazenamento do excesso

de energia, na forma de gordura, para períodos de fome. A evolução das sociedades e a constante abundância de alimentos tornou a eficiência no armazenamento de energia desvantajosa, traduzindo-se na obesidade. Acredita-se que este é um dos motivos que tornou a obesidade uma condição comum na sociedade industrializada e que potencia a sua constante expansão (Spiegelman & Flier, 2001; Paracchini *et al.*, 2005).

As profundas mudanças na dieta que têm ocorrido ao longo das últimas décadas, particularmente o aumento do consumo de alimentos e bebidas altamente calóricos (ricos em gordura e/ou açúcar), os quais estão associados a uma saciedade reduzida, têm levado a um consumo energético excessivo, contribuindo para o aumento do risco de obesidade e de transtornos alimentares (Wilding J., 2006; Nammi *et al.*, 2004). Os atuais padrões alimentares menos regulares, menores refeições e aumento de “snacks” ao longo do dia mais calóricos apesar de permanecerem incertos também podem contribuir para o atual ambiente obesogênico (Wilding J., 2006).

Em paralelo a estas mudanças no consumo energético, os atuais comportamentos sedentários devido ao aparecimento da televisão e computador, à maior utilização de automóvel, ao aumento de atividades de lazer sedentárias têm contribuído para um declínio acentuado na prática de exercício físico, traduzindo-se num desequilíbrio na homeostase energética e por conseguinte aumento de peso ou obesidade (Nammi *et al.*, 2004; Laskowski E., 2012).

Intervenção na obesidade: Exercício físico e Restrição calórica

Apesar dos dados e perspectivas negras que a obesidade e as consequências relacionadas com a mesma encerram, estes efeitos podem ser reversíveis (Mediano M. *et al.*, 2010).

A perda de peso pode ser conseguida por uma alteração no equilíbrio de energia, que envolve uma redução da ingestão calórica e/ou um aumento do dispêndio energético.

Intervenções no estilo de vida focadas numa restrição calórica e atividade física têm sido vistas como pilares no tratamento e prevenção da obesidade e de outras patologias como a diabetes (Mediano & Sichieri, 2011).

Apesar dos resultados sobre a inclusão, por si só, de atividade física na prevenção do aumento de peso ainda serem controversos, vários estudos reforçam o papel da atividade física a longo prazo no controlo do peso, (Mediano & Sichieri, 2011). A combinação de dietas de restrição calórica com atividade física tem sido vista como

uma estratégia mais eficaz para promover perda de peso e redução da massa gorda (Mediano M. *et al.*, 2010).

A atividade física tem sido considerada portanto como uma parte fundamental no tratamento para a obesidade, não somente pelo seu efeito na perda de peso, mas também pelas melhorias que promove nos parâmetros metabólicos, tais como a sensibilidade à insulina e perfil lipídico (Mediano M. *et al.*, 2010).

Perdas de pequenas quantidades de peso têm revelado um grande impacto sobre as complicações associadas à obesidade. Dados nos EUA sugerem que diminuições na ordem de apenas 1% no IMC podem impedir mais de 2 milhões de casos de diabetes, 1,5 milhões de casos de doenças do coração, e até 127.000 casos de cancro (Laskowski, 2012).

Tem sido mostrado, no que diz respeito à carga genética que esta por si só não dita o próprio destino, sendo que a incorporação de atividade física tem demonstrado reduções de 40% na predisposição para a obesidade comum (Laskowski, 2012).

A restrição calórica constitui uma intervenção caracterizada por diminuição da quantidade de energia ingerida, a qual tenta manter uma adequada nutrição (Dirks & Leeuwenburgh, 2006). Alguns estudos têm-se centrado numa restrição calórica com base numa alteração da relação proteínas-glúcidos incluídos na dieta, particularmente com um aumento do consumo de proteínas em detrimento do consumo de glúcidos (Krieger *et al.*, 2006) enquanto outros se baseiam numa diminuição substancial do consumo em gordura (Åberg *et al.* 2008). Esta diminuição da ingestão alimentar tanto aguda como crónica tem como consequência primária uma perda de peso corporal significativa, podendo influenciar a regulação do apetite/saciedade, quer por alterar estímulos de curto prazo que influenciam o início/término da refeição, quer por alterar, a longo prazo, estímulos centrais que refletem o estado de adiposidade global, tais como os níveis de insulina e de leptina (Cameron *et al.*, 2008). Diversos estudos, no que diz respeito à restrição alimentar, têm revelado efeitos positivos no que diz respeito ao prolongamento da duração máxima de vida e atraso nas alterações fisiológicas prejudiciais relacionadas com a idade (Speakman & Mitchell, 2011; Spindler, 2010). Estudos mostram também a implicação de dietas de restrição, quer em primatas bem como em humanos, na reversão de alterações metabólicas subjacentes à resistência à insulina e síndrome metabólico, proteção contra a diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vasculares-cerebrais, proteção do sistema imunitário bem como efeitos na redução da iniciação e progressão de tumores (Speakman & Mitchell, 2011; Spindler, 2010).

Saliva

Descrição & Funções

O fluido presente na cavidade oral é constituído na sua grande maioria, 99,5%, por água, proteínas (0,3%) e substâncias inorgânicas (0,2%) (Schipper *et al.*, 2007). De uma forma geral a saliva participa em inúmeras funções essenciais, nomeadamente na formação do bolo alimentar facilitando a deglutição, na limpeza dos tecidos da cavidade oral, na facilitação da fala e na participação da deteção dos gostos dos alimentos, entre muitas outras (Figura 2) (Ueda *et al.*, 2013; Carpenter G, 2013).

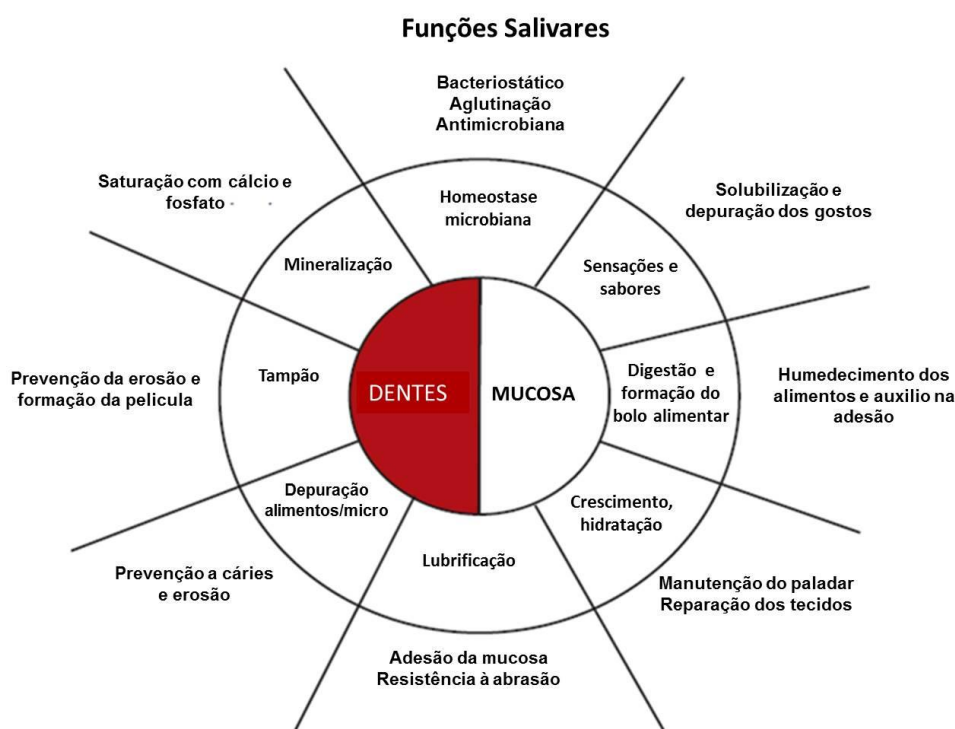


Figura 2. Funções da saliva de acordo com a superfície, dentes ou mucosa. Retirado e adaptado de (Carpenter G., 2013).

A sua complexa composição e propriedades físico-químicas versáteis permitem atingir as suas funções (Carpenter G., 2013).

A componente proteica salivar é principalmente constituída por glicoproteínas, enzimas (como a α -amilase e a anidrase carbónica), imunoglobulinas, e uma vasta gama de péptidos (cistatinas, estaterina, histatinas, proteínas ricas em prolina) com atividade antimicrobiana (Schipper *et al.*, 2007; Palo *et al.*, 2007) (Tabela 2). A componente inorgânica da saliva contém os eletrólitos habituais de fluidos corporais

(iões sódio, potássio, cloreto e bicarbonato) mas em diferentes concentrações, tornando a saliva um fluido hipotónico, em relação ao sangue (Schipper *et al.*, 2007). O fluido oral contém também bactérias e os seus metabolitos, células epiteliais, eritrócitos, leucócitos e restos de alimentos (Aps & Martens, 2005).

Tabela 2. Contribuição das principais proteínas presentes na saliva (Retirado de Palo *et al.*, 2007).

Proteínas salivares			
	Origem	Função	Concentrações
Proteína total			0,47 ± 0,19mg/ml 0,9 ± 0,2 mg/ml 4,3 – 710,0 mg/ml 2,67 ± 0,54 mg/ml
α-amilase		Digestão do amido	3257 ± 1682 U/l 476 ± 191µg/ml
Albumina	Plasma	Principalmente de extravasamento de plasma	0.2 ± 0.1 mg/ml 0.8–192.0 mg/dl
Grupo de cistatinas	SM > SL	Antifúngica	Forma 14.3 kDa 58 ± 25 µg/ml Forma 14.2 kDa 91 ± 46 µg/ml
Histatina	P	Antimicrobiana	1190 ± 313 µg/ml
Ig A secretora	Linfocitos B	Antimicrobiana	124.3–335.3 µg/ml
Lactoferrina	Mucosa>serosa	Antimicrobiana	3.7 ± 2.5 µg/ml
Lisozima	SL>SM, P	Lubrificação	3.5–92.0 µg/ml 21.8 ± 2.5 mg/dl 59.7–1062.3 µg/ml
Grupo de mucinas	Glândulas mucosas	Lubrificação	MUC5B: 2.4 ± 1.7 U/ml
PRPs	P	Ligação a bactérias e taninos provenientes da dieta	PRP ácida: 456 ± 139 µg/ml PRP básica: 165 ± 69 µg/m
Estaterina		Ligação Ca ²⁺	4.93 ± 0.61 µmol/l 36 ± 18 µg/ml
Transferrina	Plasma		0.58 ± 0.20 mg/d

SM = submandibulares; SL= Sublingual; P= Parótida

No que diz respeito à componente proteica, esta contribui para a diversidade de funções deste fluido, existindo alguma redundância a nível da funcionalidade, ou seja, diversas proteínas salivares contribuem para a mesma função e uma mesma proteína salivar apresenta (na maior parte das vezes) mais do que uma função (Figura 3). Esta característica permite a manutenção das funções principais da saliva, mesmo em situações de variação no tipo e quantidade de espécies proteicas segregadas em resposta a diferentes estímulos (Mese & Matsuo, 2007).

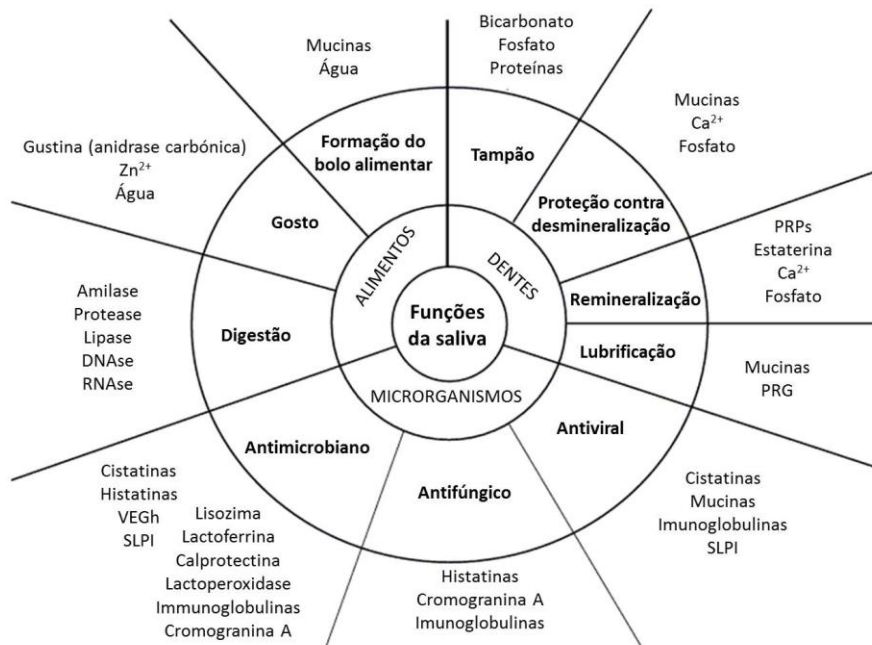


Figura 3. Contribuição das diferentes proteínas nas funções da saliva na cavidade oral. Retirado e adaptado de Mese & Matsuo, (2007).

A saliva é produzida pelas glândulas salivares parótidas, submandibulares e sublinguais (Figura 4), e por diversas glândulas salivares menores presentes na mucosa da língua (glândulas de Von Ebner), bochechas, lábios e palato. Para além do contributo de origem glandular há ainda contribuição do fluido crevicular gengival para o total de saliva mista (Schipper *et al.*, 2007).

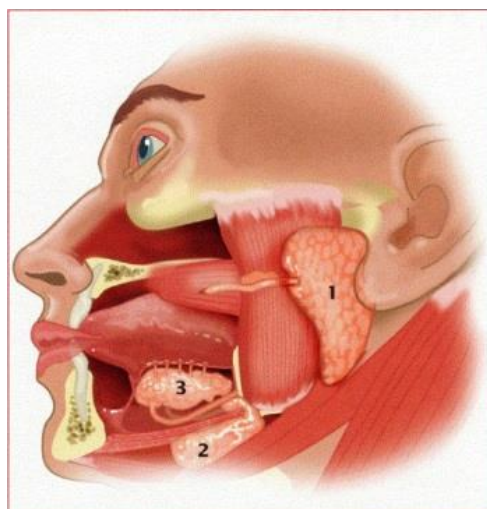


Figura 4. Localização anatómica das glândulas salivares maiores. 1-Parótidas, 2-Submandibulares, 3-Sublinguais (retirado de Aps & Martens, 2005).

As glândulas salivares são compostas de ácinos, os quais contêm proteínas e eletrólitos e nos quais a saliva inicial ou primária, isotônica comparativamente com o plasma, é produzida. Os vários ácinos, ligados por ductos intercalares, segregam o fluido isotônico, sendo este drenado para a cavidade oral pelos ductos estriados e excretores inter-lobulares. Durante esta passagem, a concentração de eletrólitos sofre várias mudanças devido ao transporte ativo iônico, o que torna o fluido oral final com o seu carácter hipotônico (Aps & Martens, 2005) (Figura 5).

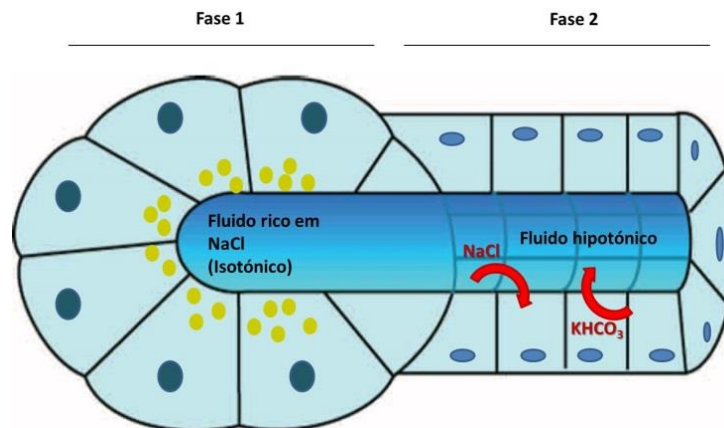


Figura 5. Processo de secreção salivar (adaptado de Catalán *et al.*, 2009).

O tipo de secreção que cada glândula produz difere entre si, o que se deve à proporção de células serosas ou mucosas presentes em cada tipo de glândulas. As parótidas, submandibulares, palato, lábios e língua apresentam uma forte componente serosa, secretando um fluido aquoso desprovido de muco. Já as sublinguais e a maioria das glândulas salivares menores são constituídas quase exclusivamente por células mucosas e produzem uma secreção muito rica em muco, que é bastante viscoso (Catalán *et al.*, 2009).

Na ausência de condição patológica, um adulto poderá produzir cerca de 500-1500ml de saliva por dia (Aps & Martens, 2005), com pH a variar entre 6.2 e 7.4 (Schipper *et al.* 2007).

Os dados acima devem ser tidos apenas como referências, uma vez que existem uma série de fatores a ter em conta e que afetam a quantidade e composição da secreção salivar, tais como, a taxa de fluxo, ritmo circadiano, tipo e tamanho das glândulas salivares, duração e tipo de estímulo, dieta, drogas, idade, sexo, tipo de sangue e estado fisiológico (Schipper *et al.*, 2007).

O sistema nervoso autónomo desempenha um papel importante na salivação, com estímulos que atuam principalmente sobre o volume, viscosidade e concentração de proteínas da saliva. Tanto a estimulação simpática como a parassimpática podem

causar salivação, embora a secreção possa ter diferente constituição e volume, consoante a proveniência do estímulo (Aps & Martens, 2005).

Apesar do sistema nervoso simpático estar grandemente associado à secreção de proteínas e o sistema nervoso parassimpático ao aumento do volume, a taxa de secreção aumenta sinergicamente quando ambos os ramos do sistema nervoso autónomo são simultaneamente estimulados (Aps & Martens, 2005).

Estímulos para aumento da salivação incluem a presença de alimentos ou substâncias irritantes na boca, com a conseqüente estimulação gustativa e tátil, visão ou o cheiro da comida, estimulação mecânica (mastigação), dor, alterações hormonais relacionadas com a gravidez, entre outros. Em contraste, a menopausa relacionada com alterações hormonais, o *stress*, anti-adrenérgicos e anti-colinérgicos são situações observadas como responsáveis por uma diminuição do fluxo salivar (Schipper *et al*, 2007; Aps & Martens, 2005).

Interesse

Nos últimos anos com o desenvolvimento de meios tecnológicos inovadores, como a genómica, a proteómica, a metabolómica e a bioinformática, que permitiram a expansão do conhecimento das propriedades bioquímicas e físico-químicas da saliva (Duan & Liu, 2012; Schipper *et al.*, 2007), o estudo deste fluido tem-se tornado cada vez mais atraente (Duan & Liu, 2012).

Dada a sua capacidade de refletir as condições de saúde oral e sistémicas, este fluido biológico tem sido encarado como uma possível ferramenta de diagnóstico clínico e monitorização de doenças e dos diferentes estados metabólicos (Duan & Liu, 2012; Nunes *et al.*, 2011).

O seu potencial de utilização como substituto do sangue (Nunes *et al.*, 2011) como base para reconhecimento de potenciais biomarcadores patológicos tem sido encarado como vantajoso em prognósticos e diagnóstico de doenças, quer pelo fato da concentração de vários dos seus metabolitos refletir diretamente os níveis dos mesmos no plasma, quer por ser um fluido possível de recolher de forma não invasiva, de fácil processamento e sem necessidade de pessoal especializado, nem custos inerentes à sua recolha (Zhang *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2011).

Não obstante todos os interesses acima referidos, uma outra área de pesquisa crescente nos últimos anos enfatiza o papel da saliva com o contributo na perceção sensorial (Neyraud *et al.*, 2012).

No decorrer do consumo alimentar, os alimentos misturam-se na cavidade oral com a saliva, ocorrendo solubilização/emulsão das moléculas presentes nos alimentos e

que permite que essas moléculas se distribuam pela cavidade oral e assim encontrem as estruturas celulares percecionadoras dos diferentes gostos.

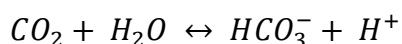
Estudos mostram que indivíduos que apresentem diferenças marcantes na composição salivar, parecem apresentar um potencial oral de interação com os alimentos diferente, o que resulta numa posterior percepção dos gostos diferente (Neyraud *et al.*, 2012).

Algumas moléculas provenientes dos alimentos são modificadas por ação das proteínas salivares, nomeadamente atividade amilolítica, proteolítica e lipolítica. Assim, os indivíduos que apresentem diferenças na composição proteica poderão perceber de forma diferente o gosto resultante dos mesmos alimentos (Neyraud *et al.*, 2012). A interação entre a sensibilidade gustativa e a composição proteica da saliva tem sido avaliada em indivíduos com diferente percepção do gosto amargo do composto, PROP (6-n-Propil-tiouracil), de onde se têm sugerido diferenças na composição proteica que influencia essa percepção (Calò *et al.*, 2011). Estes estudos reforçam assim o papel dos constituintes da saliva na deteção dos gostos e posterior aceitação ou rejeição dos alimentos (Neyraud *et al.*, 2012).

Anidrase Carbónica

Uma das proteínas presentes na saliva, que tem sido associada à sensibilidade gustativa é a anidrase carbónica VI (Padiglia *et al.*, 2010).

Anidrases carbónicas (EC 4.2.1.1; CA) encontram-se presentes em todos os organismos vivos. Constituem um grupo de metaloenzimas, responsáveis pela interconversão de dióxido de carbono a bicarbonato, através da reação:



sendo conhecida pela seu elevado nível de atividade e eficiência (McDevitt & Lambert, 2011).

Têm sido descritas várias classes de anidrase carbónica, codificadas por famílias de genes evolutivamente independentes. São estas a classe α , presente em vertebrados, bactérias, algas e citoplasma de plantas verdes; a classe β presentes predominantemente em bactérias, algas e cloroplastos de monocotiledóneas e dicotiledóneas; a classe γ presente principalmente em archaea e em algumas bactérias (Supuran, 2008) e duas classes adicionais (δ e ζ) que foram identificadas em microrganismos marinhos, (McDevitt & Lambert, 2011).

Para a sua atividade catalítica a anidrase carbónica carece de um cofator metálico na sua constituição, correspondendo este ao zinco nas classes α , β , δ e γ , coordenado por três histidinas (α , γ , δ) ou duas cisteínas e uma histidina (β e ζ), sendo este cofator substituído por íons ferrosos em enzimas da classe γ , ou por cádmio na classe ζ (McDevitt & Lambert, 2011).

Nos mamíferos, estão identificados até ao momento 16 isoenzimas pertencentes à classe α , dos quais apenas 13 evidenciam atividade catalítica e um deles é um pseudogene inativo em humanos (Tabela 3). Os isoenzimas da anidrase carbónica apresentam divergência considerável na sequência de DNA, localização cromossómica e propriedade enzimática (Öztürk *et al.*, 2011), apresentam portanto diferente atividade catalítica, localização subcelular e distribuição tecidual.

Os isoenzimas da classe α da CA, consistem em cinco isoformas citosólicas (CA I, CA II, CA III e CA VII, CA XIII), cinco ligadas à membrana (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV e CA XV), duas isoformas mitocondriais (CA VA e CA VB), e uma isoforma de anidrase carbónica segregada (CA VI) (Supuran, 2008 e McDevitt & Lambert, 2011).

Por catalisar a reação acima indicada, a anidrase carbónica participa em variados processos fisiológicos e patológicos, incluindo respiração e transporte de CO_2 e bicarbonato entre os tecidos de metabolização, regulação do pH e CO_2 , secreção de eletrólitos em diferentes tecidos e órgãos (Hassan *et al.*, 2012), biossíntese de algumas biomoléculas importantes, como ureia, glucose, lípidos e pirimidinas (Nishimori *et al.*, 2007), reabsorção óssea, calcificação e carcinogénese (Hassan *et al.*, 2012).

Anidrase Carbónica na saliva – CA VI

A existência de atividade de anidrase carbónica na saliva foi dada a conhecer por Becks & Wainwright em 1939, mas durante muitas décadas poucos foram os estudos em torno do papel desta proteína na saliva (Kivelä *et al.*, 1999).

Nos anos 70 foi descrita a presença desta proteína na saliva e o seu envolvimento na ligação ao zinco e na sensibilidade gustativa, recebendo nesta altura, o nome de gustina (gustin), Henkin *et al.*, (1975). Só mais tarde, em 1979, Fernley e colegas relataram a expressão desta proteína na glândula parótida de ovelhas, sendo a mesma posteriormente purificada na saliva humana e designada por anidrase carbónica VI por Murakami & Sly em 1987 (Kivelä *et al.*, 1999).

Tabela 3. Funções maioritárias, locais de expressão e massas moleculares dos isoenzimas anidrase carbónica em humanos (adaptado de (Hassan *et al.*, 2012)).

Isoenzima	Funções	Local de expressão	Massa molecular (kDa)
CA I	Defesa anti-refluxo, trocas gasosas e transporte de iões	Eritrócitos e trato gastrointestinal	29 ^[6] 30 ^[2]
CA II	Defesa anti-refluxo, reabsorção óssea, produção de humor aquoso, motilidade do esperma, acidificação da urina, trocas gasosas e quimiosensibilidade nasal ao CO ₂	Todas as células	29 ^{[1][6]} 30 ^[2]
CA III	Defesa anti refluxo, metabolismo dos ácidos gordos, transporte e homeostase do fluido ocular	Notocorda e músculo esquelético no embrião humano, 8% de proteína solúvel no músculo do tipo I	29 ^[6] 30 ^[2]
CA IV	Quimiosensibilidade nasal ao CO ₂ , Defesa anti-refluxo, reabsorção de HCO ₃ ⁻ , remoção de NH ₄ ⁺ , Regulação do pH, Produção do fluido ocular; Trocas gasosas e fluxo de sangue no cérebro	Trato gastrointestinal, rins, endotélio, pâncreas, glândulas salivares, músculo cardíaco, olhos, cólon	35 ^{[1][6]}
CA VA	Enzima mitocondrial que fornece bicarbonato de piruvato carboxilase aos adipócitos e reações biossintéticas	Fígado, rim, ilhotas pancreáticas e células beta	34,7 ^[6]
CA VB	Reações biossintéticas, detoxicação de amónia	Pâncreas, rins, glândulas salivares, e na medula espinal, músculo esquelético e cardíaco, mucosa gastrointestinal	36,4 ^{[3][6]}
CA VI	Regulação do pH; Defesa anti-refluxo; Proteção de carcinógenos; função gustativa	Principal constituinte da saliva (secreção), lágrimas, leite, secreção nasal e lacrimal, glândulas de Von Ebner e mamarias	39-42 ^[6] 42 ^{[2][5]}
CA VII	Produção de líquido cefalorraquidiano	Sistema nervoso Central	29 ^[6]
Proteína relacionada CA VIII	Não funcional		
CA IX	Regulador de pH; Adesão, proliferação e diferenciação celular; Transporte de iões	Trato gastrointestinal normal; alguns cancros, ducto excurrente no homem	54/58 ^[2] 56 ^[4]
Proteína relacionada CA X	Não funcional		
Proteína relacionada CA XI	Não Funcional		
CA XII	Regulação do pH, produção de humor aquoso, absorção de HCO ₃ ⁻ ; Secreção de H ⁺ ; Concentração e acidificação do líquido testicular	Colon, rim, próstata, intestino e linfócitos ativos, certos cancros, mama, pulmão, olhos, epitélio reprodutivo	44 ^[2]
CA XIII	Manutenção do equilíbrio ácido-base no rim, trato gastrointestinal e reprodutor e regulação do pH	Timo, intestino delgado, próstata, ovários, colon e testículos	29 ^[6] 30 ^[2]
CA XIV	Absorção de HCO ₃ ⁻ e modulação da transmissão neuronal	Partes do SNC e fígado adulto, coração, intestino delgado, colon, rins, músculo esquelético e cérebro	37,5 ^[2]

^[1] Sato *et al.*, (1990); ^[2] Kivelä *et al.*, (2005); ^[3] Fujikawa –Adachi *et al.*, (1995); ^[4] Demirdağ *et al.*, 2012; ^[5] Kivelä *et al.*, (1997); ^[6] Boron W., (2005)

O cDNA que codifica a anidrase carbónica VI humana foi clonado e caracterizado em 1991 por Aldred e o seu grupo de investigadores, posteriormente e graças ao desenvolvimento de radioimunoensaios e ensaios imunofluorimétricos específicos para hCA VI foi possível quantificar o enzima em matrizes biológicas como a saliva (Kivelä *et al.*, 1999).

A CA VI é o único isoenzima segregado conhecido na família de anidrases carbónicas nos mamíferos. Para além da saliva este isoenzima tem sido encontrado noutros órgãos de secreção, tais como as glândulas lacrimais, traqueobrônquicas e glândulas nasais, onde tem sido proposto atuar na função olfativa, e encontrado em elevadas concentrações no colostro, onde foi sugerido um papel importante no desenvolvimento do trato alimentar, sendo ainda referido como um componente da película de esmalte dentário (Koz *et al.*, 2012 e Nishimori *et al.*, 2007)

O gene que codifica o CA VI encontra-se localizado no cromossoma 1p36, possui 8 exões e 7 intrões (Öztürk *et al.*, 2011). O isoenzima é composto na sua totalidade por

308 aminoácidos com sequência líder de 12 aminoácidos (Öztürk *et al.*, 2011), a sua massa molecular é relatada como sendo de 42kDa (Kivelä *et al.*, 1999) e ponto isoelétrico de 6,4 (Öztürk *et al.*, 2011).

No que diz respeito às glândulas salivares, a CA VI é produzida nas glândulas parótidas e submandibulares, bem como nas glândulas salivares menores da língua, nomeadamente glândulas de von Ebner (Culp *et al.*, 2011).

Durante muito tempo, CA VI foi conhecida como único isoenzima de CA presente na saliva (Öztürk *et al.*, 2011). No entanto, um estudo recente envolvendo proteoma salivar de indivíduos diabéticos tipo 2, relatou também a presença de CA I e CA II, em saliva humana não estimulada (Rao *et al.*, 2009).

A anidrase carbónica presente na cavidade oral, CA VI salivar, tem sido implicada em disfunções gastrointestinais e de gosto, para além do papel na regulação do pH tal como a maioria dos restantes isoformas (Culp *et al.*, 2011).

Vários estudos relacionam os níveis de CA VI com a saúde oral. Arabaci *et al.* (2013) avaliaram a relação entre os níveis de CA VI salivar e o estado de higiene oral, em 65 voluntários, revelando o aumento da atividade da CA VI na saliva de indivíduos com pobre higiene oral. Foi também reportada correlação negativa entre a concentração de CA VI e a prevalência de cáries dentárias (Kivelä *et al.*, 1999) particularmente em indivíduos com higiene oral negligenciada, indicando que baixas concentrações de CA VI estão associados com o aumento da prevalência de cáries.

A associação da CA VI ao gosto tem por um lado a ver com o facto desta proteína presente nas secreções das glândulas salivares menores, de Von Ebner, cuja secreção circunda os recetores gustativos das papilas circunvaladas e foliadas, ter sido sugerida como tendo implicações no crescimento e desenvolvimento das células recetoras do gosto e conseqüentemente na perceção deste (Culp *et al.*, 2011). Para além disso, outros estudos reforçam o envolvimento desta proteína na sensibilidade gustativa em geral pela observação de que indivíduos com polimorfismos, no gene que codifica a CA VI, associados à perda de funcionalidade no centro ativo a que se liga o zinco, apresentavam uma menor sensibilidade gustativa e uma menor densidade de gomos gustativos (Caló *et al.*, 2011).

Apesar destas evidências, até ao momento não são conhecidos estudos em que a expressão e/ou atividade enzimática da CA VI tenham sido avaliadas em obesos. Tendo em conta a importância que a perceção dos alimentos pode ter no desenvolvimento e manutenção desta patologia, esta poderá ser uma área de interesse.

Alterações da Cavidade Oral

Decorrentes de Obesidade, perda de peso & restrição calórica

Apesar de não serem conhecidos muitos estudos, têm sido reportados diversos aspetos no que diz respeito a alterações da cavidade oral decorrentes da obesidade. No que diz respeito a alterações do volume salivar, tem-se reportado hipossalivação em indivíduos obesos o que pode afetar variados aspetos da saúde oral, tais como desenvolvimento de cáries, periodontite e xerostomia, bem como pode estar associado fortemente à alimentação e à percepção dos gostos, dificuldade em comer, mastigar e engolir, estes problemas podem levar a determinadas escolhas alimentares que comprometem a adequada nutrição (Ueda *et al.*, 2013).

Quanto à percepção e sensibilidade para os diferentes gostos são característicos de cada indivíduo (Overberg *et al.*, 2012). Há ainda estudos que relacionam a sensibilidade gustativa particular de cada indivíduo com determinado perfil proteico (Caló *et al.*, 2011; Dsamou *et al.*, 2011). No entanto, estes estudos acerca da relação saliva-gosto não referem se estas diferenças se relacionam, ou não com a obesidade. Entre obesos e não obesos têm sido reportadas diferenças na sensibilidade gustativa, ainda que haja alguma falta de consenso entre estudos. Alguns, estudos apontam para sensibilidade gustativa reduzida em indivíduos com IMC elevado (Overberg *et al.*, 2012).

Há no entanto, estudos que sugerem alterações em parâmetros salivares, na obesidade. Alterações no pH da saliva em mulheres obesas, com síndrome metabólica já foram referidas (Tremblay *et al.* 2012).

No que diz respeito à influência do exercício físico intenso e restrição alimentar sobre a salivação muito pouco se sabe. Mas dado que o exercício físico e a restrição alimentar levam a mudanças no balanço do sistema nervoso autónomo (Yoshino *et al.*, 2009), e este está relacionado com a constituição e volume do fluido oral, não são de excluir alterações no volume e composição da saliva.

Por exemplo, estudos em ratos mostraram que o exercício físico a longo prazo, sob condições de restrição alimentar, tem contribuição na alteração da taxa de fluxo salivar e secreção de proteínas salivares, sugerindo que as alterações se devem a uma ação do sistema nervoso autónomo (Yoshino *et al.*, 2009).

Enquadramento

De uma forma geral a obesidade e o excesso de peso têm sido vistos como um desafio de saúde pública, não somente pelos números alarmantes que apresentam, em termos de prevalência na população mundial, mas também pelo contributo para os gastos nos sistemas de saúde devido às patologias a que estão associados (WHO, 2013).

Nos últimos anos, o estudo da saliva ganhou interesse como possível base de reconhecimento de potenciais biomarcadores patológicos e/ ou de estados fisiológicos.

É certo que a obesidade é uma condição facilmente identificada antropometricamente (Gomes *et al.*, 2010). No entanto a compreensão das suas causas e o seu tratamento continuam a requerer mais estudos. Alterações no proteoma da saliva decorrentes desta patologia poderão indicar alterações fisiológicas que contribuam para a compreensão da obesidade. Por outro lado, alterações que possam estar associadas a uma perda de peso poderão ser importantes também no sentido de conhecer as características do meio oral que, por sua vez, podem estar implicadas nas preferências e escolhas alimentares.

Apesar da carência de informação até ao momento, alguns estudos têm reportado alterações das condições da cavidade oral decorrentes da obesidade, nomeadamente no que diz respeito a alterações do volume e composição salivar (Ueda *et al.*, 2013), alterações de pH (Tremblay *et al.* 2012), existência de diferenças na sensibilidade gustativa (Overberg *et al.* 2012). Para além disso, têm sido também apontadas alterações decorrentes do exercício físico e restrição alimentar, tais como alterações nas taxas de fluxo e secreção salivar e na composição proteica salivar (Yoshino *et al.*, 2009).

Considerando os vários fatores descritos, será de interesse estudar a composição proteica da saliva numa situação de obesidade e as suas potenciais alterações aquando da perda de peso induzida por restrição calórica associada a exercício físico intenso, de forma a compreender a patologia e /ou manutenção do tratamento desta.

Tendo em conta a importância atribuída à proteína anidrase carbónica VI na perceção gustativa e na manutenção do pH (e saúde) oral, e o facto de não se conhecer muito acerca da expressão desta proteína numa condição como a obesidade, o conhecimento das potenciais variações na secreção e atividade desta proteína salivar tornam-se de interesse.

Objetivos

Com o presente estudo pretende-se contribuir para o conhecimento de alterações no perfil proteico da saliva em indivíduos obesos submetidos a perda de peso, induzida por restrição calórica e exercício físico, bem como avaliar potenciais alterações de expressão ou atividade da anidrase carbónica VI na mesma situação. Para isso, será necessário:

1. Comparar perfis proteicos da saliva mista através de técnicas de separação de proteínas, nomeadamente através de eletroforese bidimensional, com separação proteica de acordo com a sua massa molecular e sequencialmente por ponto isoelétrico.
2. Avaliar eventuais alterações de expressão da anidrase carbónica VI de saliva por Western blot.
3. Otimizar um método para a determinação da atividade enzimática da anidrase carbónica na saliva e avaliar potenciais alterações deste parâmetro.

Métodos & Técnicas

Com base numa colaboração com o *Proto-departamento de Desporto e Saúde*, da Universidade de Évora, teve-se acesso a indivíduos obesos sujeitos a um programa de perda de peso intensiva induzida por dieta e exercício físico, provenientes de um programa televisivo intitulado "*Peso Pesado*" (2ª edição).

Durante este programa de perda de peso foram recolhidas amostras de saliva a 10 desses participantes, em 2 recolhas distintas, uma no início e outra depois do programa de perda de peso, após um período de 8 semanas.

Caracterização da amostra & Material biológico

Participaram 10 indivíduos adultos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 19 e os 39 anos, de forma voluntária e devidamente informados e esclarecidos acerca das metodologias aplicadas.

O material biológico em estudo foi saliva mista recolhida de forma não estimulada. As recolhas ocorreram sempre no mesmo período do dia, entre as 14.30h-16.00h, pelo menos 1 hora após a última ingestão de alimentos ou bebidas que não água.

Foi pedido a cada voluntário que durante um período fixo de tempo, 5 minutos, e após lavagem da boca com água, recolhesse toda a saliva produzida na boca para um copo mantido em gelo.

As amostras foram armazenadas a -20°C até posteriores análises laboratoriais. Durante as recolhas de saliva recolheram-se também informações gerais sobre os indivíduos em estudo, tais como peso, altura, idade.

As amostras de saliva foram posteriormente descongeladas em gelo e centrifugadas a 13.000g durante 30 minutos, a 4°C, para a remoção de mucinas e detritos celulares. Recolheu-se o sobrenadante e aliquotaram-se as amostras para as diferentes abordagens em estudo.

As amostras recolhidas foram separadas em dois grupos, o primeiro constituído pelas amostras recolhidas no início do programa de perda de peso, que se denominou 'Antes' e um segundo grupo constituído pelas amostras recolhidas após 8 semanas em programa de perda de peso, 'Depois'.

Seguindo o mesmo protocolo foram recolhidas amostras de saliva mista a indivíduos normoponderais (N=9), as quais foram processadas de forma idêntica ao descrito para os indivíduos obesos, constituindo um terceiro grupo em estudo, 'Controlo'.

Doseamento da proteína total - Método de Bradford

Princípio

Para a quantificação de proteínas totais das amostras de saliva, recorreu-se ao método de *Bradford* através da utilização de um Kit (BioRad Protein assay Ref.500-0006).

De forma geral o método baseia-se na alteração da absorvância do corante de ligação, azul brilhante de *Coomassie G® 250* (CBB-G250), em meio ácido, na qual a sua coloração avermelhada original se converte numa forma azulada por ligação à proteína. O máximo de absorção para o corante varia entre os 495nm e 595nm, sendo o aumento da absorvância proporcional à quantidade de corante ligado, e conseqüentemente à concentração em proteína presente na amostra. É portanto possível a aplicação da lei de *Lambert-Beer*.

Metodologia

Padrões de BSA

A partir de uma solução-mãe de albumina de soro bovino (*BSA*), 2mg.mL⁻¹, prepararam-se uma série de padrões por diluições sucessivas, em água ultrapura, com concentrações de 50, 75,100, 200 e 350 e 500µg.mL⁻¹. Estas seis concentrações e um branco (água ultrapura) foram sempre aplicadas em todas as microplacas utilizadas. A absorvância de padrões e brancos, medida nas mesmas condições das amostras, foi registada e utilizada para traçar uma curva de calibração. O método aplicado foi linear até concentrações de 350µg/ml.

Tratamento da amostra

Dada a variável gama de concentrações em proteína total, das amostras de saliva em estudo, realizaram-se várias diluições das mesmas (2x, 4x, 8x e 12x), a fim de garantir a sua interpolação na curva de calibração. As alíquotas das amostras selecionadas para o ensaio, foram descongeladas, em gelo, e foram preparadas na gama de diluições acima referidas, por diluições sucessivas, em água ultrapura (*miliQ*).

Aplicou-se em triplicados, 10µL de cada diluição da amostra inicial bem como de cada padrão de *BSA* e branco, numa microplaca. Posteriormente adicionou-se 200µL

de reagente de Bradford a cada poço e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. O reagente de Bradford foi preparado através da diluição 1:4 do reagente CBB-G250, presente no Kit (Bio-rad protein assay), com água bi-distilada. A leitura das respectivas absorvâncias foi feita a 630nm*, num leitor de microplacas.

Análise de dados

Após as leituras, foram calculadas médias e respectivos desvios-padrão dos valores de absorvância obtidos. Construíram-se curvas de calibração (exemplo na Figura 6) com os valores médios das absorvâncias dos padrões de *BSA* em função da concentração de proteína. Por interpolação gráfica, e tendo em conta os fatores de diluição aplicados, calculou-se a concentração em proteína para cada amostra em estudo.

*NOTA:

A leitura foi realizada a 630nm, pois é o comprimento de onda mais próximo do máximo de absorção para o cromóforo em que o leitor de microplacas permite fazer a leitura.

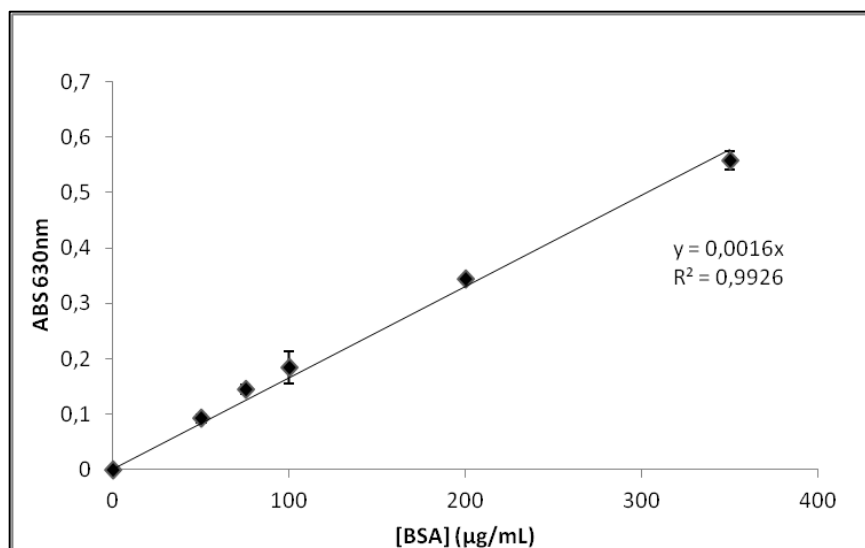


Figura 6. Exemplo de curva de padrões de BSA usada para determinação da concentração em proteína total.

Análise de perfis proteicos - Eletroforese bi-dimensional

Princípio

A análise de perfis proteicos de amostras biológicas, dada a sua complexa constituição em proteínas exige um passo inicial de separação das mesmas para posteriormente identificar cada uma em particular. Uma das tecnologias mais usadas para a separação de misturas complexas é a eletroforese bi-dimensional em géis de poliacrilamida (2D-PAGE). A técnica baseia-se na eletroforese em duas etapas distintas com critérios de separação diferentes. Numa primeira etapa, denominada de primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico num gel com um gradiente de pH. Na segunda etapa, segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular. Posteriormente o gel é corado para visualização do padrão de migração de cada proteína (spot).

Alterações quantitativas e qualitativas no padrão de migração na eletroforese, detetadas na análise das imagens, são reflexo de alterações no perfil proteico da amostra em análise (Furlan *et al.*, 2007).

Metodologia

Para analisar os perfis proteicos por 2D-PAGE das amostras em estudo foram utilizadas 7 amostras do grupo 'Antes' e 7 amostras do grupo 'Depois' e 4 amostras do grupo 'Controlo'.

O volume de cada amostra individual necessário foi calculado de modo a aplicar 160 µg de proteína total. Numa primeira fase, concentrou-se cada amostra por centrifugação, 4°C, 14000 g em membranas com um *cut-off* de 3 kDa (Nanosep 3K omega, PALL corporation). Este passo decorreu pelo tempo necessário para ter a quantidade de proteína de interesse, 160 µg, num volume inferior a 50 µL. Após concentração, o volume de amostra obtido foi misturado com tampão de solubilização [7M ureia, 2M tiourea, 4% (m/v) 1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio (CHAPS), 2% (v/v) mistura de anfólitos (IPG buffer, GE healthcare), 40mM ditiotretitol (DTT)], num volume necessário para, em conjunto com a amostra, perfazer um total de 250 µL. Após um vórtex, deixou-se a mistura a incubar à temperatura ambiente durante 1h, após a qual foi centrifugada, a 10000 rpm, 10

minutos a 10°C. O sobrenadante de cada amostra foi recolhido e aplicado numa das ranhuras do suporte para tiras, do sistema Multiphor II (GE healthcare). Foram usadas tiras de gel, pré-compradas, com gradiente de pH 3-11 NL de 13 cm (IPG strips, GE healthcare). As tiras foram colocadas em contacto com a amostra, em re-hidratação passiva *overnight*, à temperatura ambiente e cobertas com óleo mineral (Dry strip cover fluid, GE healthcare).

Após re-hidratação, as tiras foram colocadas no sistema Multiphor II, para focagem isoeléctrica das proteínas. A focagem ocorreu a uma temperatura constante de 20°C de acordo com o programa: passo 1 – subida para 150V (0:01h), passo 2 - 150V (1:00h), passo 3 – subida para 300V (0:30h), passo 4 – 300V (1:30h), passo 5 – subida para 3500V (4:00h), passo 6 – 3500V (6:00h).

No final da focagem, as tiras foram colocadas em tubos de ensaio com tampa de rosca e armazenadas a -20°C, até realização da segunda dimensão, ou imediatamente usadas para o passo de 2ª dimensão.

Antes da separação por massas moleculares, cada tira foi sujeita a dois passos de equilíbrio de 15 minutos cada. A solução de equilíbrio consistiu em 6M ureia, 75mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Um primeiro passo de redução, no qual foi adicionado, a esta solução, DTT, concentração final de 1% (m/v) e para um segundo passo de alquilação, foi adicionado iodoacetamida, concentração final de 2,5% (m/v). Após estes dois passos cada tira foi lavada com tampão de corrida [0,025MTris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS] e colocada no topo de um gel de 12% de poliácridamida (16 cm X 16 cm e 1 mm de espessura). A tira foi imobilizada no gel de segunda dimensão através da adição de uma solução 0,5% (m/v) de agarose. Nalguns géis foi aplicado marcador de massas moleculares (Dual Color, BioRad, Ref 161-0324).

A corrida eletroforética decorreu numa tina vertical (Protean XL, Bio-Rad), a uma temperatura constante de 20°C, voltagem inicial de 50V, durante 30 minutos, seguida de voltagem constante a 150V até a frente de corrida atingir o fim do gel.

Os géis foram corados numa solução de Azul Brilhante de Coomassie *R-250* e descorados numa solução com 20% metanol e 10% (v/v) ácido acético.

Para a aquisição das imagens dos géis, estes foram digitalizados através do *scanner* ImageScanner III (GE Healthcare) e a análise realizada através do *software* ImageMaster Platinum (GE Healthcare).

Análise de dados

O cálculo das massas moleculares aparentes foi feito através do conhecimento das massas moleculares das proteínas presentes no padrão utilizado. Foi traçada uma curva entre o logaritmo da massa molecular e a mobilidade eletroforética relativa (R_f) das proteínas presentes no padrão. As massas moleculares das proteínas de interesse foram calculadas por interpolação gráfica.

O cálculo dos pontos isoelétricos aparentes foi feito por interpolação gráfica a partir de uma curva *standard* para tiras de 3-11 NL.

Para a análise de géis, fez-se detecção dos *spots*. Posteriormente fez-se a correspondência (*match*) de *spots* entre os diferentes géis em comparação, numa primeira fase, de forma automática, tendo-se posteriormente feito a confirmação de cada um deles. Essa correspondência foi feita numa primeira fase entre os diferentes géis de cada grupo (considerando em cada um deles um gel de referência) e numa segunda fase entre os diferentes grupos (sendo um dos géis de referência de um dos grupos utilizados como gel de referência "global"). A escolha dos géis de referência foi feita tendo como critério a existência de um maior número de spots comparativamente aos restantes géis desse grupo e/ou à totalidade dos grupos.

Foi comparada a percentagem de volume de cada *spot*, de modo a normalizar para pequenas diferenças que pudessem existir na quantidade de proteína corrida em cada gel.

Expressão da CA VI- Imunodeteção por *Western blot*

Princípio

O *western blot* constitui uma técnica amplamente usada em bioquímica que permite identificar proteínas, ou proteínas específicas, com base na afinidade antigénio-anticorpo. A técnica baseia-se na realização de 3 passos essenciais: separação por massa molecular através de eletroforese em SDS-PAGE; transferência para um suporte sólido e a marcação imunológica da proteína alvo (Quintas *et al.*, 2008).

Metodologia

Para o primeiro passo do *western blot* (separação eletroforética por SDS-PAGE) preparam-se os géis de modo a obter uma concentração final em poliacrilamida de 12% e 4%, para o gel de resolução e concentração respetivamente, com dimensões

8x10cm com 7,5mm de espessura, usou-se o sistema da *Bio Rad*, Mini-protean 3Cell e tampão de corrida [0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS].

Determinou-se e aplicou-se o volume necessário de cada amostra de modo a que a quantidade de proteína em cada *lane* correspondesse a 3µg. Cada amostra foi preparada com tampão de amostra [0,125M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS (v/v), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol; vestígios de azul de bromofenol]. As proteínas presentes em cada amostra foram desnaturadas através de incubação da mistura (amostra + tampão de amostra) num banho-seco a 95°C durante 5 minutos, e aplicadas nos poços. Todo o procedimento realizado foi executado em gelo, com exceção do passo de incubação a 95°C.

Numa das *lanes* foi colocado marcador de pesos molecular (marcador dual color, *BioRad*, referência 161-0324). A eletroforese em SDS-PAGE correu com uma voltagem constante de 140V.

Após a separação de proteínas por SDS-PAGE, preparou-se o sistema para a transferência eletroforética (sistema mini trans-blot electroforetic cell da *Bio Rad*). Ativou-se a membrana de PVDF em metanol durante 5 segundos e equilibrou-se todos os constituintes utilizados na transferência em solução de transferência [Tris-HCl 25mM, pH 8.3; glicina 192mM; metanol 20% (v/v); SDS 0,037% (m/v)], durante cerca de 15 minutos e montou-se a “sandwich” do blotting de acordo com as instruções, resumidamente a ordem usada (da extremidade que contacta com o polo negativo para a extremidade que contacta com o polo positivo) foi: esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, esponja. A transferência decorreu a uma corrente constante de 350mA, durante 1h.

De forma a confirmar o sucesso na transferência das bandas pretendidas, corou-se com *Ponceau S* [0,2% (m/v) reagente *Ponceau*; 3% ácido acético] as membranas e digitalizou-se.

O bloqueio das membranas foi feito com TBS-T [Tris-HCl 25Mm, pH 7.6, NaCl 150mM; 0,1% tween-20] suplementado com 5% de leite magro em pó, a 4°C *overnight*.

As membranas foram então incubadas com anticorpo primário anti-anidrase carbónica [CA VI H-40: ref. Sc-99173; Santa Cruz Biotechnonogy; diluição 1:200], diluído em tampão TBS-T durante duas horas, à temperatura ambiente. Seguiu-se a uma série de lavagens (3 x 15') em TBS-T e a incubação com anticorpo secundário [Anti-coelho IgG-FA; ref. Sc-2004; Santa cruz Biotechnonogy; diluição 1:10000], 2h à temperatura ambiente.

A imunodeteção foi realizada utilizando um sistema quimiofluorescente, usando o substrato da fosfatase alcalina ECF [Western blotting reagent pack, ref: 95.064.981,

GE]. Esperou-se 2 minutos para o desenvolvimento da coloração, e por recurso a um transiluminador da Bio-Rad procedeu-se à aquisição da imagem (Gel-Doc system).

Análise de dados

A análise da imagem foi feita recorrendo ao *software* Quantity-one (Bio-Rad). Todos os dados na imagem foram semiquantificados usando as ferramentas existentes. Através do uso do *software* foram calculados os volumes ajustados de cada banda, os quais foram comparados entre amostras diferentes.

Tendo em conta a impossibilidade de utilizar uma proteína salivar que possa funcionar como "calibrador interno" da quantidade de proteína corrida em cada *lane*, e de modo a poder comparar amostras presentes em membranas diferentes, foi escolhida uma membrana como "referência". Amostras desta membrana que também estavam presentes noutras membranas foram usadas para ajustar os valores de membranas diferentes.

Exemplo: Existência de três amostras comuns a 2 membranas: calculou-se o rácio entre volumes ajustados das bandas dessas amostras entre as 2 membranas, fez-se a média dos rácios e aplicou-se esse valor médio para "ajustar" os volumes das bandas das restantes amostras.

Atividade enzimática CA

Considerações gerais sobre cinética enzimática

A cinética enzimática tem por objetivo estudar a velocidade das reações catalisadas enzimaticamente.

Estuda-se assim o tipo de reações que determinado enzima pode catalisar, o tipo de substratos com os quais pode interatuar e como se pode alterar a sua atividade variando as condições de ensaio, tais como temperatura, pH, tempo de incubação, concentração de substrato, cofatores, de inibidores ou ativadores, de forma a compreender como varia a velocidade da reação que catalisa (Cornish-Bowden, A., 1995).

Metodologia

Uma vez que o ensaio para a atividade da anidrase carbónica não se encontra otimizado para amostras de saliva, houve a necessidade de avaliar diferentes fatores

de forma a otimizar um ensaio executável, viável e em que seja possível medir adequadamente a atividade enzimática da anidrase carbônica VI de saliva humana.

O método que se propõem é baseado nos artigos de Verpoorte *et al.* (1967) e Koz *et al.* (2012).

Em ambos os artigos o ensaio para a determinação da atividade enzimática baseia na avaliação da atividade esterase. Seguem por espectrofotometria a degradação do 4-nitrofenilacetato a ião 4-nitrofenilato, seguindo-se o aumento de absorvância a 348nm (Figura 7).

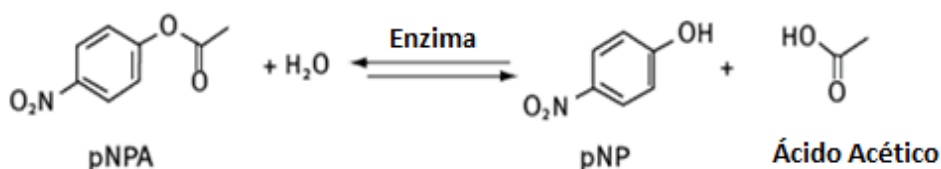


Figura 7. Esquema da reação da degradação do ião 4-nitrofenilacetato a 4-nitrofenilato.

A. Otimização

De forma a minimizar o gasto de grandes volumes de amostra, miniaturizou-se o ensaio para ser realizado em microplacas.

Para a execução de todos os passos de otimização do método proposto recorreu-se a amostras de saliva de indivíduos normoponderais, aos quais se seguiram todas as normas de recolha descritas anteriormente e tratamentos subsequentes, ver Anexo I.

Preparação do substrato

O 4-nitrofenilacetato (Sigma) foi preparado com concentração inicial de 3 mM, de acordo com Verpoort *et al.* (1967) por dissolução de 27,2mg do éster em 1mL de acetona e dissolução vigorosa com água até perfazer um volume de 50mL. Esta é uma solução extemporânea.

Preparação do tampão

Preparou-se tampão Tris-HCl 0,05M pH 7.4 para os diferentes ensaios.

Abordagens em teste

Fez-se uma primeira abordagem à miniaturização do ensaio proposto por Verpoorte *et al.* (1967), que se designou por abordagem A. Tendo em conta os resultados obtidos [em Resultados & Discussão - Atividade da anidrase carbónica] houve necessidade de realizar alguns ajuste, no sentido de aumentar o volume de amostra a utilizar, tendo sido elaborada a abordagem B (Tabela 4).

Tabela 4 - Condições de ensaio e soluções utilizadas em cada abordagem em estudo (A e B).

	A.		B.			
Soluções	Amostras	Branco	Amostras			Branco
Tampão Tris-HCL 0,05M pH 7.4	120µL		80µL			
Substrato 4-NPA ([] _f = 1,05mM)	70µL		70µL			
Amostra de saliva	10µL		10µL	20µL	50µL	-----
Água		10µL				
Soro fisiológico			40µL	30µL	-----	50µL
	Condições:					
Leitura	405nm*					
Tempo (min)	60min					
Temperatura	Ambiente					

Nota: * o ensaio foi seguido a 405nm, segundo Verpoorte *et al.* (1967) é possível seguir a reação também a este comprimento de onda.

Cada ensaio em teste decorreu pela adição dos volumes na tabela acima descritos e para as condições descritas, a reação foi sempre iniciada pela adição do substrato 4-NPA.

Confirmação do comprimento de onda (λ) e Determinação do percurso ótico em microplaca

Para confirmar a possibilidade de seguir a reação com algum dos comprimentos de onda disponíveis no leitor de microplacas, traçou-se o espectro de uma das amostras (Figura 8). O valor de comprimento de onda escolhido foi 405nm, que está de acordo com o sugerido por Verpoorte *et al.* (1967).

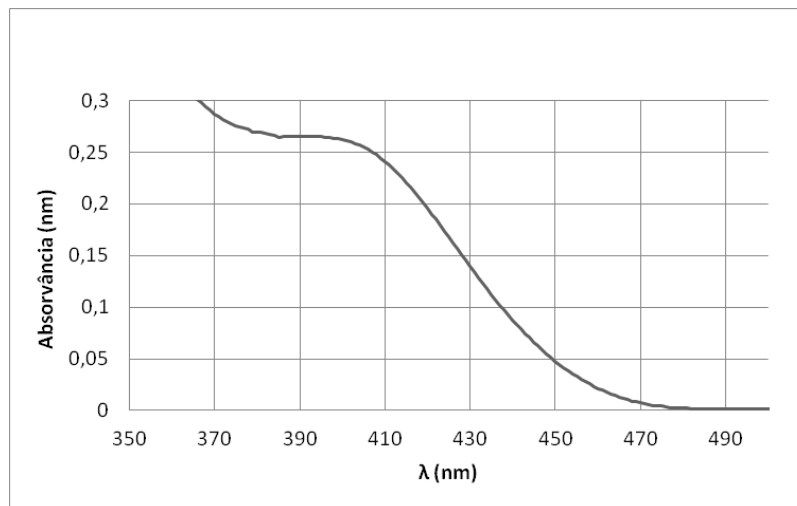


Figura 8. Espectro de absorção para amostra em estudo.

Determinou-se a absorvância para uma mesma amostra, por espectrofotometria e por ensaio em microplaca (utilizou-se uma amostra de saliva e respetivo branco) e deduziu-se por aplicação da Lei de *Lamber-Beer* o percurso ótico em microplacas, tendo em conta o coeficiente de absorvidade molar 4-NPA (ϵ) = $16,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Verpoort *et al.*, 1967), correspondendo este a 0,803cm.

I. Estudo da influência da concentração de proteína

Realizou-se ensaios da atividade da anidrase carbónica nas amostras de saliva, testando-se uma bateria de diluições sucessivas (1x; 4/3x; 2x; 5x e 10x) para uma amostra com concentração proteica conhecida.

II. Influência da concentração de substrato

Testou-se uma bateria de diluições sucessivas a partir da solução-mãe de substrato 4-NPA, com concentrações entre 3mM e 0,023mM. Cada concentração de substrato foi analisada utilizando um branco apropriado, preparado com a concentração em

substrato respetiva. Tendo em conta a diluição que o substrato sofre na mistura reacional, as concentrações de substrato finais serão entre 1,05mM e 0,008mM.

III. Influência do pH do sistema tampão

Preparou-se o sistema tampão em estudo, Tris-HCL, para uma gama de pH a variar entre 7.0 e 7.6.

B. Aplicação do método proposto às amostras em estudo

Após todos os passos de otimização descritos anteriormente e encontradas as melhores condições para determinação da atividade enzimática, aplicou-se o ensaio otimizado, correspondente à abordagem B, a 5 dos indivíduos em estudo, nas duas situações em análise (Antes e Depois) e a 5 indivíduos do grupo controlo.

Tratamento estatístico

Os diferentes parâmetros em estudo foram analisados através de estatística descritiva. A existência de distribuição normal e a homoscedasticidade foram testadas, respetivamente, pelas metodologias Kolmogorov-Smirnov e Levene. As variáveis foram testadas por Análise de Variância (one way-ANOVA). Sempre que as diferenças foram significativas as médias foram comparadas, utilizando o teste de Duncan. Foi ainda utilizado o teste T de student para amostras pareadas, para comparação das expressões de CA VI, numa situação de antes e após perda de peso.

A avaliação do grau entre diferentes variáveis foi feito através do cálculo do coeficiente de Pearson (r).

As diferentes análises estatísticas foram realizadas através da utilização do *software* NCSS 2001 e as diferenças foram consideradas significativas para um intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

Resultados & Discussão

Caraterização da amostra em estudo

Para os 10 indivíduos envolvidos no estudo, como foi referido, foram recolhidas amostras de saliva em duas recolhas distintas e dados antropométricos dos mesmos. Nas tabelas abaixo encontram-se resumidos os dados relativos à sua condição corporal, para as duas situações em análise, antes e depois da perda de peso por restrição calórica e exercício físico intenso, bem como para os indivíduos tomados como controlo (Tabela 5 e 6).

Tabela 5. Registo de dados antropométricos dos indivíduos no estudo antes do programa de perda de peso e exercício físico e depois do mesmo programa.

ID Indivíduo	Género	Idade	Altura (m)	ANTES		Depois		% Perda de peso
				Peso inicial	IMC (kg/m ²)	Peso final	IMC (kg/m ²)	
1	M	32	1,69	133,7	46,81	92,6	32,4	30,74
2	F	24	1,66	117,6	42,68	94,8	34,4	19,39
3	F	25	1,59	100	39,56	68,2	27,0	31,80
4	M	35	1,82	131,6	39,73	105,7	31,9	19,68
5	F	31	1,74	103,4	34,15	78,7	26,0	23,89
6	F	21	1,6	126,6	49,45	95,9	37,5	24,25
7	M	22	1,8	129,8	40,06	85,2	26,3	34,36
8	M	34	1,84	197,3	58,28	176,2	52,0	10,69
9	M	39	1,74	150,7	49,78	106,2	35,1	29,53
10	F	19	1,73	115,9	38,72	101,1	33,8	12,77

Tabela 6. Registo de informações referentes aos participantes controlo.

ID Indivíduo	Género	Idade	Altura (m)	Peso (kg)	IMC (kg.m ⁻²)
C2	F	42	1,62	50	19,1
C4	F	22	1,68	56	19,8
C5	F	63	1,60	57	22,3
C6	F	56	1,49	46	20,7
C7	F	40	1,62	55	21,0
C8	F	35	1,70	68	23,5
C9	F	42	1,64	61	22,7
C20	F	35	1,75	55	18,0
C21	F	25	1,68	61	21,6

Obesidade	Magreza suave
	Peso Normal
	Excesso de peso
	Grau I
	Grau II
	Grau III

Todos os indivíduos obtiveram perdas de peso decorrentes do programa em que estavam inseridos. Ao fim de 8 semanas (período compreendido entre as 2 recolhas) apresentavam perdas de peso significativas, (Tabela 5 e Figura 9 e 10). Alguns deles conseguiram mesmo alcançar IMC muito próximos dos considerados para peso normal, de notar os participantes 3, 5 e 7 (ver Tabela 5 e 6, Figura 9 -B1).

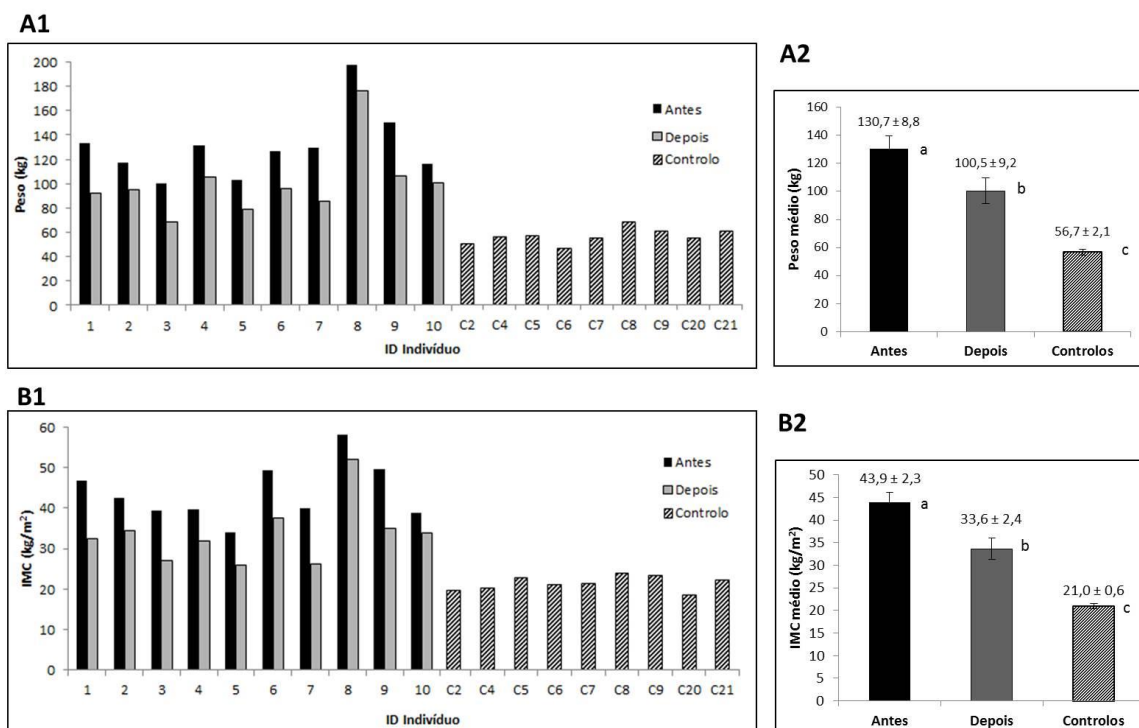


Figura 9. Peso e IMC dos indivíduos antes e depois do programa de perda de peso e dos indivíduos controlo, valores médios ± EPM. A1: Peso em kg de cada individuo em estudo; A2: Peso médio em kg para cada grupo em estudo (Antes, Depois e Controlo); B1: IMC para cada individuo em estudo; B2: IMC médio em cada grupo em estudo (Antes, Depois, Controlo); letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, para (P<0,05) .

Analisando a percentagem de perda de peso dos indivíduos em estudo (Figura 10), os indivíduos 1, 3, 7 e 9 mostraram ter perdido as maiores percentagens de peso (na ordem dos 30%) já os indivíduos 8 e 10, ao fim das 8 semanas em exercício físico e restrição calórica apenas perderam cerca de 10% de peso. Não obstante as percentagens de perda de peso, todos os indivíduos conseguiram baixar o grau de severidade da obesidade, com exceção do individuo 8, que mesmo perdendo peso manteve obesidade mórbida (IMC de 52kg/m²).

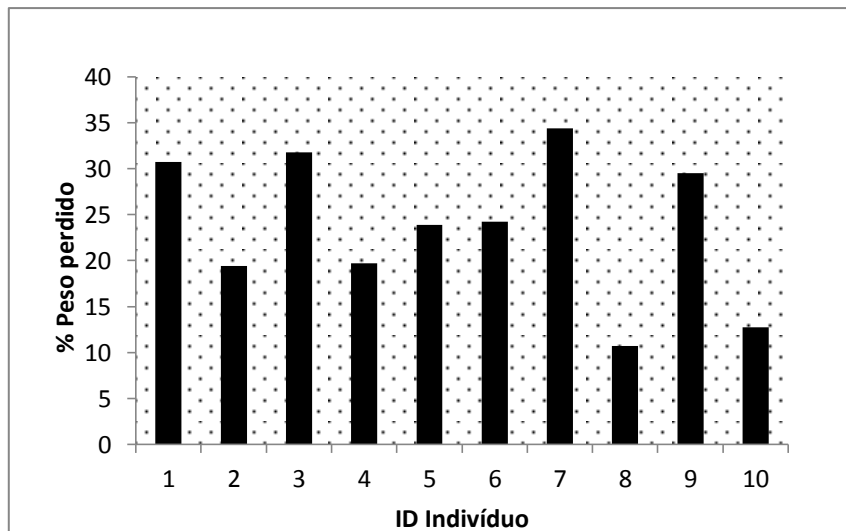


Figura 10. Percentagem de perda de peso para cada indivíduo em estudo, ao fim de 8 semanas em programa de perda de peso.

Os resultados obtidos neste estudo vão ao encontro de diversos estudos publicados, no que diz respeito a perdas de peso decorrentes de exercício físico intenso e restrição calórica. Um estudo que inclui 90 adultos obesos, com IMC médio de $31,5\text{kg/m}^2$, durante 12 semanas em exercício físico com e sem dieta hipocalórica e 12 semanas de monitorização observacional, mostra que no fim do ensaio o grupo sujeito a dieta e exercício físico apresentava diminuições significativas de peso e IMC, 8% e 12% respetivamente. Tal situação não se verificava no grupo sujeito apenas a exercício físico, demonstrando assim a contribuição decorrente da adição de restrição calórica na perda de peso (Melanson *et al.*, 2004).

Um outro estudo com indivíduos numa situação bastante similar à que se encontra neste estudo (17 indivíduos obesos, provenientes dum programa televisivo “*Biggest Loser*”, sujeitos igualmente a condições de exercício físico intenso e restrição calórica moderada, por um período de 7 meses) verifica reduções de peso bastante elevadas, na ordem dos 39% (Ahmadi *et al.*, 2011). Estas situações corroboram os dados observados no nosso estudo, na qual indivíduos sujeitos a programas de exercício físico intensivo e restrição calórica apresentam reduções de peso bastantes elevadas.

Doseamento da proteína total

Todos os ensaios de determinação da proteína total das amostras em estudo decorreram como passo prévio às diferentes abordagens experimentais aplicadas neste estudo.

Por aplicação do método de Bradford, como descrito na seção dos Materiais & Métodos, determinou-se para todas as amostras dos grupos em estudo a concentração em proteína total, (Tabela 7).

Tabela 7. Concentrações de proteína total das amostras de saliva mista, para todos os indivíduos em estudo. Concentrações proteicas médias e respectivos desvios-padrão, relativos à análise das amostras em triplicado.

ID Participante	ANTES	DEPOIS
	[Proteína total] _{média} ± DP (µg/mL)	
1	419,97 ± 32,04	768,41 ± 113,92
2	429,93 ± 15,38	445,13 ± 12,90
3	432,89 ± 15,34	314,82 ± 92,05
4	371,60 ± 28,10	335,62 ± 15,88
5	598,34 ± 52,30	330,90 ± 0,03
6	261,86 ± 20,41	370,36 ± 7,46
7	247,33 ± 24,11	270,27 ± 9,62
8	438,05 ± 14,61	675,24 ± 123,45
9	1398,78 ± 363,68	420,44 ± 15,79
10	223,29 ± 3,84	538,27 ± 136,78
	Controlos	
C2	511,75 ± 91,04	
C4	723,09 ± 66,85	
C5	298,40 ± 12,43	
C6	382,15 ± 17,81	
C7	186,12 ± 66,55	
C8	452,40 ± 52,59	
C9	383,75 ± 79,55	
C20	611,11 ± 29,54	
C21	656,67 ± 153,68	

De acordo com os resultados não se observam diferenças significativas entre os grupos em estudo (Figura 11B) nem se observa nenhuma tendência no que diz respeito aos indivíduos em programa de perda de peso (Figura 11A), já que em 4 dos indivíduos em programa de perda de peso a concentração proteica da saliva mista aumenta, em 3 indivíduos a concentração em proteína diminui com a perda de peso e nos restantes 3 indivíduos não se verificam alterações na concentração proteica com a perda de peso.

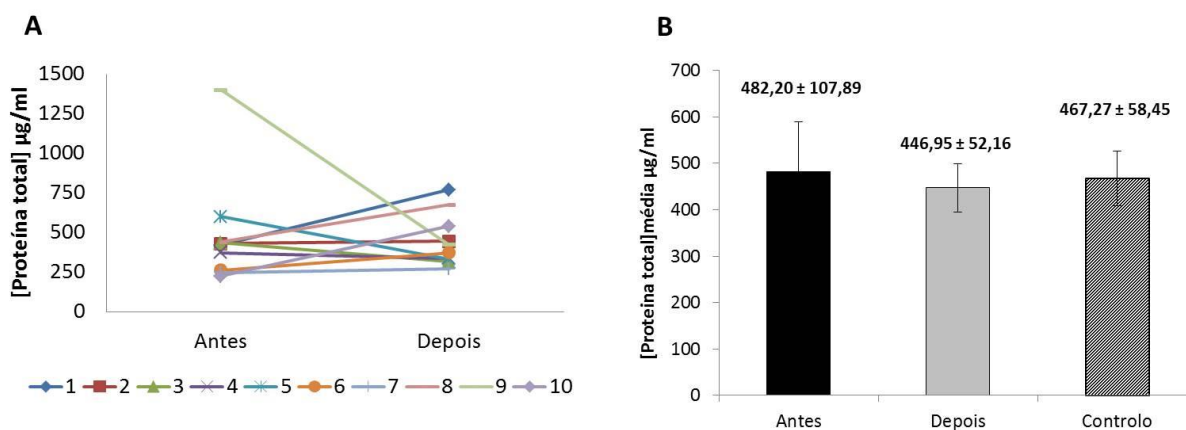


Figura 11. Concentração em proteína total da saliva mista. A – Concentração em proteína total dos indivíduos em programa de perda de peso nas situações antes e depois da perda de peso. B - Concentração em proteína total média de cada grupo em estudo (Média ± EPM).

Poucos são os estudos que referem valores da concentração em proteína salivar total relacionados com perda de peso ou estados de obesidade.

Um estudo envolvendo 48 indivíduos com síndrome *Prader-Will*, cujo fenótipo característico é obesidade, mostrou concentrações em proteína total salivar mais elevadas comparativamente a grupos de indivíduos saudáveis. Neste estudo 38% dos participantes tinham um IMC superior a 30kg/m^2 (Saeves *et al.*, 2012).

Segundo (Panunzio *et al.*, 2010), num estudo envolvendo crianças em idade escolar, de ambos os sexos, observa-se que em indivíduos com IMC mais elevado, a concentração proteica da saliva não estimulada é superior. Este estudo revela um aumento de cerca de 26,2% da concentração proteica em obesos comparativamente a indivíduos controlo. Dados obtidos no nosso laboratório, com mulheres obesas, também mostram concentrações proteicas mais elevadas em indivíduos com IMC mais altos. Para além disso, quando há perda de peso induzida por cirurgia bariátrica estes valores já se aproximam dos de indivíduos normoponderais (Lamy *et al.*, 2013).

Já dados de um estudo de (Walsh *et al.*, 2004), com 12 homens, indicam que a concentração em proteína total aumenta associada a alterações de perda progressiva no IMC, durante desidratação aguda progressiva decorrente de exercício físico intenso.

Estas diferenças entre os resultados obtidos nos diversos estudos podem dever-se às diferentes condições experimentais nomeadamente ao género e idades estudados, bem como ao processo que conduziu à perda de peso (de Roux *et al.*, 2006; Adeniyi *et al.*, 2013).

Análise do perfil bi-dimensional

Dos géis obtidos por eletroforese bi-dimensional (4 indivíduos controlo, 7 indivíduos antes da perda de peso e 7 indivíduos depois da perda de peso), 2 do grupo de indivíduos de perda de peso não estavam em condições de análise, pelo que foram excluídos.

A partir da análise dos géis foram encontrados 63 *spots* diferencialmente expressos (Tabela 8 e Figura 12).

Tabela 8 - Spots proteicos diferencialmente expressos em saliva mista, nos diferentes grupos experimentais. Valores de percentagem de volume (Média ± EPM).

Spot	MW aparente	pI aparente	Expressão (% volume)		
			Antes	Depois	Controlo
SPOTS ALTERADOS EM INDIVDUOS OBESOS COMPARATIVAMENTE A NORMOPONDERAIS					
Expressão aumentada (voltando a valores controlo após perda de peso)					
9	12,4	8.2	5,94 ± 0,83	0,48 ± 0,14	0,48 ± 0,14
71	11,7	5.7	0,72 ± 0,17	0,48 ± 0,05	0,18 ± 0,04
145	11,9	5.4	7,35 ± 3,38	0,76 ± 0,19	0,79 ± 0,21
Expressão aumentada (não chegando a valores controlo após perda de peso)					
122	13,7	7.1	1,46 ± 0,53	0,40 ± 0,07	0
Expressão diminuída (voltando a valores controlo após perda de peso)					
2	21,5	6.0	0	0,34 ± 0	0,16 ± 0,02
5	61,7	5.7	0	0,40 ± 0,28	0,20 ± 0,03
6	47,9	5.7	0	0,06 ± 0,02	0,13 ± 0,04
19	50,8	7.1	0	0,04 ± 0,009	0,12 ± 0,05
30	12,4	9.2	0	0,72 ± 0,23	0,44 ± 0,05
41	50,8	5.9	0	0,02 ± 0,006	0,07 ± 0,01
42	49,8	5.7	0	0,080 ± 0,04	0,2 ± 0,07
43	52,8	6.1	0	0,03 ± 0,005	0,06 ± 0,01
58	46,0	6.0	0,10 ± 0,03	0,35 ± 0,12	0,65 ± 0,21
59	46,0	6.1	0,10 ± 0,03	0,27 ± 0,09	1,10 ± 0,32
65	34,3	5.3	0	0,14 ± 0,05	0,32 ± 0,10
66	11,3	6.0	0	0,27 ± 0,06	0,29 ± 0,04
67	11,0	6.3	0	0,15 ± 0,04	0,07 ± 0,01
69	12,7	7.1	0	0,67 ± 0,23	0,33 ± 0,19
76	21,5	6.2	0	0,17 ± 0,09	0,63 ± 0,43
87	62,9	6.1	0,60 ± 0,14	1,86 ± 0,42	1,69 ± 0,24
108	78,0	6.3	0	0,36 ± 0,15	0,69 ± 0,24
173	36,8	6.2	0,35 ± 0,10	0	0
176	36,8	6.1	0,20 ± 0,05	0	0
180	46,0	6.0	0,27 ± 0,09	0	0
181	12,3	5.7	1,60 ± 0,62	0	0
182	48,8	6.4	0,23 ± 0,03	0	0
183	12,4	7.2	1,34 ± 0,15	0	0

193	53,8	6.2	0,22 ± 0,06	0	0
194	53,8	6.2	0,46 ± 0,20	0	0
195	52,8	7.0	0,20 ± 0,07	0	0
196	52,8	6.9	0,12 ± 0,02	0	0
221	37,9	5.6	0	0,11 ± 0,02	0,17 ± 0
224	52,8	5.6	0	0,09 ± 0,06	0,13 ± 0,04
229	18,0	7.5	0	0,15 ± 0,04	0,22 ± 0,05
Expressão diminuída (aumentando após perda de peso, mas para valores abaixo de controlo)					
17	40,1	5.6	0	0,04 ± 0,003	0,18 ± 0,08
20	46,9	5.6	0	0,04 ± 0,010	0,17 ± 0,08
38	47,9	6.2	0	0,11 ± 0,03	0,81 ± 0,14
55	35,7	5.8	0	0,06 ± 0,02	0,50 ± 0,21
104	78,0	8.0	0	0,14 ± 0,02	0,35 ± 0,06
SPOTS NÃO ALTERADOS EM INDIVDUOS OBESOS MAS COM ALTERAÇÕES APÓS PERDA DE PESO					
Expressão aumentada (comparativamente à fase anterior à perda de peso, sem diferir dos controlo)					
31	13,7	9.5	1,61 ± 0,56	7,11 ± 1,46	4,21 ± 2,33
45	61,7	5.9	0,37 ± 0,08	1,51 ± 0,46	0,73 ± 0,20
47	62,9	6.0	1,88 ± 0,36	6,28 ± 1,52	5,55 ± 1,56
Expressão aumentada (comparativamente à fase anterior à perda de peso e controlo)					
86	59,3	6.2	0,78 ± 0,28	2,17 ± 0,42	0,52 ± 0,12
212	40,1	5.6	0	0,07 ± 0,02	0
218	42,6	5.8	0	0,05 ± 0,02	0
227	17,7	8.2	0	0,52 ± 0,18	0
239	14,0	8.0	0	0,20 ± 0,08	0
243	60,5	5.8	0	0,51 ± 0,15	0
Expressão diminuída (comparativamente à fase anterior de perda de peso e controlo)					
7	53,8	6.0	0,27 ± 0,04	0,05 ± 0,09	0,15 ± 0,02
8	53,8	5.9	0,24 ± 0,83	0,06 ± 0,02	0,18 ± 0,02
35	32,4	6.1	0,16 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,29 ± 0,13
40	47,9	6.2	0,28 ± 0,16	0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,05
SPOTS ALTERADOS EM INDIVDUOS OBESOS ANTES E DEPOIS PERDA DE PESO COMPARATIVAMENTE A NORMOPONDERAIS					
Expressão aumentada (no controlo)					
48	58,2	5.9	1,88 ± 0,36	6,28 ± 1,51	5,55 ± 1,56
52	53,8	5.7	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,30 ± 0,03
127	50,8	6.0	0	0	0,11 ± 0,03
129	42,6	5.8	0	0	0,16 ± 0,06
132	35,7	6.2	0	0	0,18 ± 0,08
137	26,6	5.7	0	0	0,11 ± 0,003
139	35,7	6.0	0	0	0,27 ± 0,14
142	21,1	7.2	0	0	0,69 ± 0,13
152	47,9	6.0	0	0	0,44 ± 0,18
155	18,0	6.1	0	0	0,22 ± 0,08

Para se poder propor alguns *spots* como bons "biomarcadores", é necessário que a expressão desses *spots* varie no mesmo sentido em todos (ou na grande maioria) dos indivíduos de um determinado grupo comparativamente a todos (ou praticamente todos) os indivíduos dos restantes grupos. Tendo em conta este critério, neste trabalho podemos propor 11 possíveis "biomarcadores". Os *spots* 30, 87, 127, 129, 139, 142 e 152, na qual a sua ausência ou expressão diminuída poderá representar obesidade; o *spot* 194 que pode ser visto como possível marcador de obesidade uma vez que apenas está expresso em todos os indivíduos do grupo 'Antes' da perda de peso; e os *spots* 31 e 227, como possíveis marcadores da perda de peso por exercício físico intenso e dieta, uma vez que só se encontram presentes (ou aumentam significativamente) no grupo 'Depois' da perda de peso e em todos os indivíduos com exceção de um.

Há ainda o *spot* 122 que poderá ser visto como possível marcador de indivíduos que já foram obesos mas que perderam peso, uma vez que apesar de diminuírem significativamente a expressão em relação ao período "antes" da perda de peso, continuam com expressão mais elevada relativamente ao controlo.

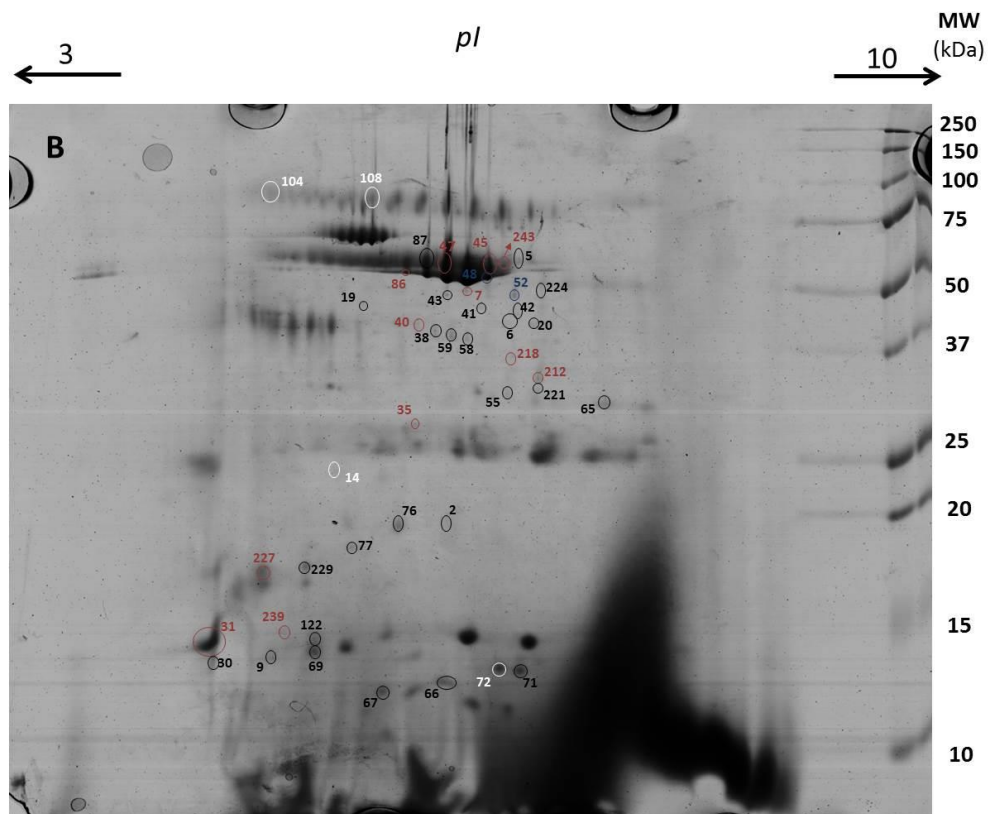
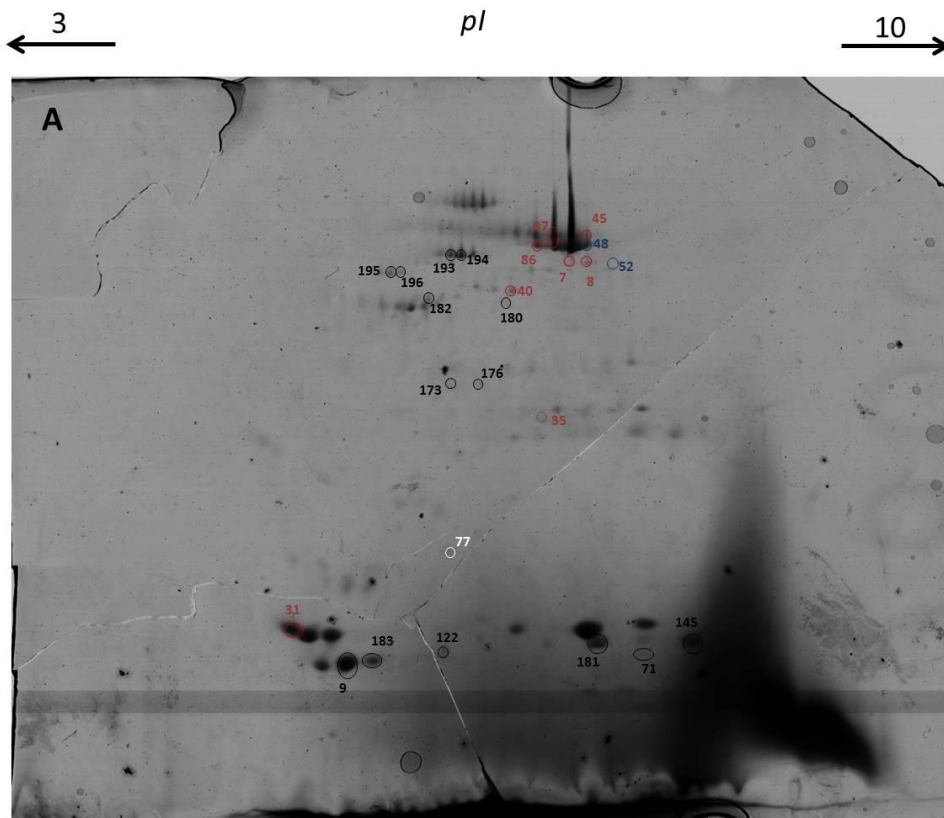
Apesar de, no presente trabalho, não terem sido feitas identificações das proteínas presentes nos *spots* diferencialmente expressos, comparando a posição dos *spots* com aquela observada em perfis proteicos de saliva mista de humanos (Vitorino *et al.*, 2012; Jessie *et al.*, 2010), onde foram feitas identificações proteicas é possível sugerir que algumas das alterações seja a nível da proteína CA VI.

De acordo com os referidos perfis, há a probabilidade dos *spots* 38, 40, 58, 59 e 152 corresponderem a esta proteína. Assim, é possível que uma das alterações salivares decorrentes da obesidade e perda de peso seja a nível de uma proteína como a CA VI, frequentemente associada à sensibilidade gustativa e condições do meio oral (Culp *et al.*, 2011; Arabaci *et al.*, 2013)

Destes, 3 dos *spots* (38, 58 e 59) apresentam uma expressão mais baixa em obesos antes da perda de peso, comparativamente a indivíduos normoponderais, aumentando a expressão após perda de peso. Já o *spot* 40 apresenta expressão diminuída com a perda de peso, e o *spot* 152 expressão diminuída em indivíduos obesos, quer antes, quer após perda de peso, relativamente a indivíduos normoponderais.

Admitindo que estes *spots* correspondam a isoformas diferentes da mesma proteína (CA VI), é de pensar que a função de cada uma destas isoformas possa ser diferente. Assim uma futura identificação destes, para confirmação, é importante no sentido de melhor compreender o papel desta proteína na obesidade e perda de peso.

Do mesmo modo, a identificação futura das proteínas presentes nos outros *spots*, com expressão alterada, será importante no sentido de melhor compreender as alterações nos perfis proteicos decorrentes da condição em estudo.



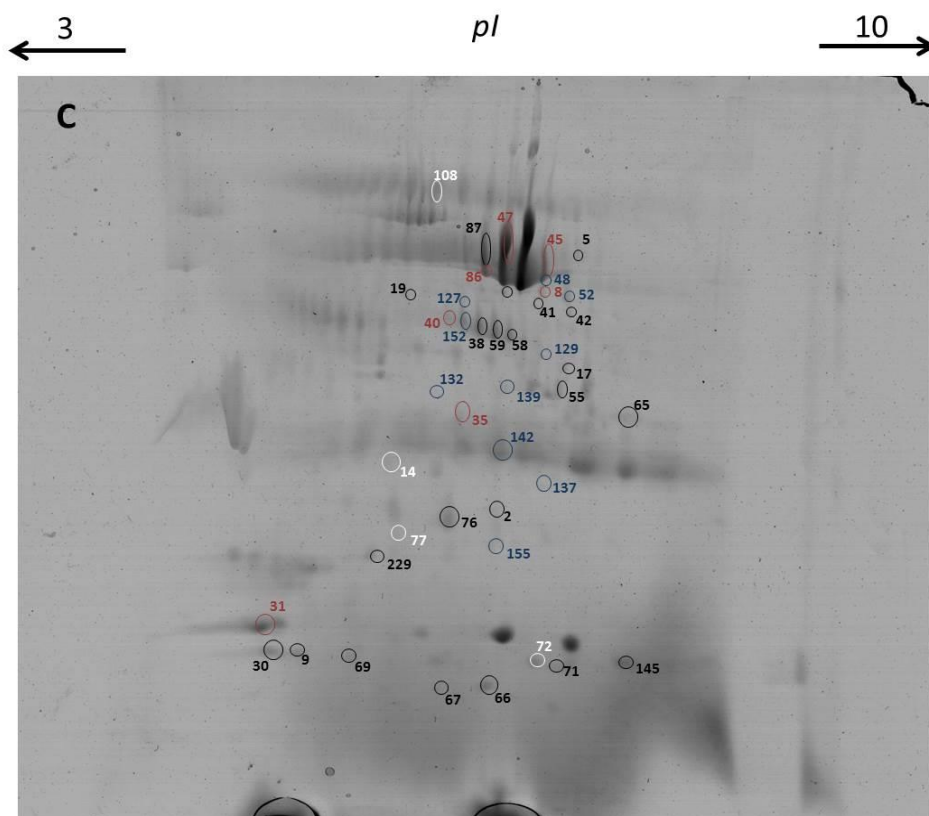


Figura 12. Géis bi-dimensionais. Géis representativos de amostras de indivíduos em programa de perda de peso por exercício físico e restrição calórica (A) Antes da perda de peso, (B) Depois da perda de peso, (C) Controlo.

Spots a Preto: Spots alterados em indivíduos obesos comparativamente a normoponderais; **Spots a Vermelho:** Spots não alterados em indivíduos obesos mas com alterações após perda de peso; **Spots a azul:** Spots alterados em indivíduos obesos antes e depois perda de peso comparativamente a normoponderais; **Spots a branco:** outros spots sem contribuições.

Análise da expressão CA VI - Imunomarcação por western blot

A imunomarcação para a análise da expressão da anidrase carbónica VI foi feita em diferentes membranas (Figura 13, Anexo II) cada uma das quais contendo amostras dos indivíduos referentes aos dois grupos em estudo (antes e depois da perda de peso) bem como amostras de indivíduos controlo. Para além da marcação observada na zona de 42kDa, que corresponde à zona de massa molecular esperada para a anidrase carbónica VI, observou-se forte marcação inespecífica, situação já relatada em outros estudos (Lamy E., 2013; Sequeira M., 2012).

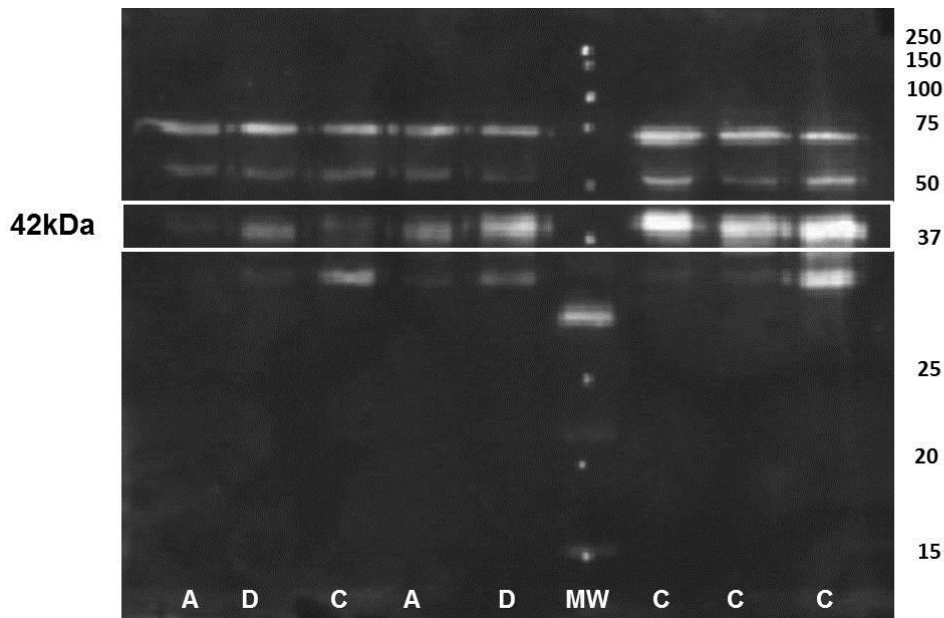


Figura 13. Membrana marcada com anticorpo CA VI, com identificação da banda com 42kDa correspondente à anidrase carbónica VI. A - amostras referentes ao grupo 'Antes'; D - amostras referentes ao grupo 'Depois' e C - amostra referente ao grupo 'Controlo' com a respetiva identificação do individuo a que pertence. MW - marcador de massas moleculares.

De forma a permitir a comparação entre as diferentes amostras, foram avaliados os volumes ajustados para cada membrana marcada com o anticorpo para a anidrase carbónica VI, obtidos através do *software* Quantity one, analisando o total de amostras em estudo para a banda de massa molecular aparente de 42 kDa, referida na bibliografia como a banda correspondente à anidrase carbónica VI.

De uma forma geral, no que diz respeito a uma análise individual de cada participante nos dois momentos em análise (antes e depois da perda de peso), observou-se uma tendência para a expressão da anidrase carbónica VI, ser superior depois da perda de peso excetuando para o indivíduo 6, que mostra uma tendência claramente contrária (Figura 14A).

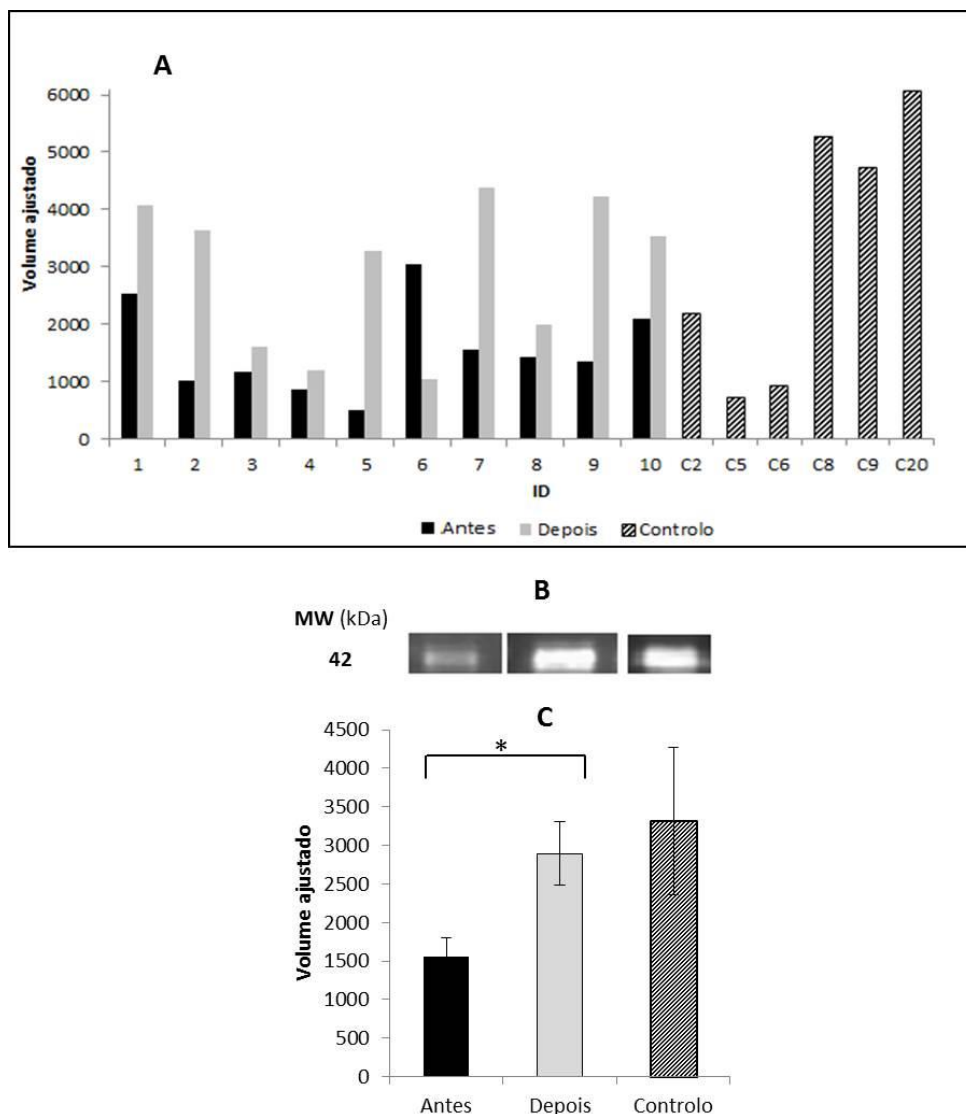


Figura 14. Expressão da anidrase carbónica VI para os diferentes indivíduos em estudo. A - Expressão individual da anidrase carbónica VI; B – imagem representativa das marcações observadas nas membranas; C – comparação entre os grupos em estudo; * diferenças significativas ($P < 0,05$).

Comparando os grupos em estudo (Figura 14; A e C) observa-se um aumento da expressão da anidrase carbónica VI com a perda de peso ($1560,10 \pm 246,16$, $2897,11 \pm 411,16$; $3319,83 \pm 954,25$, respetivamente para o grupo antes, depois e controlo, (Média \pm EPM), relativamente à expressão observada antes desta, ($P = 0,024$).

Fazendo a análise tendo em conta os diferentes géneros, parece existir uma tendência em ambos para um aumento da expressão de CA VI com a perda de peso. No caso dos homens, os valores de expressão são significativamente mais elevados após a perda de peso ($1551,30 \pm 269,72$ e $3179,90 \pm 656,84$, valores médios de expressão, respetivamente para antes e depois (Média \pm EPM); $P = 0,038$). No caso das mulheres a diferença não é significativa se considerarmos o indivíduo 6, que tem

um comportamento contrário. No entanto, fazendo a análise excluindo este indivíduo há um aumento significativo da expressão de CA VI com a perda de peso ($1201,03 \pm 328,01$ e $3007,50 \pm 473,86$, valores médios de expressão respetivamente para antes e depois (Média \pm EPM); $P=0,020$).

Considerando todos os indivíduos dos diferentes grupos em estudo, a expressão da anidrase carbónica apresenta uma tendência para uma correlação moderada negativa com o IMC ($r = -0,38$; $P=0,056$), ou seja, parece haver uma ligeira tendência para os indivíduos com IMC mais elevado apresentarem menor expressão desta proteína (Figura 15).

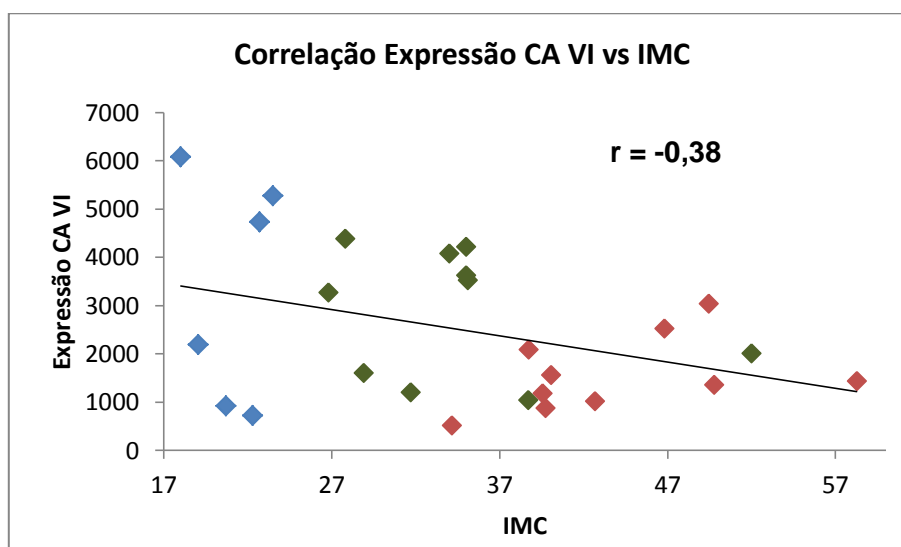


Figura 15. Correlações entre expressão da anidrase carbónica VI e o IMC, considerando dados de todos os indivíduos em estudo. Marcador azul: controle; marcador verde: Depois; marcador vermelho: Antes.

No que diz respeito à relação entre a expressão da CA VI e a perda de peso, considerando homens e mulheres em conjunto, os dados não parecem estar relacionados.

Fazendo a análise tendo em conta os dois géneros em separado, observa-se que, no caso das mulheres, há uma tendência para uma correlação forte entre a expressão de CAVI e o IMC. Isto numa situação anterior à perda de peso ($r=0,80$; $P=0,11$) (Figura 16). Já após perda de peso estes dois parâmetros deixam de estar correlacionados ($r=-0,14$; $P=0,82$). A falta de significância estatística pode dever-se ao N estudado não ser muito elevado.

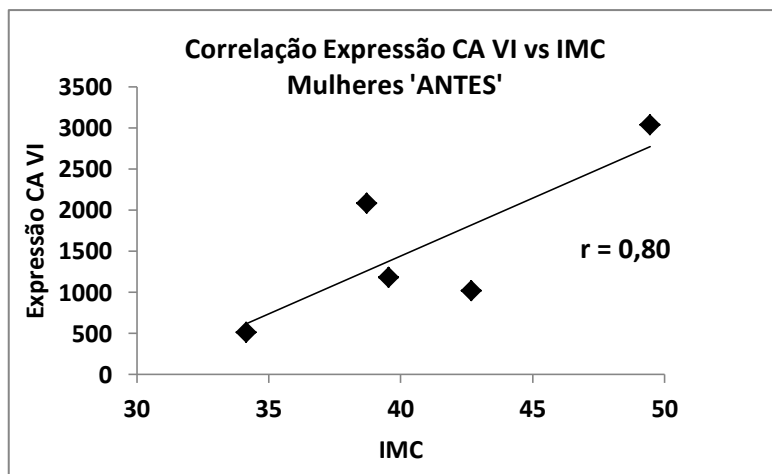


Figura 16. Correlação entre expressão da anidrase carbônica VI e o IMC, considerando mulheres numa situação anterior à perda de peso.

Resultados semelhantes foram já observados em estudos realizados no nosso laboratório (Lamy E., 2013), com outra população de obesos. Também nesse caso se observou uma correlação positiva, moderada a forte ($r=0,64$) entre IMC e expressão de CAVI.

Tendo em conta estudos em que é feita uma associação entre a proteína CA VI e a sensibilidade ao gosto amargo (Caló *et al.*, 2011), a tendência para uma maior expressão de CA VI, observada em mulheres com IMCs mais elevados, poderá indicar que para IMCs mais elevados a sensibilidade para o gosto amargo é maior. Se assim for, pode supor-se que essa maior sensibilidade limite o consumo de alimentos amargos (normalmente associados a alimentos menos calóricos como os vegetais), favorecendo o consumo de alimentos mais calóricos.

Para além destes, não encontramos na bibliografia outros estudos que relacionem estes dois parâmetros.

Numa situação de perda de peso, induzida por dieta e exercício, como a usada no presente estudo, não se observa correlação entre o peso perdido e a expressão de CA VI, para mulheres. Estes resultados são diferentes dos observados numa situação de perda de peso induzida por cirurgia bariátrica (Lamy E., 2013), sugerindo que o tipo de processo de perda de peso pode ter relevância nas alterações salivares. Isto poderá ter a ver com o facto dos diferentes tipos de perda de peso induzirem diferentes alterações metabólicas (de Roux *et al.*, 2006; Adeniyi *et al.*, 2013)

No caso dos homens esta relação entre o IMC e expressão de CAVI não se observa.

Contrariamente ao que acontece às mulheres, para os homens, há uma tendência para uma correlação forte ($r=0,85$; $P=0,066$) entre a expressão e a perda de peso (Figura 17). Aqui há uma tendência para a expressão de CAVI ser superior nos homens que perdem mais peso. Apesar de não se encontrar na bibliografia estudos que ajudem a compreender o porquê desta diferença entre géneros, é possível que a composição da saliva de ambos varie de forma diferente, facto esse que merece ser explorado em estudos futuros.

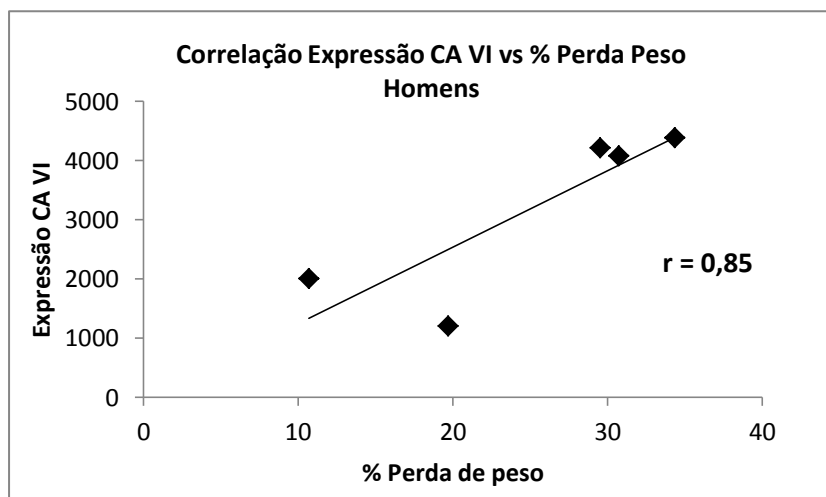


Figura 17. Correlação entre a expressão da anidrase carbónica VI e a percentagem de perda de peso considerando homens.

Atividade enzimática da anidrase carbónica

A. Otimização

Abordagem A

As condições de ensaio propostas para microplaca, (comprimento de onda, temperatura, tempo de progressão da reação) mostraram que a progressão da reação se mantém linear pelo menos até aos 60 minutos, (Figura 18A). Assim sendo é possível quantificar a velocidade inicial de cada reação, calculando o declive de cada curva de progressão ao longo deste período de tempo e para as condições em análise. É de notar que em determinados ensaios, nos primeiros 5-10 minutos a reação nem sempre era linear nos primeiros instantes, que pode dever-se a má homogeneização. Nestes casos ajustaram-se os intervalos de análise de forma a escolher um intervalo de tempo em que a linearidade da curva de progressão fosse

garantida (exemplo: declive calculado para a curva (Figura 18B) entre 10 e 60 minutos).

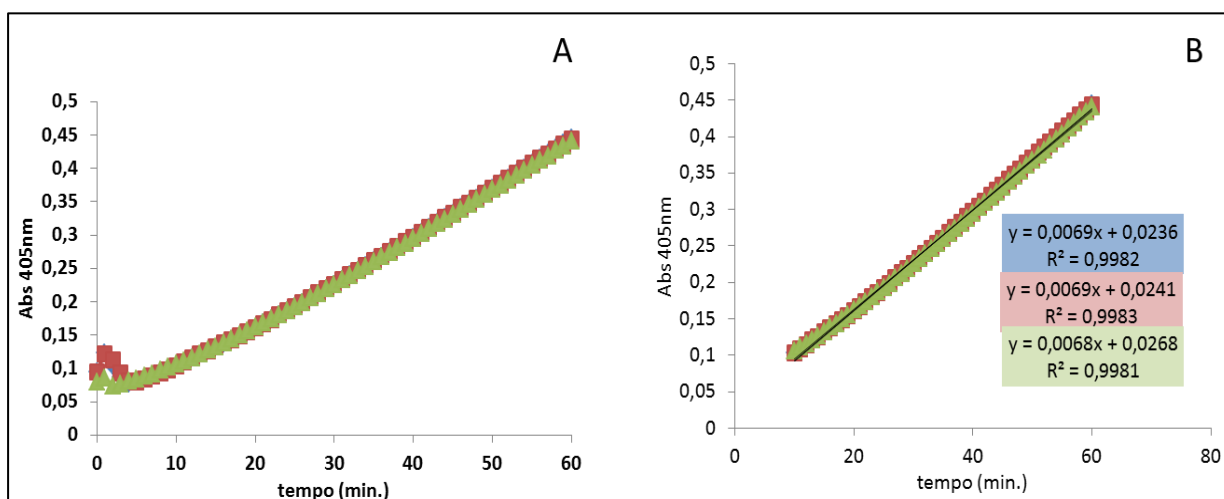


Figura 18. Curva de progressão de três réplicas duma amostra de saliva de indivíduo normoponderal, mostrando a linearidade do ensaio. A - curva de progressão ao longo de 60 minutos; B - Curva de progressão ajustada para zona linear.

I. Estudo da influência da concentração de proteína

Interessava-nos conhecer qual a gama de concentrações de proteína nas amostras para qual existe uma resposta de atividade enzimática diretamente proporcional. Tal conhecimento não só nos torna o método mais robusto como também nos permite ajustá-lo de forma a utilizar o menor volume de amostra possível. Por aplicação direta das proporções sugeridas por Verpoort *et al.* (1967), executou-se um ensaio com as condições descritas na abordagem A. Uma vez que não dispúnhamos de anidrase carbónica VI purificada e porque a atividade específica de cada amostra pode variar, optou-se por avaliar para 3 amostras de saliva de indivíduos normoponderais, escolhidas aleatoriamente, todas elas, sujeitas às mesmas diluições (1x, 4/3x, 2x, 5x e 10x diluída), Figura 19.

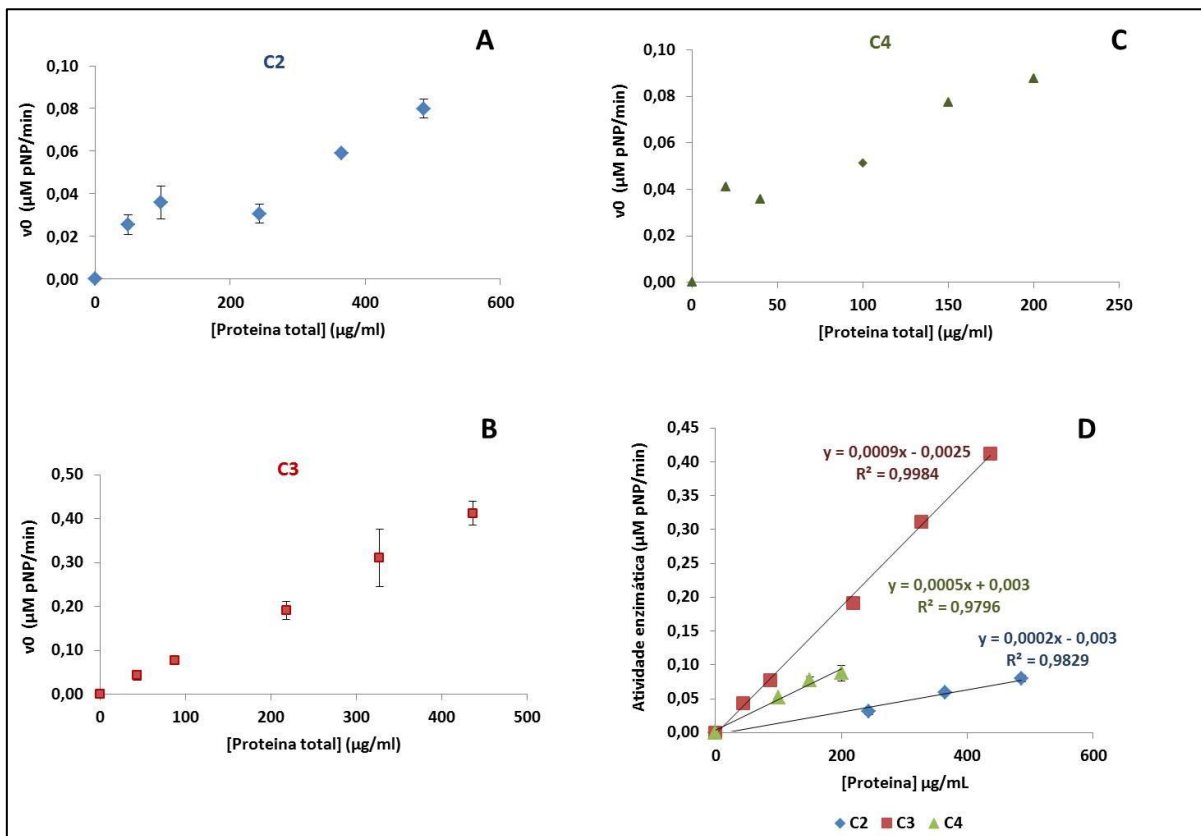


Figura 19. Representação de atividade enzimática da CA em três amostras de saliva de indivíduos normoponderais em função da concentração proteica. A, B e C – Gráficos representativos da atividade da CA em função da concentração proteica para todas as concentrações de substrato em estudo, para cada amostra individual C2, C3 e C4, respetivamente; D – Gráfico que evidencia as zonas lineares para as três amostras em estudo. Valores de atividade médios de 3 réplicas para cada diluição em estudo.

A amostra C2 apresentou linearidade entre a atividade enzimática e a concentração de proteína entre os 250 e os 500µg/ml, a amostra C3 apresentou linearidade entre os 0 e os 500 µg/ml e a amostra C4 entre os 100 e os 200µg/ml. Em todas as amostras foi possível definir linearidade para amostras diluídas 1x, 4/3x e 2x diluída. Desta forma considerou-se que para todas as determinações da atividade enzimática em amostras de saliva poder-se-iam aplicar diluições nessa gama.

II. Estudo da concentração de substrato

O efeito da concentração do substrato é igualmente um fator a ter em conta para obter um ensaio de determinação da atividade enzimática fiável, sendo da máxima relevância certificarmos-nos de que se o substrato não está a ser limitante no ensaio. Realizaram-se então alguns ensaios com diferentes concentrações de substrato. Contudo, observámos que a degradação não enzimática

do substrato (monitorizada na leitura de “brancos”) era muito elevada, dificultando particularmente o cálculo da atividade enzimática com concentrações reduzidas de substrato (Figura 20). Assim, não foi possível utilizar esta abordagem experimental para o cálculo dos parâmetros cinéticos.

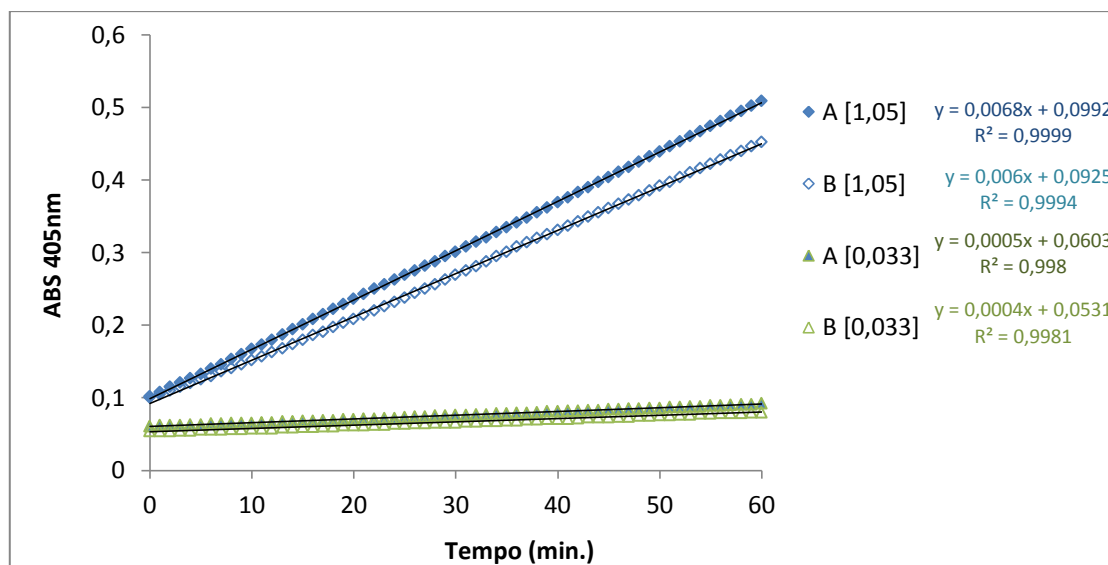


Figura 20. Curvas de progressão de reação para comparação das velocidades iniciais de reação na presença ou ausência de enzima. Estão representadas curvas de progressão de reação obtidas na presença de uma mesma amostra de saliva (pontos a cheio) na presença de duas concentrações de 4-NPA (1,05mM nas amostras e branco representadas a verde; 0,033mM nas amostras e branco a azul). Os brancos respetivos (pontos vazios), são obtidos na ausência de saliva.

Antes de iniciar modificações no método, procurámos descartar a possibilidade de serem contaminações bacterianas a causar essa atividade residual elevada. Para isso, esterilizámos todas as soluções usadas nos diversos ensaios e comparámos os resultados com ensaios realizados com material não esterilizado, não se observando quaisquer alterações (Figura 21).

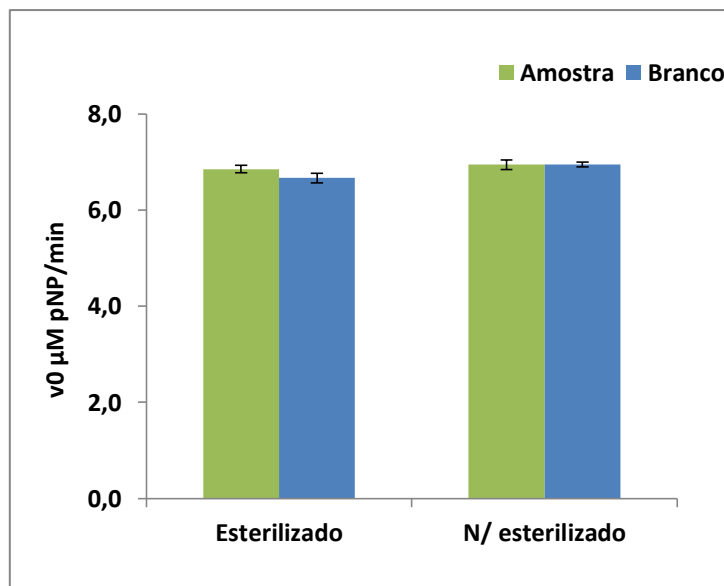


Figura 21. Contribuição da atividade do branco e amostra para ensaio realizado em condições estéreis e não estéreis. Representadas médias \pm DP para 5 replicados.

Procurámos então desenhar uma outra abordagem experimental, designada por B, cujo objetivo foi aumentar a concentração de enzima, a fim de aumentar a diferença entre as atividades das amostras e os seus respetivos brancos.

Abordagem B

Aplicaram-se todas as condições descritas na abordagem B em Materiais & Métodos.

A curva de progressão da reação mostrou ter um perfil igualmente linear ao longo dos 60 minutos estudados (Figura 22). Assim o cálculo das velocidades iniciais foi realizado calculando o declive da curva de progressão entre 0 e 60 minutos.

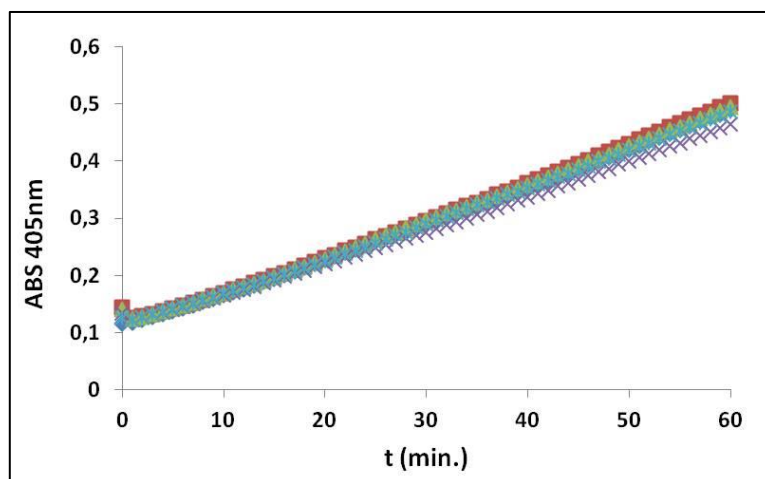


Figura 22. Curva de progressão para a amostra C10 de saliva de indivíduos normoponderais, ensaio com 5 réplicas.

Procurou-se também saber se, com esta nova abordagem, o contributo da degradação não enzimática do substrato seria menor, comparativamente ao da degradação enzimática, de forma a permitir uma adequada determinação da atividade enzimática da CA (Figura 23).

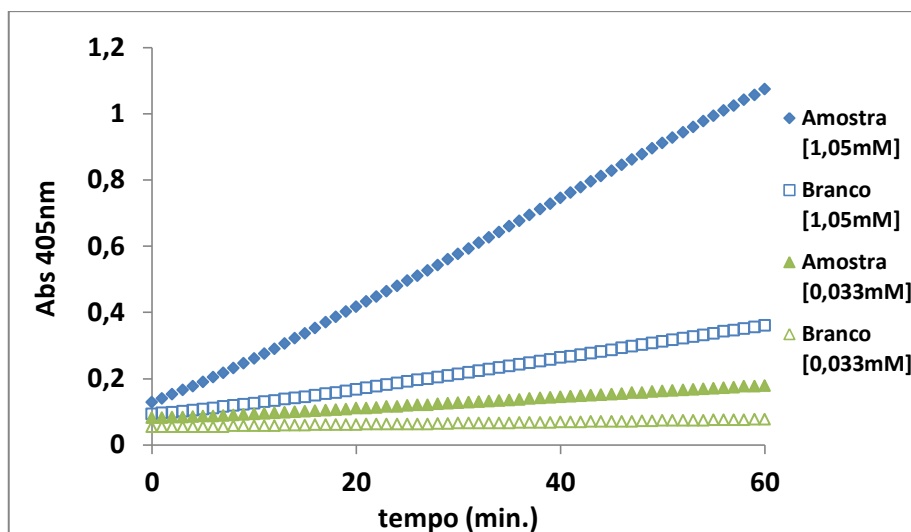


Figura 23. Curvas de progressão de reação para comparação das velocidades iniciais de reação na presença ou ausência de enzima. Estão representadas curvas de progressão de reação obtidas na presença de uma mesma amostra de saliva (pontos a cheio) na presença de duas concentrações de 4-NPA (1,05mM nas amostras e branco representadas a azul; 0,033mM nas amostras e branco a verde). Os brancos respetivos (pontos vazios) são obtidos na ausência de saliva.

Verificou-se que a contribuição da atividade do branco (degradação não enzimática do substrato) é bastante inferior à contribuição da amostra na abordagem B comparativamente à abordagem A (Figura 24).

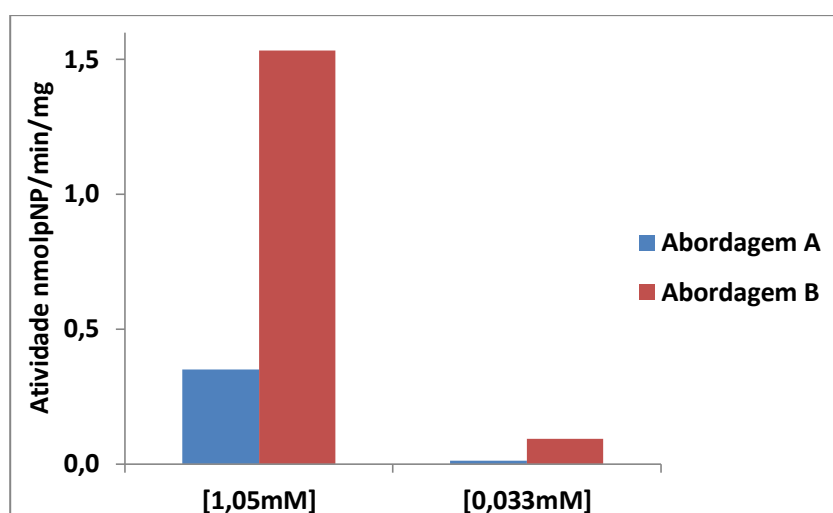


Figura 24. Atividade enzimática para uma mesma amostra de saliva doseada nas duas abordagens em estudo (A e B), para duas concentrações de 4-NPA diferentes, respetivamente 1,05mM e 0,033mM.

I. Estudo da concentração de proteína

Procurámos também nesta abordagem relacionar a concentração de proteína das amostras com a atividade enzimática, tendo sido avaliadas duas amostras de saliva de indivíduos normoponderais (C7 e C10).

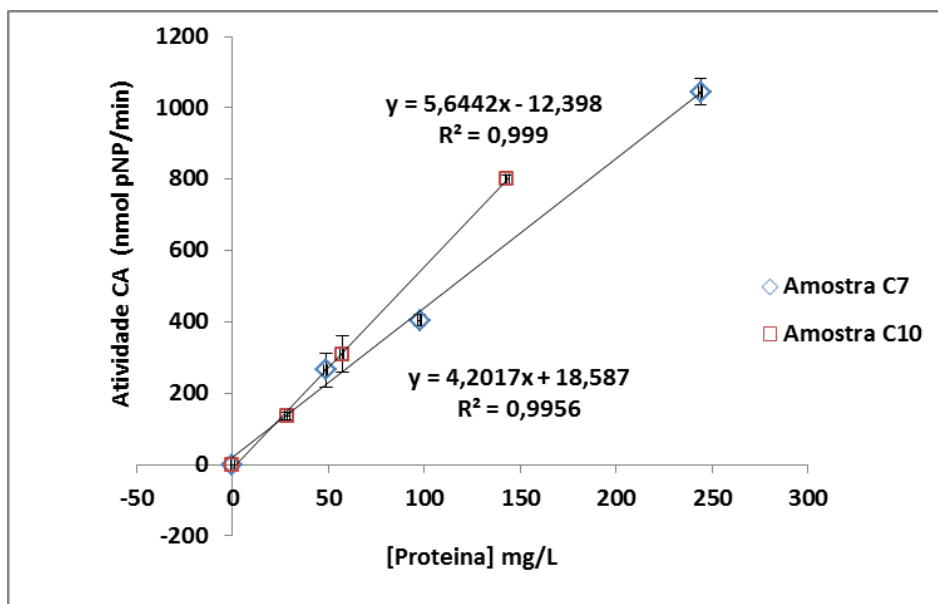


Figura 25. Representação da atividade da anidrase carbônica em função da concentração de proteína. Esta avaliação foi feita para duas amostras de saliva de indivíduos normoponderais. Valores de atividade médios \pm DP.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 25), verifica-se que há linearidade entre a atividade enzimática e a concentração de proteína das amostras entre os 50 e os 150 μ g/ml, sendo que todos os ensaios subsequentes foram executados com aplicações de amostras de saliva com concentração de proteínas neste intervalo.

II. Estudo da concentração de substrato

A fim de se estudar a influência da concentração do substrato 4-NPA na reação enzimática em estudo, realizaram-se ensaios de atividade enzimática em que se fez variar a concentração de 4-NPA entre 1,05mM e 0,008mM. A figura 26 representa a atividade enzimática em CA em função da concentração do substrato 4NPA para uma amostra de saliva de um individuo normoponderal, representação também conhecida como curva de saturação por substrato ou curva de Michaelis-Menten.

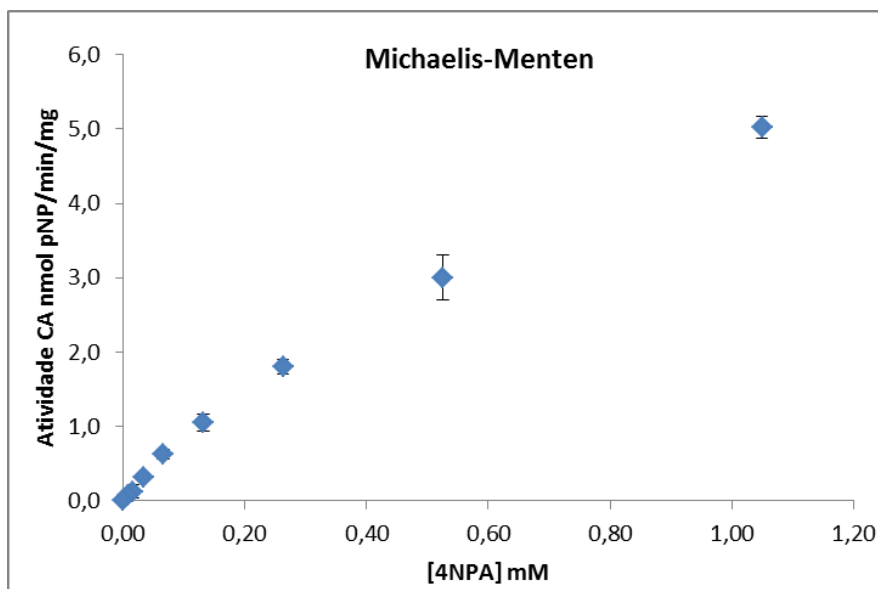


Figura 26. Atividade enzimática CA em função da concentração do substrato 4NPA. Nesta avaliação foi utilizada uma amostra de saliva de um indivíduo normoponderal (amostra C10). Estão representadas médias \pm DP.

De acordo com a curva de saturação de substrato (Figura 26), a anidrase carbónica de saliva parece seguir, para o substrato p-NPA, uma cinética do tipo michaeliano, pois parece ajustar à função matemática do ramo de hipérbole retangular, neste caso conhecida por equação de Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]}$$

Os modelos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, de Hanes-Woolf e o método direto ou de Eisenthal e Cornish-Bowden permitem por linearização da equação anterior (Tabela 9), obter parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da anidrase carbónica relativamente ao substrato 4-NPA.

Tabela 9. Modelos Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf e Método direto ou de Eisenthal e Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1995).

Modelo	Equação
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$
Eadie-Hofstee	$V = -K_M \times \frac{V}{[S]_0} + V_{m\acute{a}x}$
Hanes-Woolf	$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} [S] + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}}$
Método direto ou Eisenthal e Cornish-Bowden	$V_{m\acute{a}x} = V_0 + \frac{V_0}{[S]} + K_M$

As representações gráficas relativas à aplicação de cada um destes modelos estão apresentadas na Figura 27. Os parâmetros cinéticos constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima para cada linearização, estão apresentados na Tabela 10.

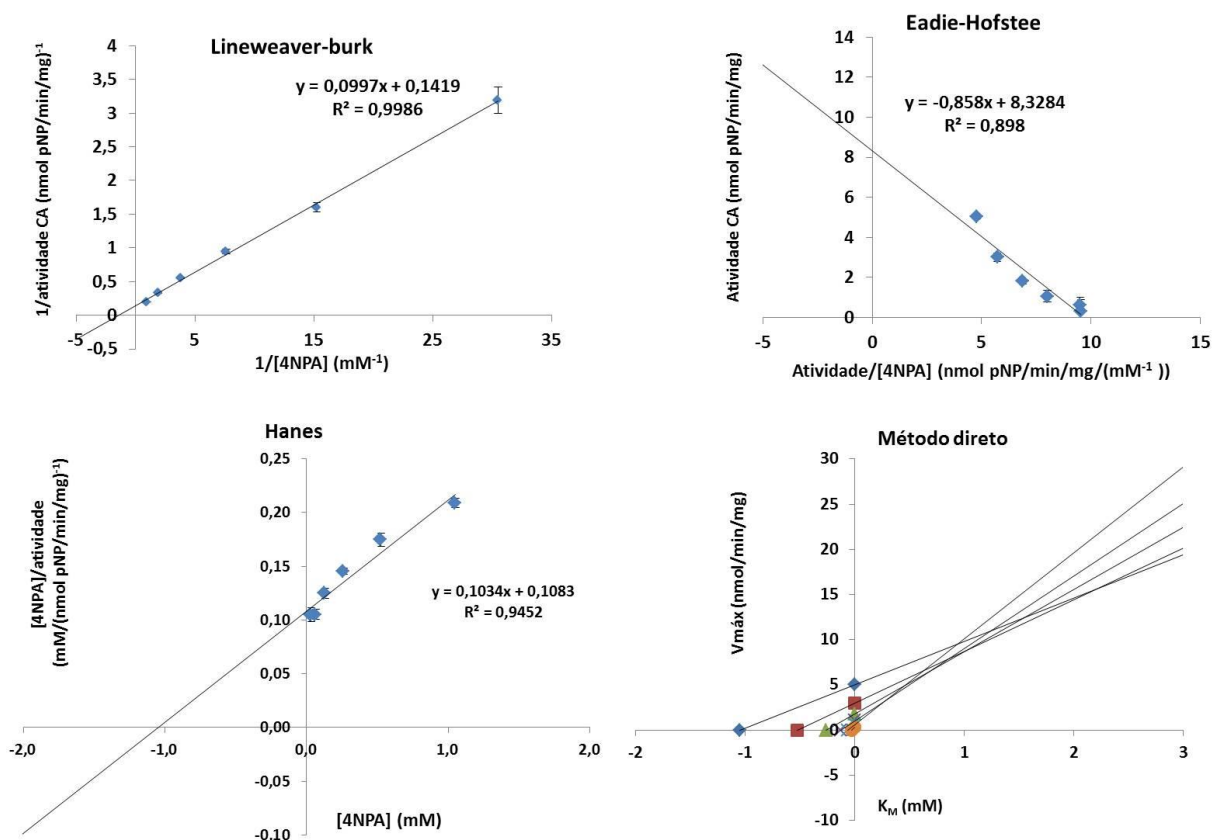


Figura 27. Representações gráficas da aplicação dos modelos de linearização de Lineweaver-burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf e ainda do método direto ou de Eisenthal e Cornish-Bowden.

Tabela 10. Velocidade máxima e constante de Michaelis determinadas a partir de cada linearização em estudo.

Linearização	$V_{\text{máx}}$ (nmol/min/mg)	K_M (mM)
Lineweaver-burk	7,05	0,703
Eadie-Hofstee	8,33	0,857
Hanes-Woolf	9,67	1,047
Método direto	6,15	0,851
Média dos métodos	$7,8 \pm 1,5$	$0,865 \pm 0,141$

Os dados obtidos sugerem que a anidrase carbónica de saliva segue uma cinética Michaeliana com K_M de 0,87mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 7,8nmol/min/mg. A concentração de substrato proposta de 1,05mM está perto da zona de saturação (corresponde a $1,2K_M$). Seria teoricamente mais aconselhável utilizar uma concentração de substrato superior (Cornish-Bowden, 1995). Contudo, a solubilização do substrato é muito difícil e, tendo sido verificado que se obtém com a concentração de substrato 1,05mM um período linear longo na curva de progressão de reação, considerámos esta concentração como sendo apropriada para a determinação das atividades enzimáticas das amostras.

De acordo com as referencias consultadas não se encontraram descritos parâmetros cinéticos, para o substrato usado, (4-NPA) para a anidrase carbónica, o isoenzima da anidrase carbónica mais abundante em saliva (Öztürk *et al.*, 2011). A tabela 11 mostra valores de K_M obtidos com substratos diferentes para vários isoenzimas de anidrase carbónica.

Tabela 11. Constantes de Michaelis determinadas para diferentes isoenzimas, utilizando substratos diferentes.

Isoenzima de CA	Substrato	K_M (mM)	Referência
hCA I	p-nitrofenilacetato	3,03	Innocenti <i>et al.</i> , (2008)
	p-nitrofenilacetato	5,6	Verpoort <i>et al.</i> , (1967)
	Hidratação do CO ₂	4,0	Nishimori <i>et al.</i> , (2007); Supuran <i>et al.</i> , 2008
hCA II	p-nitrofenilacetato	30,5	Innocenti <i>et al.</i> , (2008)
	p-nitrofenilacetato	22,1	Verpoort <i>et al.</i> , (1967)
	Hidratação do CO ₂	9,3	Nishimori <i>et al.</i> , (2007); Supuran, <i>et al.</i> , 2008
hCA VI	Hidratação do CO ₂	6,9	Nishimori <i>et al.</i> , (2007)

A análise dos valores de K_M reportados na tabela acima permite-nos observar que no caso da hCA I, a afinidade para o CO₂ é da mesma ordem de grandeza que a registada para o p-nitrofenilacetato. Não se verifica a mesma situação na hCA II, em que a afinidade para o CO₂ é muito superior que a registada para o p-nitrofenilacetato. No caso da nossa amostra, a atividade enzimática que estudámos deve ser maioritariamente da responsabilidade da hCA VI (Öztürk *et al.*, 2011), sendo que o K_M para o p-nitrofenilacetato que determinámos é da ordem de grandeza do descrito para a hidratação para o CO₂. A afinidade para o 4NPA é ligeiramente inferior à relatada para hCA I, mas muito superior à descrita para hCA II.

III. Estudo do efeito do pH

A fim de estudar o efeito do pH no ensaio proposto, testou-se uma bateria de diferentes pH para o tampão em estudo, Tris-HCl entre 7.0 e os 7.6. Abaixo encontra-se o gráfico resultante da influência do pH na atividade da anidrase carbónica (Figura 28).

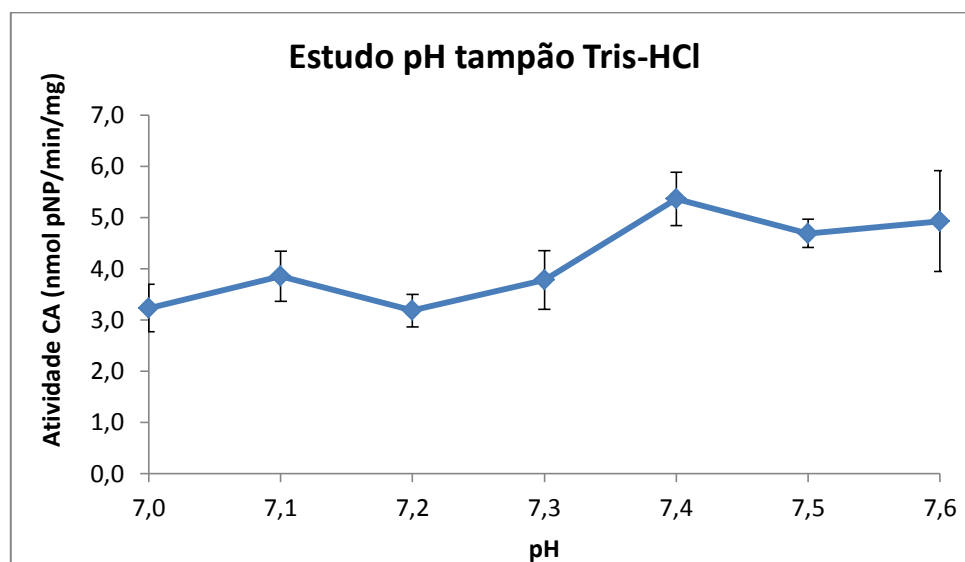


Figura 28. Influência do pH do Tampão Tris-HCL para a atividade da anidrase carbónica.

Verifica-se que a atividade em CA em função do pH não apresenta uma grande variação. O valor máximo regista-se a pH 7.4, sendo este o valor de pH utilizado pelos autores Koz *et al.*, (2012) nos seus estudos.

B. Aplicação do método proposto às amostras em estudo

De acordo com todos os dados obtidos nos variados ensaios realizados para otimização do método de determinação da atividade da CA na saliva humana, considerou-se que para determinações futuras se utiliza o descrito na abordagem B, tendo em consideração o volume de amostra aplicado corresponder a uma concentração em proteína entre 50 e 150µg/ml na mistura reacional final, e nunca inferior a 20µL.

As atividades enzimáticas da CA de amostras de saliva de 5 indivíduos nas duas situações em estudo (antes e depois) da perda de peso e a 5 indivíduos controlo, foram portanto determinadas de acordo com todas as considerações acima referidas, e encontram-se apresentadas na Figura 29.

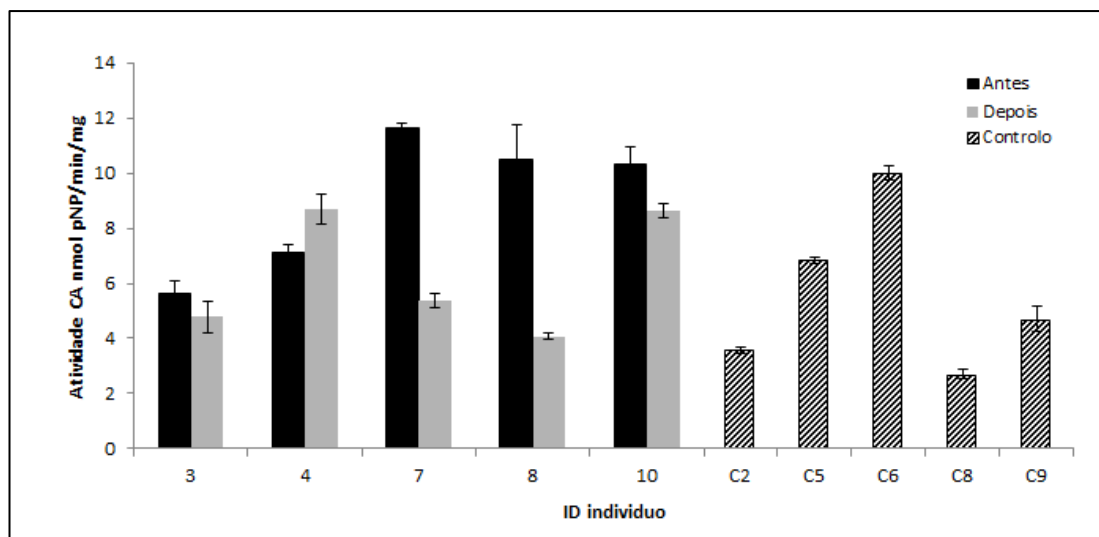


Figura 29. Atividade enzimática da CA em amostras de saliva de 5 indivíduos em programa de perda de peso (Antes e Depois), e em 5 indivíduos controlo. Atividades enzimáticas Médias \pm EPM (ensaio em triplicado).

Tendo em conta os resultados obtidos para as atividades enzimáticas em CA nas amostras de saliva, no que diz respeito aos grupos em estudo ($9,05 \pm 1,14$; $6,31 \pm 0,98$; $5,69 \pm 1,34$ nmol/min/mg, respetivamente para indivíduos antes da perda de peso, depois da perda de peso e controlo) (Figura 30) não se observam diferenças significativas entre os diferentes grupos em estudo.

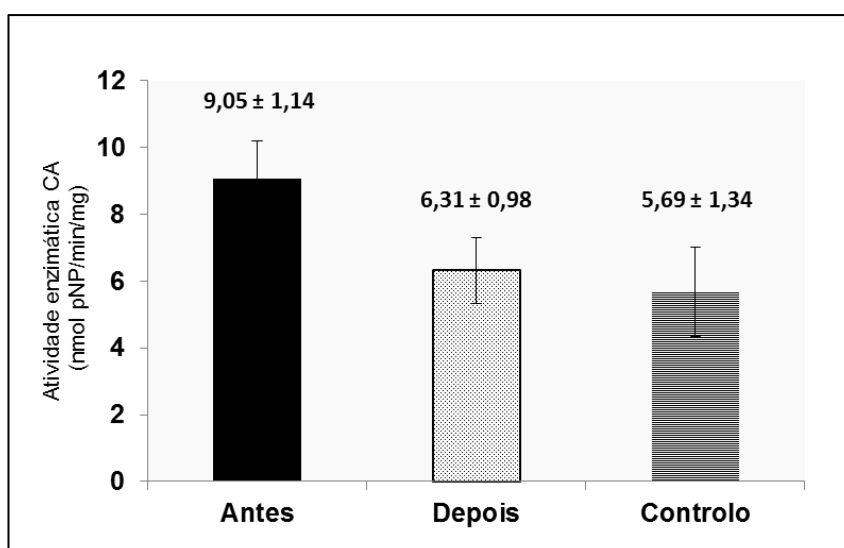


Figura 30. Atividade enzimática da CA média para as diferentes situações em estudo. Média das atividades \pm EPM.

Se analisarmos a atividade enzimática CA antes e depois de programa de perda de peso para cada indivíduo (Figura 31), podemos observar que há um decréscimo acentuado em dois dos indivíduos (53,8% e 61,3% de diminuição da atividade enzimática, respetivamente para o indivíduo 7 e 8), um decréscimo ligeiro noutros dois

(14,9% e 16,6%, respetivamente para o individuo 3 e 10) e um aumento no individuo 4 de 21,97%. O facto de termos uma amostra pequena não nos permite salientar uma tendência clara, pelo que seria desejável aumentar a amostragem para esta análise.

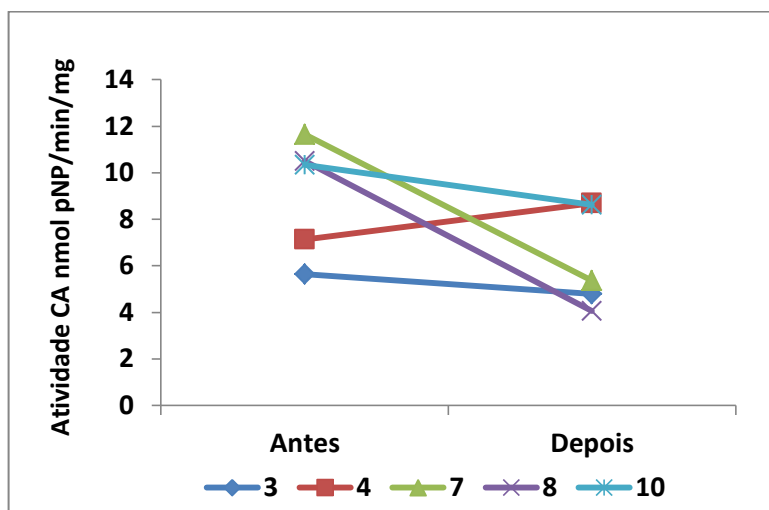


Figura 31. Atividade enzimática em CA para os indivíduos em programa de perda de peso e restrição calórica, situação antes e depois.

Se analisarmos a correlação entre a atividade enzimática e o IMC dos indivíduos, observamos que estes parâmetros não estão correlacionados (Figura 32, Anexo IV).

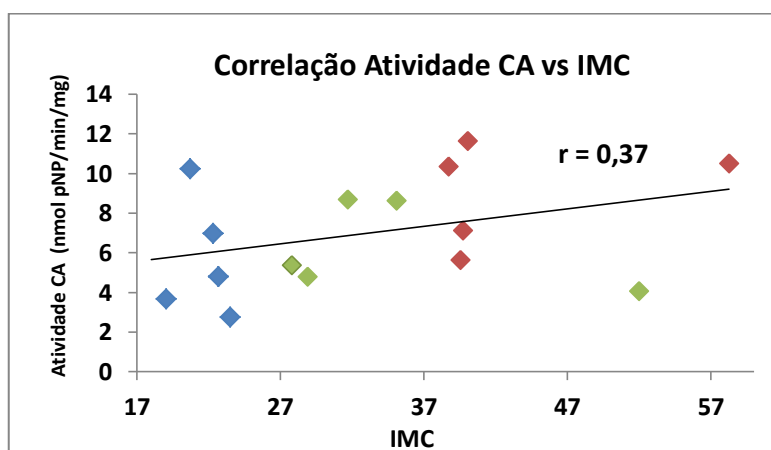


Figura 32. Correlação entre a atividade CA e o IMC. Marcador vermelho: Antes; Marcador verde: Depois; Marcador azul: Controlo.

Correlacionando a atividade da anidrase carbónica e a expressão CA VI, observa-se uma tendência para uma correlação negativa moderada ($r=-0,48$; $P=0,069$) (Figura 33). No entanto há que salientar a necessidade de um aumento do número de indivíduos em estudo, de forma a verificar se esta correlação moderada realmente significa uma tendência para uma diminuição da atividade enzimática da CA VI associada a um aumento de expressão.

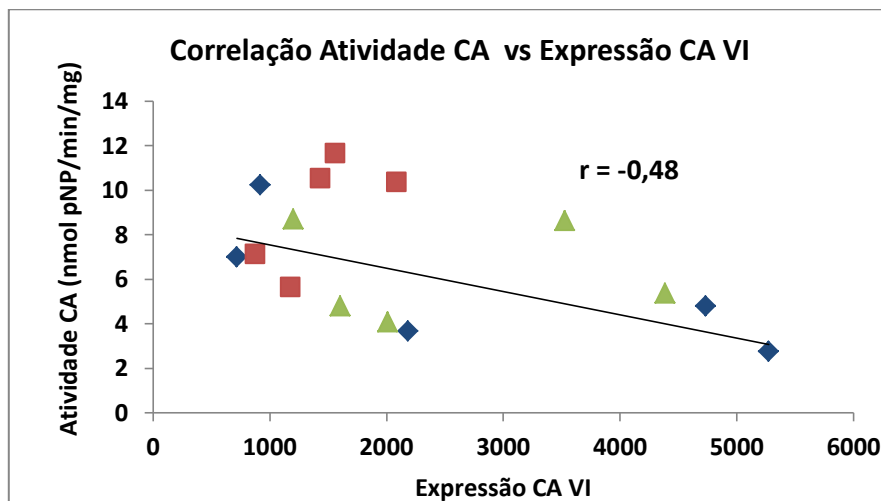


Figura 33. Correlação atividade enzimática de CA com a expressão de CA VI na saliva para todos os indivíduos em estudo. Marcador vermelho: Antes; Marcador verde: Depois; Marcador azul: Controlo.

O facto de não observarmos resultados para a expressão proteica e atividade enzimática no mesmo sentido pode dever-se a diversos fatores. Por um lado, podem existir contribuições de outras isoenzimas para a atividade enzimática, para além da isoenzima VI, já que apesar do maior contributo relatado na cavidade oral ser o da anidrase carbónica VI, o contributo em menor extensão de CA II e CA I também tem sido reportado (Rao *et al.*, 2008). Por outro lado, possíveis alterações do meio salivar ou de modificações pós traducionais podem igualmente influenciar a atividade da anidrase carbónica VI. Se tivermos em conta resultados de análise de *spots* em géis de saliva humana, são identificados como anidrase carbónica VI péptidos com massas moleculares e pontos isoelétricos variáveis, e que podem corresponder a modificações pós traducionais como fosforilações, acetilações, entre outras (Vitorino *et al.*, 2012). Desconhece-se na bibliografia de que forma estas alterações se repercutem na atividade enzimática.

Como o anticorpo utilizado para deteção da anidrase carbónica VI reconhece apenas uma pequena zona peptídica, é de prever que reconheça todas as isoformas da anidrase carbónica VI. Os nossos resultados de atividade enzimática, em que não se observam diferenças com a perda de peso, sugerem, que apesar do aumento global de expressão, nem todas as formas da anidrase carbónica VI expressas estejam ativas. Assim, e tal como já foi referido, seria muito relevante a identificação dos *spots* 38, 40, 58, 59 e 152 dos géis de eletroforese bidimensional, pois são aqueles que, por homologia com outros géis de saliva com *spots* já identificados (Vitorino *et al.*, 2012; Jessie *et al.*, 2010), e também pela análise dos seus pesos

moleculares e pontos isoelétricos, parecem poder ser atribuídos à anidrase carbónica VI. A relevância é ainda maior se tivermos em conta o facto de todos estes spots apresentarem alterações de expressão relacionáveis com a perda de peso ou com a condição de obesidade.

Conclusões

Com o presente trabalho observou-se que a composição proteica da saliva difere entre indivíduos obesos e normoponderais e que essas alterações diferem de acordo com a perda de peso, sendo a anidrase carbónica uma das proteínas que tem uma expressão alterada nessa situação. Podem ser salientados alguns aspetos analisados neste trabalho:

1. Todos os indivíduos em programa de perda de peso decorrente de exercício físico e restrição calórica conseguiram baixar o grau de severidade de obesidade, alguns dos quais alcançaram IMC muito próximos do considerado para o peso normal. Observaram-se perdas de peso bastante elevadas, com alguns dos indivíduos a perderem cerca de 30% do seu peso inicial.
2. Apesar de não se observarem alterações na concentração proteica salivar, o perfil salivar, analisado por eletroforese bi-dimensional revela resultados bastante interessantes, com diferentes *spots* apresentando-se diferencialmente expressos, podendo apontar-se 11 deles como possíveis “biomarcadores” de obesidade e/ou perda de peso por exercício físico intenso e dieta. A futura identificação das proteínas presentes nestes *spots* será de interesse para uma melhor compreensão desta condição e dos mecanismos envolvidos no seu tratamento.
3. De uma forma geral, no que diz respeito à expressão da anidrase carbónica VI, analisada por western blot, observou-se uma tendência para esta aumentar com perda de peso. Este aumento ocorre tanto em homens como em mulheres. No entanto, é importante realçar que os dois géneros apresentam algumas diferenças relativamente a este parâmetro. Nas mulheres, há uma forte correlação entre a expressão de CAVI e o IMC, numa situação anterior à perda de peso, a qual deixa de existir após perda de peso. Já no caso dos homens, parece haver uma tendência para serem aqueles que apresentam maiores perdas de peso a ter níveis de CA VI mais elevados. Estas diferenças poderão ser importantes se tivermos em conta o potencial da anidrase carbónica VI a nível da sensibilidade gustativa e da saúde oral. Estes resultados mostram a importância de avaliar homens e mulheres em separado, num processo de perda de peso. Por exemplo, a confirmar-se a influência dos

níveis de anidrase carbónica VI para a perceção dos alimentos, diferenças entre homens e mulheres poderão condicionar a eficácia de programas nutricionais para perda de peso.

4. Não se observaram diferenças significativas na atividade enzimática da anidrase carbónica nas amostras de saliva em estudo, entre os diferentes grupos. Estes resultados sugerem que a atividade enzimática avaliada possa depender do tipo de isoformas da anidrase carbónica VI expressas e/ou do tipo de isoenzimas de anidrase carbónica presentes na saliva. Estudos futuros são necessários para conhecer melhor a regulação da expressão deste enzima, em particular na fase pós-traducional, bem como as características do meio oral numa situação de obesidade que possam modular a atividade deste enzima.

Desta forma, este trabalho contribui para ampliar conhecimento acerca das alterações salivares presentes na obesidade e decorrentes de perda de peso por exercício físico e restrição calórica.

Perspetivas Futuras

Face aos resultados obtidos neste trabalho, será muito relevante fazer a identificação de cada *spot* relatado como diferencialmente expresso, a fim de identificar quais os péptidos/proteínas potenciais biomarcadores de obesidade ou perda de peso. Isso abrirá caminho a uma nova fase de estudos em que se procurará confirmar essas tendências, com um número de indivíduos a analisar necessariamente superior. Para isso poderão ser utilizadas estratégias experimentais com estudos dirigidos individualmente a cada um dos péptidos/proteínas identificados neste trabalho como potenciais biomarcadores. Essas estratégias podem incluir técnicas de proteómica e genómica.

A imunomarcção de géis bi-dimensionais com o anticorpo utilizado neste trabalho poderá ser uma estratégia a utilizar para relacionar os resultados obtidos por proteómica com os obtidos por western-blot (não foi possível fazê-lo no âmbito deste trabalho pois o volume de amostras recolhidas não o permitiu). Para além disso, essa imunomarcção também poderá elucidar quais as isoformas desta proteína que estão diferencialmente expressas. Também a identificações dos *spots* por MS-MS será muito relevante, pois poderá clarificar a possibilidade de a CAVI sofrer modificações pós traducionais com possíveis implicações na atividade enzimática. A compreensão do papel fisiológico dessas alterações é também um desafio para o futuro.

Seria ainda muito interessante poder relacionar as alterações decorrentes da perda de peso com eventuais alterações ao nível da sensibilidade gustativa. Uma vez que a CA, cuja expressão registámos aumentada com a perda de peso, é uma das proteínas que tem sido relacionada com a perceção do gosto amargo, seria importante ter informação sobre eventuais alterações na sensibilidade gustativa em indivíduos sujeitos a um regime de perda de peso, em particular para o gosto amargo.

Referências Bibliográficas

1. Åberga G, Edmanb G, Rössner S. 2008. Perceived hunger, palatability, and adherence: A comparison of high- and low-fat diets. *Obesity Research & Clinical Practice*. Volume 2. Issue 2. Pages 101–110.
2. Adeniyi A, Uloko E, Ogwumike O, Sanya O, Fasanmade A. 2013. Time Course of Improvement of Metabolic Parameters after a 12 Week Physical Exercise Programme in Patients with Type 2 Diabetes: The Influence of Gender in a Nigerian Population. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International*. Volume 2013. Article ID 310574. 9 pages.
3. Ahmadi N, Eshaghian S, Huizenga R, Sosnin K, Ebrahimi R, Siegel R. 2011. Brief Observation: Effects of Intense Exercise and Moderate Caloric Restriction on Cardiovascular Risk Factors and Inflammation, *The American Journal of Medicine*, Vol 124, No 10.
4. Aps J, Martens L. 2005. The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva; *Forensic Science International* 150: 119–131.
5. Arabacı T, Çiçek Y, Beydemir S, Çanakç C, Çanakç V. 2013. Are increased salivary carbonic anhydrase VI levels related to the amount of supragingival dental calculus formation and clinical periodontal scores?. *Journal of Dental Sciences* 1-5.
6. Boron W. 2005. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. Elsevier/Saunders. Page 638.
7. Calò C, Padiglia A, Zonza A, Corrias L, Contu P, Teppere B, Barbarossa I. 2011. Polymorphisms in TAS2R38 and the taste bud trophic factor, gustin gene co-operate in modulating PROP taste phenotype. *Physiology & Behavior*. Volume 104, Issue 5, Pages 1065–1071
8. Cameron J, Goldfield G, Cyr Marie-Josée, Doucet E. 2008. The effects of prolonged caloric restriction leading to weight-loss on food headonics and reinforcement.. *Physiology & Behavior*. Volume 94. Issue 3. Pages 474–480.
9. Carpenter G. 2013. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4:267–76.
10. Catalán M, Nakamoto T, Melvin J. 2009. The salivary gland fluid secretion mechanism. *J Med Invest*. 56 Suppl: 192-196.
11. Cornish-Bowden A. 1995. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 2nd. Edition. Portland Press.

12. Culp D, Robinson B, Parkkila S, Pan P, Cash M, Truong H, Hussey T, Gullett S. 2011. Oral colonization by *Streptococcus mutans* and caries development is reduced upon deletion of carbonic anhydrase VI expression in saliva. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812: 1567–1576.
13. Dasso M, Pagotto R, Pignataro OP, Diez RA, Sales ME. 2011. Effect of bitter compounds on amylase secretion in murine submandibular glands: Signaling pathway mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1810:1212-1219.
14. Demirdağ R, Yerlikaya E, Küfrevioğlu Ö, Gündoğdu C. 2012. Purification of CA isoenzymes from human cancerous colon tissue and inhibitory effects of some analgesics on enzyme activity. *Hacettepe J. Biol. & Chem.* 40 (2) 127-132.
15. Direção-Geral da Saúde. 2005. Divisão de Doenças Genéticas, Crónicas e Geriátricas Programa Nacional de Combate à Obesidade. Lisboa, Portugal DGS. 24 p.
16. Dirks A, Leeuwenburgh C. 2006. Review: Caloric restriction in humans: Potential pitfalls and health concerns. *Mechanisms of Ageing and Development*. 127:1:1–7.
17. do Carmo I, Dos Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, Reis L, Myatt J, Galvão-Teles A. 2008. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev.* 9:11-19.
18. Dsamou M, Palicki O, Septier C, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chagnon MC, Morzel M. 2012. Salivary protein profiles and sensitivity to the bitter taste of caffeine. *Chem Senses*. 37:87-95.
19. Duan Y, Liu J. 2012. Review - Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology* 48:569-577
20. Engelen L, van den Keybus PA, de Wijk RA, Veerman EC, Amerongen AV, Bosman F, Prinz JF, van der Bilt A. 2007. The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *Arch Oral Biol*. 52:518-525.
21. Fernley R, Farthing J, Cooper J. 1995. Short Communication: Radioimmunoassay for Salivary Carbonic Anhydrase in Human Parotid Saliva. *Archs Oral Biol*. Vol 40, No.6, PP. 567 569
22. Fujikawa-Adachi K, Nishimori I, Taguchi T, Onishi S. 1999. Human mitochondrial Carbonic Anhydrase VB: cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization, and mapping to chromosome X. *The Journal of Biological Chemistry*. 274. 21228-21233.
23. Furlan L, Ferraz A, Bortolossi J. 2007. Functional genomics in the field of animal science: state-of-the-art and perspectives. *R. Bras. Zootec.*, v.36, suplemento especial, p.331-341

24. Frasseto F, Parisotto T, Peres R, Marques M, Line S, Nobre dos Santos M. 2012. Relationship among Salivary Carbonic Anhydrase VI Activity and Flow Rate, Biofilm pH and Caries in Primary Dentition. *Caries Research*. 46(3)194-200.
25. Gomes F, Anjos L, de Vasconcelos M. 2010. Anthropometry as a tool for assessing the nutritional status of adolescents. *Rev. Nutr.* vol.23 no.4 Campinas.
26. Hassan Md, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly W. 2012. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
27. Henkin RI, Lippoldt RE, Bilstad J, Edelhoach H. 1975. A Zinc Protein Isolated from Human Parotid Saliva (taste buds/metalloprotein/hypogeusia). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 72:488-492.
28. Innocenti A, Vullo D, Scozzafava A, Supuran C. 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Volume 18. Issue 5. Pages 1583-1587.
29. Jebb S. 2004. Obesity: causes and consequences. *Obesity and Dieting: women's health medicine* 1:1.
30. Jessie K, Pang W, Rahim Z, Hashim O. 2010. Proteomic Analysis of Whole Human Saliva Detects Enhanced Expression of Interleukin-1 Receptor Antagonist, Thioredoxin and Lipocalin-1 in Cigarette Smokers Compared to Non-Smokers. *Int J Mol Sci*.11. 4488-4505.
31. Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y. 2006. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. *Archives of Oral Biology* 51:117—122
32. Kivela J, Parkkila S, Parkkila A, Leinonen J, Rajaniemi H. 1999. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. *Journal of Physiology*. 520.2, pp. 315-320
33. Kivelä J, Parkkila S, Parkkila A, Rajaniemi H. 1999. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res*. 33(3):178-84.
34. Kivelä A, Kivelä J, Saarnio J, Parkkila S. 2005. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World Journal of Gastroenterology*. 11 (2):155-163.
35. Koz Ö, Ekinci D, Perrone A, Piacente S, Alankuş-Çalışkan Ö, Bedir E, Supuran C. 2012. Analysis of saponins and phenolic compounds as inhibitors of α -carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 1–6. Early Online.

36. Krieger JW, Sitren HS, Daniels MJ, Langkamp-Henken B. 2006. Effects of variation in protein and carbohydrate intake on body mass and composition during energy restriction; a meta-regression. *Am J Clin Nutr.* 83:260-74.
37. Lamy E. 2013. Avaliação das alterações do perfil proteico salivar em indivíduos com obesidade mórbida nas fases pré- e pós cirurgia bariátrica. Tese de Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar. Faculdade de Medicina. Universidade de Lisboa (a aguardar discussão).
38. Laskowski E. 2012. The Role of Exercise in the Treatment of Obesity. *The American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation.* 4: 840-844.
39. Le roux C, Aylwin S, Batterham R, Borg C, Coyle F, Prasad V, Shurey S, Ghatei M, Patel A, Bloom S. 2006. Gut Hormone Profiles Following Bariatric Surgery Favor an Anorectic State, Facilitate Weight Loss, and Improve Metabolic Parameters. *Annals of Surgery.* Volume 243. Number 1.
40. Loureiro J. 2007. IV seminário: Obesidade - Da bioquímica à clínica. *Actas Bioq.* 8: 35-44.
41. McDevitt M, Lambert L. 2011. Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members. *Biochimica et Biophysica Acta* 1814:1854–1861.
42. Mediano M, Barbosa J, Moura A, Willett W, Sichieri R. 2010. A randomized clinical trial of home-based exercise combined with a slight caloric restriction on obesity prevention among women. *Preventive Medicine* 51:247–252.
43. Mediano M, Sichieri R. 2011. Insulin resistance influences weight loss in non-obesewomen who followed a home-based exercise program and slight caloric restriction. *Diabetes Research and Clinical Practice* 92. 361-367.
44. Melanson K, Dell'Olio J, Carpenter M, Angelopoulos T. 2004. Changes in multiple health outcomes at 12 and 24 weeks resulting from 12 weeks of exercise counseling with or without dietary counseling in obese adults. *Nutrition.* Volume 20. Issue 10. Pages 849–856.
45. Meso H, Matsuo R. 2007. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J.Oral Rehabil.* 34 (10):7 11-23.
46. Nammi S, Koka S, Chinnala K, Boini K. 2004. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. *Review Nutrition Journal.*
47. Narumi S, Miyamoto E. 1974. Activation and phosphorylation of carbonic anhydrase by adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Biochimica et Biophysic Acta (BBA) – Enzymology.* Vol 350. Issue 1. 215-224.

48. Neyraud E, Palicki R, Schwartz C, Nicklaus S, Feron G. 2012. Variability of Human Saliva Composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Archives of oral biology*. 57:556-566
49. Nishimori I, Onishi S, Vullo D, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran C. 2007. Carbonic anhydrase activators: The first activation study of the human secretory isoform VI with amino acids and amines; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15: 5351–5357
50. Nogueira H, Ferrão M, Gama A, Mourão I, Marques V, Padez C. 2013. Perceptions of neighborhood environments and childhood obesity. Evidence of harmful gender inequities among Portuguese children. *Health & Place* 19:69-73
51. Nunes L, Brenzikofer R, Macedo D. 2011. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population. *Clinical Biochemistry* 44:1440-1444
52. Öztürk L, Ulucan K, Akyüz S, Furuncuoğlu H, Bayer H, Yarat A. 2012. The investigation of genetic polymorphisms in the carbonic anhydrase VI gene exon 2 and salivary parameters in type 2 diabetic patients and healthy adults. *Mol Biol Rep*. 39:5677-5682
53. Palo E, Chiappin S, Antonelli G, Gatti R. 2007. Invited critical review - Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta* 383:30-40
54. Padez C, Fernandes T, Mourão I, Moreira P, Rosado V. 2004. Prevalence of overweight and obesity in 7–9-year-old Portuguese children: Trends in body mass index from 1970–2002. *American Journal of Human Biology*. Volume 16, Issue 6, pages 670–678.
55. Padiglia A, Zonza A, Atzori E, Chillotti C, Calo C, Tepper B, Barbarossa I. 2010. Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin (carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. *Am J Clin Nutr* 10.3945.
56. Paracchini V, Pedotti P, Taioli, E. 2005. Genetics of leptin and obesity: A huge review. *American Journal of Epidemiology*. USA. 162:2:101-114.
57. Perry G, Dominy N, Claw K, Lee A, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea F, Mountain J, Misra R, Carter N, Lee C, Stone A. 2007. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet*. 39:1256-1260.
58. Pilka E, Kochan G, Oppermann U, Yue W. 2012. Crystal structure of the secretory isozyme of mammalian carbonic anhydrases CA VI: Implications for biological assembly and inhibitor development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419:485–489.

59. Pinheiro A, Freitas S, Corso A. 2004. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de nutrição*. 17:4:523-533.
60. Pannunzio E, Amancio O, de Souza Vitalle M, Souza D, Mendes F, Nicolau J. 2010. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras*. 56(1): 32-6
61. Quintas A, Freire A, Halpern M. 2008. *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. Lidel.
62. Rao P, Reddy A, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, Roberts C, Nagalla S. 2009. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. *Journal of Proteome Research*. 8:239–245.
63. Romero C, Zanesco A. 2006. The role of leptin and ghrelin on the genesis of obesity. *Rev. Nutr. Campinas*. 19(1):85-91.
64. Saeves R, Reseland J, Kvam, Sandvik, Nordgarden H. 2012. Saliva in Prader–Willi syndrome: Quantitative and qualitative characteristics. *Archives of Oral Biology*. Volume 57. Issue 10. Pages 1335–1341.
65. Santarpia L, Contaldo F, Pasanisi F. 2013. Review: Body composition changes after weight-loss interventions for overweight and obesity. *Clinical Nutrition* 32:157-161.
66. Sato S, Zhu X, Sly W. 1990. Carbonic Anhydrase isoenzyme IV and II in urinary membranes from carbonic anhydrase II-deficient patients. *Proc.Natl.Acad.Sci USA. Medical Sciences*. Vol 87, pp.6073-6078.
67. Selassie M, Sinha A. 2011. The epidemiology and aetiology of obesity: A global challenge. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 25:1–9.
68. Sequeira M. 2012. Estudo da relação entre composição proteica da saliva e a sensibilidade para o gosto amargo. *Dissertação de mestrado em bioquímica*.
69. Schipper R, Silletti E, Vingerhoeds M. 2007. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol* 52:1114-1135.
70. Shatzman A, Henkin R. 1981. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc.Nat Proc. NatL Acad. Sci. USA. Medical Sciences*. Vol.78. 6:3867-3871.
71. Speakman J, Mitchell S. 2011. Caloric restriction. *Molecular Aspects of Medicine*. Volume 32. Issue 3. Pages 159–221.
72. Spiegelman B, Flier J. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell Press*. v:104. p.531:543.

73. Spindler S. 2010. Caloric restriction: From soup to nuts. *Ageing Research Reviews*. Volume 9. Issue 3. Pages 324–353.
74. Supuran C. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews-drug discovery*. Volume 7.
75. Tremblay M, Brisson D, Gaudet D. 2012. Association between salivary pH and metabolic syndrome in women: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 12:40.
76. Ueda H, Yagi T, Amitani H, Asakawa A, Ikeda S, Miyawaki S, Inui A. 2013. The roles of salivary secretion, brain–gut peptides, and oral hygiene in obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*. Available online.
77. Verpoorte J, Mehta S, Edsall J. 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *The Journal of Biological Chemistry*. 242:18:4221-4229.
78. Vitorino R, Guedes S, Manadas B, Ferreira R, Amado F. 2012. Toward a standardized saliva proteome analysis methodology. *Journal of Proteomics*. Volume 75. Issue 17. Pages 5140–5165.
79. Walsh N, Montague J, Callow N, Rowlands A. 2004. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in human. *Archives of Oral Biology*. 49: 149-154.
80. WHO. 2013. Obesity and overweight. Fact sheet nº311.
URL<<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>>
81. WHO expert consultation. 2004. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *The Lancet*.157-163.
82. Yoshino Y, Yamane A, Suzuki M, Nakagawa M. 2009. Availability of saliva for the assessment of alterations in the autonomic nervous system caused by physical exercise training. *Archives of Oral Biology*. Volume 54. Issue 11. Pages 977–985.
83. Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. 2013. Invited critical review: Salivary proteomics in biomedical research. *Clinica Chimica Acta* 415:261–265.

Anexo I: *Dados antropométricos e de concentração proteica salivar dos indivíduos normoponderais usados na otimização do método para a atividade da CA VI*

Tabela I.1. Registo de dados antropométricos dos indivíduos normoponderais usados para a otimização da atividade enzimática da anidrase carbónica.

ID indivíduo	Idade	Peso (kg)	Altura (m)
C2	24	70	1,75
C3	21	55	1,65
C4	24	60	1,67
C5	26	65	1,72
C6	25	56	1,70
C7	23	54	1,63
C9	24	70	1,75
C10	23	55	1,65

Tabela I.2. Concentração em proteína total de amostras de indivíduos normoponderais, utilizadas para otimização do método apresentado para a determinação da atividade da anidrase carbónica VI.

ID indivíduo	[Proteína total] ($\mu\text{g/ml}$)
C2	375,07 \pm 11,02
C3	323,97 \pm 3,08
C4	173,16 \pm 7,87
C5	533,67 \pm 25,17
C6	427,32 \pm 64,73
C7	976,13 \pm 109,13
C9	541,54 \pm 53,77
C10	572,87 \pm 96,33

Anexo II. Determinação dos pontos isoelectricos dos spots proteicos observados em géis 2-DE para tiras (IPG strips) de 13 cm, gama de pH 3-10 não linear

Para a determinação do ponto isoelétrico aparente de cada *spot* recorreu-se à medição do comprimento da tira e da posição da tira no gel de segunda dimensão, tendo em conta a largura deste. Seguidamente, através da posição de cada *spot* (como percentagem da largura do gel) foi feita interpolação gráfica (Figura II.1).

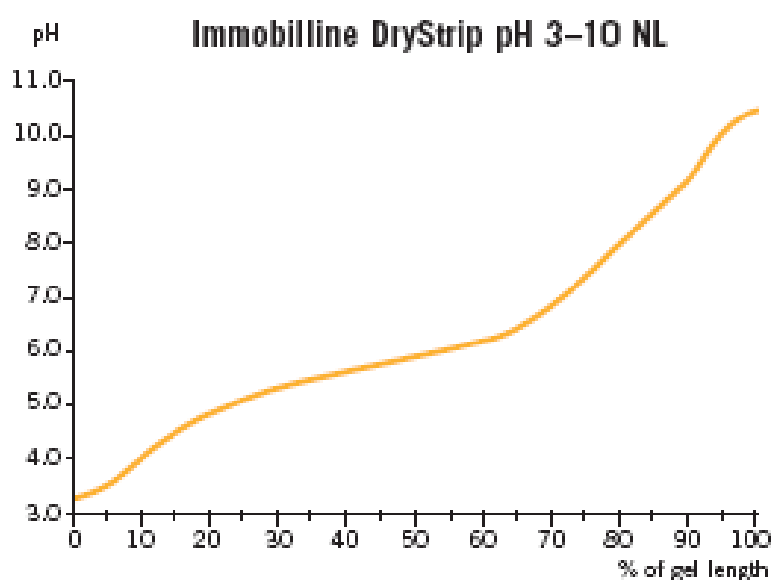


Figura II.1. Gráfico de gradiente de pH. O gradiente de pH apresentado nesta figura é válido para condições próximas de 20°C em 8M ureia, usando IPGbuffer 3-10 NL. (Immobiline DryStrip gels Data file, 18-1177-60 AB, 2004-06; GE-Healthcare).

Anexo III. Membranas de Western blot

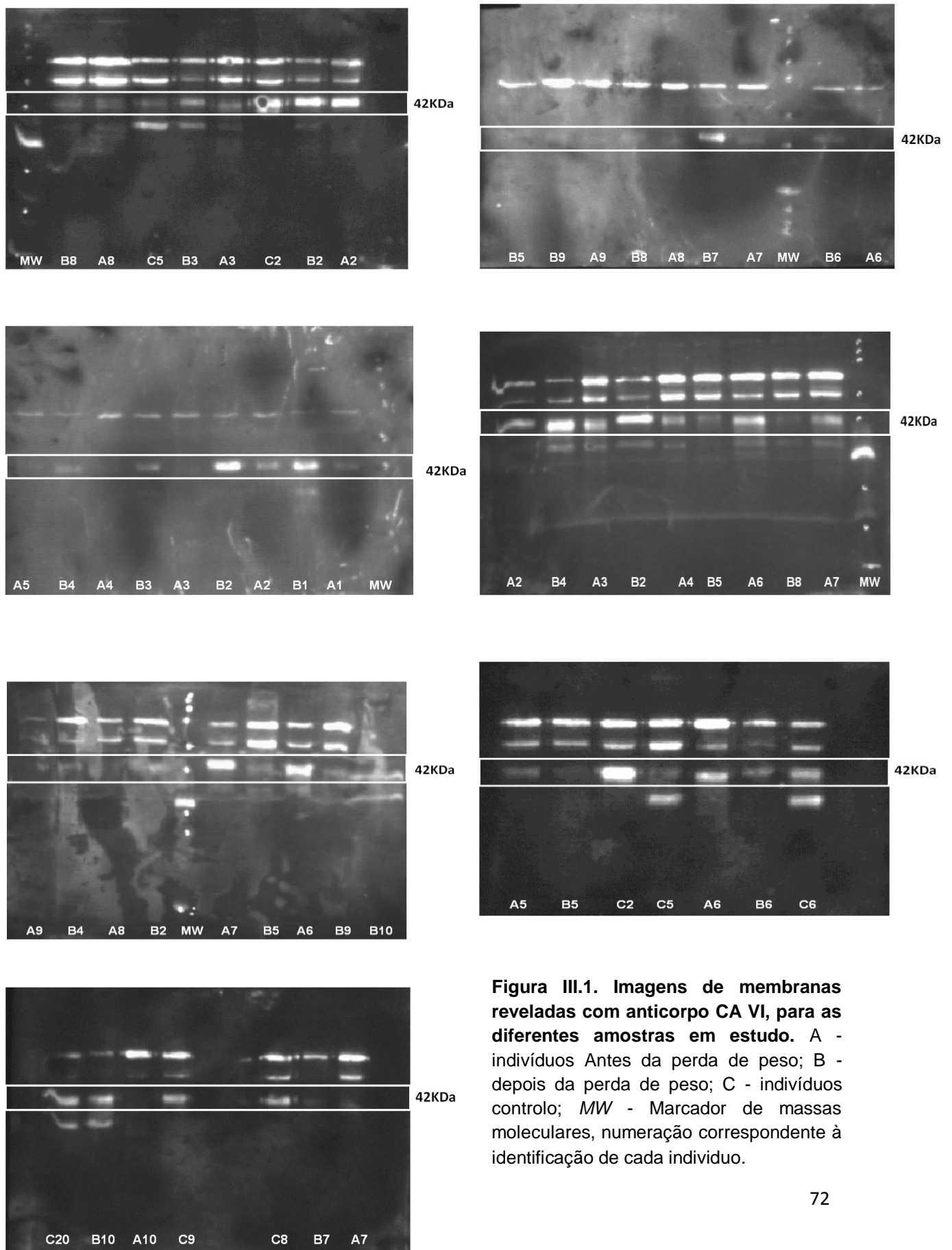


Figura III.1. Imagens de membranas reveladas com anticorpo CA VI, para as diferentes amostras em estudo. A - indivíduos Antes da perda de peso; B - depois da perda de peso; C - indivíduos controlo; MW - Marcador de massas moleculares, numeração correspondente à identificação de cada indivíduo.

Anexo IV: Correlações de Pearson e níveis de significância para os diferentes grupos e ensaios em estudo

Tabela IV. Correlações para os diferentes parâmetros em estudo. Valores de coeficiente de Pearson e valores de P (significativos para $P < 0,05$).

	R	Valor de P
[Proteína total] vs IMC		
Todos os grupos	0,17	0,031
'Antes' da perda de peso	0,24	0,02
'Depois' da perda de peso	0,62	0,103
Controlo	-0,43	0,002
Expressão CA VI vs IMC		
Todos os grupos	-0,38	0,056
'Antes' da perda de peso	0,41	0,324
'Depois' da perda de peso	-0,28	0,438
Controlo	-0,06	0,914
Homens (Antes)	0,15	0,807
Homens (Depois)	-0,46	0,432
Homens (Todos)	-0,60	0,017
Mulheres (Antes)	0,80	0,106
Mulheres (Depois)	-0,14	0,820
Mulheres (Controlo)	-0,06	0,0002
Mulheres (Todos)	-0,33	0,007
Expressão CA VI vs % perda de peso		
'Depois' da perda de peso	0,31	0,391
Homens	0,85	0,066
Mulheres	-0,69	0,196
Atividade enzimática CA vs IMC		
Todos os grupos	0,37	0,288
'Antes' da perda de peso	0,32	0,299
'Depois' da perda de peso	-0,31	0,280
Controlo	-0,215	0,46
Atividade enzimática CA vs Expressão CA VI		
Todos os grupos	-0,48	0,690
'Antes' da perda de peso	0,68	0,209
'Depois' da perda de peso	-0,001	0,999
Controlo	-0,74	0,142