

UNIVERSIDAD DE LEÓN



Departamento de Ciencias Biomédicas

Estudio de la asociación entre el polimorfismo Ala16Val de
la enzima superóxido dismutasa dependiente de
manganeso, la obesidad, y marcadores bioquímicos
oxidativos e inflamatorios

TESIS DOCTORAL

Marco Aurélio Echart Montano

León, 2011

Estudio de la asociación entre el polimorfismo Ala16Val de
la enzima superóxido dismutasa dependiente de
manganeso, la obesidad, y marcadores bioquímicos
oxidativos e inflamatorios

Trabajo realizado por Marco Aurélio Echart Montano
para optar al grado de Doctor

Dirigido por:

Dr. Juan Pablo Barrio Lera

Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

(Art. 11.3 del RD. 56/2005)

El Dr. Juan Pablo Barrio Lera y la Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, como Directores de la Tesis Doctoral titulada "*Estudio de la asociación entre el polimorfismo Ala16Val de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la obesidad, y marcadores bioquímicos oxidativos e inflamatorios*" realizada por D. Marco Aurélio Echart Montano en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de León, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 26 de Enero de 2011.

Fdo: Dr. Juan Pablo Barrio Lera Dra Ivana B. Mânica da Cruz

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de León, en su reunión celebrada el día 27 de Enero de 2011 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "*Estudio de la asociación entre el polimorfismo Ala16Val de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la obesidad, y marcadores bioquímicos oxidativos e inflamatorios*", dirigida por el Dr. Juan Pablo Barrio Lera y la Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz y elaborada por D. Marco Aurélio Echart Montano y cuyo título en inglés es "*Study of the association between the polymorphism Ala16Val of the enzyme manganese-dependent superoxide dismutase, obesity and oxidative and inflammatory biochemical markers*".

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 27 de Enero de 2011

La Secretaria

Fdo.: Dra. Nélida Fernández Martínez

Vº Bº Director del Departamento

Fdo.: Mª Jesús Tuñón González

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, Juarez e Ione por tudo que fizeram e fazem para tornar minha vida uma experiência interessante, válida e útil.

Aos meus filhos William e Rafael razão e motivo de tudo que faço, esperando que entendam que minha ausência foi uma necessidade que será recompensada no decorrer da vida.

Aos meus irmãos Karin Maria e Carlos Eduardo, por tudo que representam na minha vida.

Ao meu cunhado e amigo Carlos Nodari, pela amizade, e o apoio todos estes anos, obrigado.

A minha tia, Glaci Teresinha Echart de Paula Mendes, pelo amor, carinho e apoio sempre.

Ao meus professores diretores de tese Dr. Juan Pablo Barrio Lera e Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

Juan Pablo, por tua amizade, dedicação, preocupação, empenho com minha tesis e acima de tudo pelas lições de dignidade, rigor científico e ética muito obrigado.

Ivana, a quem devo tudo que modestamente conquistei neste caminho fascinante da ciência, por tua amizade, bondade, apoio e incentivo sempre, pelas lições de vida entre tantas outras coisas, muito obrigado.

A Dra. Paqueta González pelo incentivo, atenção e sugestões a tesis,

Ao Deputado Dr. Darcisio Perondi, pela amizade, confiança no meu trabalho e pelo empenho de tomar esta defesa possível.

A Sanofis-aventis, pela bolsa de estudos concedida viabilizando esta tese.

Ao Hospital de Caridade de Ijuí-HCI, na pessoa de seu presidente, Sr. Claudio Matte Martins, pelo apoio e incentivo recebido desta instituição.

Ao Sr. João Luiz Leone de Senna, administrador do HCI, pela amizade, cordialidade, e apoio ao meu trabalho.

A Sra. Ivone Siqueira, gerente financeira do HCI, pela atenção e cordialidade dispensada a mim, e ao meu trabalho.

Aos Drs. Fabio André Frake, Airton Buss, e Edilson Walter do Centro de Alta Complexidade em Oncologia–CACON-HCI) pelo apoio e incentivo ao meu trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, em especial a Maria Fernanda Mânica Rizzi Cattani, Greice Franciele Feyh dos Santos Montagner e Thaís Doeler Algarve, pela amizade, paciência e auxílio nos experimentos.

A Universidade do Oeste de Santa Catarina–UNOESC, Campus Xanxerê, em especial as professoras, Marcieli Maccari, Francielle Garghetti Battiston, Luciéle Guerra Minuzzi e demais colegas e amigos desta Universidade.

Aos funcionários do gabinete do Deputado Dr. Darcisio Perondi das cidades de Ijuí e Brasília, em especial, Claudio, Sandra, Frederico e Sueli à vocês, meus agradecimentos.

À Alessandra M. da Silveira, Ale você sabe porque.

À Marilise Meinke, amiga de toda uma vida, obrigado por você existir e eu saber disso.

Ao Dr. Arlindo Prestes de Lima, amigo, quem primeiro acreditou no meu trabalho e permitiu que tudo isso um dia tivesse início.

Ao Dr. Guilherme B. Brescianni, pela amizade, apoio, incentivo, e conselhos.

A Jane Maldaner, mãe dos meus filhos por ter me dado o presente maior que a vida poderia me dar e por cuidar deles com amor e carinho todos estes anos na minha ausência, obrigado.

Por fim agradeço a todas as pessoas que durante toda minha vida de alguma forma acreditaram e viram em mim algo de bom, de útil e de humano que valesse a pena ser considerado à todos meu muito obrigado.

Parte de los resultados presentados en la presente memoria han sido objeto de los siguientes trabajos:

- MONTANO MAE, BARRIO LERA JP, GOTTLIEB MG, SCHWANKE CH, DA ROCHA MI, MANICA-CATTANI MF, DOS SANTOS GF, DA CRUZ IBM.
Association between manganese superoxide dismutase (SOD2) gene polymorphism and elderly obesity.
Mol Cell Biochem, 328:33-40 (2009).
- KREWER CC, MONTANO, MAE, DA ROCHA MIL, DOLLER, TA, BITTENCOURT L, DUARTE MMF, MACHADO DC, CRUZ IBM. Effect of ALA16VAL gene polymorphism of superoxide Dismutase manganese Dependent (SOD2) in the Glucose Metabolismo of Primary Lynphocytes Lineages.
Congresso Brasileiro de Imunologia, 11-2010. Porto Alegre, RS, Brasil.
- MONTANO MAE, CADONÁ FC, FLÔRES ERS, DUARTE MMMF, LERA JPB, MORESCO RN, ROCHA MIUMR, CRUZ IBM, Efeito do Polimorfismo Ala16Val do gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) na modulação de biomarcadores oxidativos inflamatórios e sua interação com sobrepeso/obesidade. 56º Congresso Brasileiro de Genética, 14 a 17-09-2010, Casa Grande Hotel Resort, Guarujá, SP, Brasil.

Índice

Índice de Abreviaturas y Símbolos	15
Índice de Figuras	19
Índice de Tablas	20
1 INTRODUCCIÓN	21
2 ANTECEDENTES	29
2.1 Epidemiología de la obesidad	29
2.2 La obesidad y sus aspectos fisiopatológicos	33
2.2.1 Obesidad, metabolismo glucémico y fisiología vascular	38
2.2.2 Obesidad y glucocorticoides	39
2.2.3 Obesidad, sistema inmunitario e inflamación	41
2.2.3.1 <i>TNF-α</i>	42
2.2.3.2 <i>Interleucina 6</i>	44
2.2.3.3 <i>Interleucina 1</i>	44
2.2.3.4 <i>Interferón gamma</i>	45
2.2.3.5 <i>Interleucina 10</i>	46
2.2.3.6 <i>Obesidad e inflamación</i>	47
2.2.4 Obesidad, control de la ingestión y metabolismo basal	51
2.3 Obesidad y estrés oxidativo	62
2.3.1 Especies reactivas de oxígeno producidas en el metabolismo	64

2.3.1.1	Radical Superóxido ($O_2^{\bullet -}$).....	64
2.3.1.2	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	66
2.3.1.3	Radical hidroxilo (OH^{\bullet})	67
2.3.2	Impacto de las EROs en el metabolismo celular	67
2.3.3	Los mecanismos de defensa antioxidante	68
2.3.3.1	Superóxido dismutasa (SOD)	72
2.3.3.2	Catalasa (CAT).....	74
2.3.3.3	Glutación peroxidasa (GPx).....	76
2.4	Genética de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso	78
3	OBJETIVOS.....	86
4	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	88
4.1	Protocolo 1.....	88
4.2	Protocolo 2.....	89
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
5.1	Protocolo 1 - Población y muestra	90
5.2	Protocolo 1 - Análisis antropométrico.....	91
5.2.1	Índice de masa corporal	91
5.2.2	Estimación de la circunferencia de cintura.....	91
5.2.3	Presión arterial.....	91
5.3	Protocolo 1 - Análisis bioquímicos	92
5.4	Protocolo 1 - Evaluación de la conducta alimentaria	93
5.5	Protocolo 2 - Aspectos experimentales del cultivo de linfocitos	95

5.5.1	Tratamientos	96
5.5.2	Determinación de citoquinas.....	97
5.5.2.1	<i>Determinación de IL-1.....</i>	<i>97</i>
5.5.2.2	<i>Determinación de IL-6.....</i>	<i>98</i>
5.5.2.3	<i>Determinación de TNF-α.....</i>	<i>99</i>
5.5.2.4	<i>Determinación de IFN-γ.....</i>	<i>100</i>
5.5.2.5	<i>Determinación de IL-10.....</i>	<i>101</i>
5.6	Determinación del polimorfismo genético Ala16Val-SOD2	102
5.7	Aspectos éticos	104
5.8	Análisis estadístico	105
6	RESULTADOS.....	106
6.1	Protocolo 1	106
6.2	Protocolo 2.....	112
7	DISCUSIÓN	120
8	CONCLUSIONES	130
9	ANEXOS	133
10	REFERENCIAS	139

Índice de Abreviaturas y Símbolos

11 β -HSD:	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
11 β -HSD1:	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1
11 β -HSD2:	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
α -MSH:	hormona alfa estimuladora de los melanocitos
AA:	Alanina / alanina
Ala:	Alanina
Ala-SOD2:	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso con alanina en posición 16
AMPc:	AMP cíclico
ANOVA:	Análisis de la varianza
AV:	Alanina / valina
CAT:	Catalasa
CATT1:	Catalasa citosólica
CATA1:	Catalasa peroxisomal
CC:	Circunferencia de la cintura
CRH:	Hormona liberadora de corticotropina
Cu/ZnSOD:	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
DXA:	Absorciometría de rayos X de energía dual
ECSOD:	Superóxido dismutasa extracelular
ERN:	Especie reactiva de nitrógeno
ERO:	Especie reactiva de oxígeno
G6PD:	Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa
GLUT:	Receptores de glucosa
GPx:	Glutación peroxidasa
GR:	Glutación reductasa
GSH:	Glutación (forma reducida)
GSSG:	Glutación (forma oxidada)
HC-FM-USP:	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo -Brasil
HCV:	Virus de la hepatitis C
HLA:	Área hipotalámica lateral

HPA:	Eje hipotálamo-adrenal
HRP:	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IC:	Intervalo de confianza
ICAM-1:	Molécula de adhesión de monocitos intracelular 1
IGG-PUCRS:	Instituto de geriatría e Gerontologia PUC-RS/BRASIL
IFN- γ :	Interferón gamma
IKB:	Proteína inhibidora del factor nuclear κ B
IL-1:	Interleucina 1
IL-6:	Interleucina 6
IL-10:	Interleucina 10
IL1Ra:	Receptor antagonista de interleucina 1
IMC:	índice de masa corporal
IMT:	Densidad media de la íntima
IRS-1:	Sustrato 1 del receptor de la insulina
JNK:	Kinasa Jun N-terminal
LTB4:	Leucotrieno B4
MCP-1:	Proteína quimioattractora de monocitos
MDA:	Malondialdehído
SOD2:	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MTS:	Secuencia diana mitocondrial
NF κ B:	Factor de transcripción κ B
NK:	Células asesinas naturales
NO:	Óxido nítrico
NPY:	Neuropéptido Y
OBRb:	Receptor de cadena larga de la leptina
OBRa:	Receptor de cadena corta de la leptina
OX-LDL:	LDL oxidada
PAS:	Presión arterial sistólica
PAD:	Presión arterial diastólica
PCR:	Proteína C reactiva
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa

PPAR:	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
PGE2:	Prostaglandina E2
PHA:	Fitohematoglutinina
PKA:	Proteína quinasa A
RFLP:	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RM:	Resonancia magnética
RL:	Radicales libres
SNP:	Polimorfismo de nucleótido único
SOD:	Superóxido dismutasa
SOD1:	Superóxido dismutasa citosólica dependiente de cobre y zinc
SOD2:	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
SOD3:	Superóxido dismutasa extracelular dependiente de cobre y zinc
SPSS:	Paquete estadístico para ciencias sociales
TACO:	Tabla de composición de alimentos de Brasil
TC:	Tomografía computerizada
TLR4:	Receptor tipo Toll 4
TLR2:	Receptor tipo Toll 2
TNF:	Factor de necrosis tumoral alfa
Val:	Valina
Val-SOD2:	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso con valina en posición 16
VMN:	Núcleo hipotalámico ventromedial
VV:	Valina / valina
WAT:	Tejido adiposo blanco

Índice de figuras

- Figura 2.1** Esquema de los principales factores y cambios que están relacionados con la obesogénesis o producidos como consecuencia de la obesidad..... 37
- Figura 5.1** Electroforesis en gel de agarosa mostrando los productos de digestión con *HaeIII* de ADN humano con los diferentes polimorfismos Ala16Val-SOD2..... 104
- Figura 6.1** Producción de IL-1 por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina..... 115
- Figura 6.2** Producción de IL-6 por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina..... 116
- Figura 6.3** Producción de TNF α por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina..... 117
- Figura 6.4** Producción de IFN- γ por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina..... 118
- Figura 6.5** Producción de IL-10 por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina..... 119

Índice de tablas

Tabla 1. Características basales entre los individuos obesos y los controles no obesos. Las variables se expresan como media +/- desviación estándar o porcentaje del grupo.	106
Tabla 2. Frecuencia alélica y porcentaje del polimorfismo del genotipo Ala16Val-SOD2 en sujetos obesos y controles no obesos.	107
Tabla 3. Comparación de variables fisiológicas entre obesos y no obesos con diferentes polimorfismos del gen Ala16Val-SOD2.	109
Tabla 4. Comparación de la ingesta de macro- y micronutrientes entre individuos obesos y no obesos con diferentes genotipos del gen Ala16Val-SOD2.	111
Tabla 5. Comparación de la captación de glucosa (media \pm SD) por linfocitos T con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2 en medio de cultivo suplementado con glucosa e insulina.	113
Tabla 6. Concentración de citoquinas en linfocitos con diferentes genotipos del gen Ala16Val-SOD2 para cada uno de los tratamientos experimentales.	114

1 Introducción

Las tres últimas décadas han sido testigos de un aumento alarmante de la prevalencia de la obesidad en los países industrializados y en desarrollo, donde se ha producido un cambio dramático en la epidemiología, al registrarse una caída en los niveles de desnutrición y un aumento en la prevalencia de la sobrealimentación. Por desgracia, el aumento de la ingestión de alimentos no está relacionado con el aumento de la calidad nutricional, sino más bien con niveles elevados de consumo de calorías y una disminución del gasto energético. Esta condición provoca importantes alteraciones fisiológicas y bioquímicas que están directamente relacionadas con un mayor riesgo de desarrollo de síndromes metabólicos como son la obesidad mórbida, la hipertensión, la diabetes tipo II o la hipercolesterolemia, quienes a su vez aumentan el riesgo de enfermedades crónicas, especialmente enfermedades cardiovasculares.¹ Dado que la obesidad y alteraciones relacionadas tienen origen multifactorial, la investigación de los factores causales asociados con la obesogénesis y los instrumentos aplicables a su tratamiento tiene gran relevancia.

Al revisar la extensa literatura relativa al tema de la obesidad puede apreciarse la utilización de enfoques múltiples para examinar las causas y consecuencias de la obesidad en las poblaciones humanas, entre ellos el estudio de (a) los patrones de distribución, la dinámica de la obesidad en la población, (b) el impacto de la obesidad sobre la salud, (c) los factores determinantes o causas de la obesidad, y (d) el desarrollo y validación de medidas de composición corporal utilizadas en estudios epidemiológicos comparativos.²

Kim y Popkin³ propusieron en 2006 un modelo de rutas a varios niveles para describir las causas de la obesidad y sus múltiples consecuencias generadas para la salud. En este modelo, el

sobrepeso y la obesidad se consideran como resultado de factores procedentes de rutas metabólicas relacionadas con factores dietéticos, actividad física, desarrollo fetal e infantil, y variables socioculturales y genéticas. Este modelo explica el carácter dinámico y la complejidad de la obesidad como una entidad patológica. Esto tiene implicaciones importantes para el análisis y la interpretación de los datos sobre las causas de la obesidad y su relación con la mortalidad.

En términos fisiológicos, la obesidad se caracteriza por un aumento en la grasa corporal total y/o grasa abdominal. El aumento en el tejido adiposo tiene un impacto importante en la homeostasis del organismo, ya que el tejido adiposo no es sólo un órgano de simple almacenamiento de moléculas de energía, sino que también tiene importantes funciones endocrinas e inmunológicas que se realizan a través de la producción de moléculas reguladoras como son la adiponectina, la leptina, o diversas citoquinas.

Del mismo modo, el desequilibrio en la producción de estas moléculas en los obesos puede afectar a varias funciones biológicas, como la función endotelial vascular, aumentando la producción de proteínas vasoconstrictoras⁴ disminuyendo la producción y la acción de las moléculas asociadas a la vasodilatación, tales como el óxido nítrico. Todo ello sugiere que la obesidad humana está directamente relacionada con un estado crónico de estrés oxidativo.^{5,6}

El cuerpo humano, como organismo aerobio, utiliza la glucosa y el oxígeno para generar energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP). En este proceso, alrededor del 5% del oxígeno consumido se transforma en moléculas con electrones desapareados dotadas de una elevada reactividad química. Estas moléculas son generalmente conocidas como especies reactivas del oxígeno (EROs) o radicales libres (RL).

El control de la producción de radicales libres se efectúa por medio de dos sistemas antioxidantes complementarios: El sistema antioxidante endógeno, compuesto por enzimas que inactivan las EROs hacia agua, y el constituido por moléculas antioxidantes exógenas obtenidas principalmente a través de la dieta.

El sistema antioxidante enzimático incluye importantes enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), el sistema de la tiorredoxina, la glutatión peroxidasa (GPX) y la hemo oxigenasa. La principal reacción antioxidante es la relativa a la catálisis de los iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) producidos a partir del oxígeno no utilizado en los ciclos bioquímicos conducentes a la producción de ATP mitocondrial. En este sistema antioxidante los iones superóxido son el sustrato de la superóxido dismutasa (SOD), que se considera la primera defensa enzimática contra el estrés oxidativo producido por el metabolismo normal.⁷ La SOD convierte eficientemente los radicales $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Este último es a continuación degradado en última instancia hacia agua por la catalasa o la glutatión peroxidasa. Existen tres isoformas de SOD: la SOD2 dependiente de manganeso, también denominada MnSOD, localizada en las mitocondrias, una SOD dependiente de cobre y zinc en el citoplasma (Cu/ZnSOD ó SOD1), y en tercer lugar la SOD3 presente en los compartimentos extracelulares.⁸

La enzima SOD2 a pesar de ser codificada por un gen nuclear y sintetizada en el retículo endoplásmico, actúa sólo dentro de las membranas mitocondriales. En este contexto, esta enzima cataliza (dismuta) los aniones superóxido producidos a partir de la respiración celular hacia peróxido de hidrógeno. Posteriormente, la glutatión peroxidasa cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno formado en la mitocondria hacia agua.

Por consiguiente, la proteína SOD2 sintetizada en el citoplasma se transporta hacia las mitocondrias a partir de la

información contenida en un pequeño segmento de la proteína conocido como secuencia mitocondrial diana (*Mitochondrial target sequence*, MTS).

Los estudios genéticos han descrito un polimorfismo de sustitución de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP) en el codón 16 en la región MTS de la proteína SOD2, donde tiene lugar la sustitución de una alanina por una valina. Por lo tanto, existen tres genotipos posibles en la población humana: AA, VV y AV. El alelo A determina la síntesis de una hélice alfa de proteína SOD2 que tiene una alta eficiencia en cuanto a su transporte y entrada en la mitocondria. Sin embargo, el alelo V determina la síntesis de una proteína con estructura en lámina beta que permanece parcialmente retenida entre ambas membranas mitocondriales.⁹

Estas condiciones pueden tener consecuencias negativas sobre la funcionalidad de la enzima. En este sentido, los portadores del genotipo AA presentan una isoforma dotada de una mayor facilidad para entrar en la mitocondria y por lo tanto una más eficiente dismutación del superóxido. Por otra parte, los portadores del genotipo VV poseen una enzima que penetra con más dificultad en la mitocondria y por lo tanto es menos eficiente en la inactivación de iones superóxido.⁹

Estas observaciones proceden de estudios *in vitro* que utilizaron la importación de proteínas quiméricas en ratones y demostraron que el precursor Ala-SOD2 generado es un 30-40% más activo en el tratamiento de homotetrámeros SOD2 que el precursor Val-SOD2. Por tanto, la Ala-SOD2/MTS permite la importación eficiente de SOD2 hacia la matriz mitocondrial, mientras que la variante Val causa la retención parcial del precursor en la membrana interna y disminuye la formación del homotetrámero SOD2 activo en la matriz mitocondrial.¹⁰

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el alelo A ocasiona un transporte alterado de la enzima al interior de la mitocondria. Este hecho se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama, próstata, colon, carcinoma hepatocelular en pacientes infectados por el VHC, y mesotelioma pleural maligno.^{11,12,13,14,15}

Sorprendentemente, otros estudios epidemiológicos han sugerido que el alelo V no es una "buena variante genética" dado que han sido observadas asociaciones de este alelo con aterosclerosis de carótida medida como densidad media de la íntima (IMT) por ultrasonidos¹⁶, con miocardiopatía dilatada no familiar en individuos japoneses¹⁷, y altos niveles de LDL oxidadas (ox-LDL) en brasileños con efecto sinérgico en pacientes con diabetes tipo 2.¹⁸ Sin embargo, datos alternativos mostraron que esta variante del alelo A del péptido señalizador aumenta la actividad de la SOD2 mitocondrial, protege los macrófagos contra la apoptosis inducida por ox-LDL, y reduce el riesgo de inducción de apoptosis por la enfermedad arterial coronaria e infarto del miocardio.¹⁹

Los hechos anteriores sugieren una "paradoja" en el polimorfismo SOD2, especialmente teniendo en cuenta que las condiciones homocigóticas (AA, VV) de esta variación provocan un desequilibrio en la modulación antioxidante que conduce al aumento de concentración de superóxido en los individuos VV o de peróxido de hidrógeno en los individuos AA.

En ambos casos, las interacciones ambientales parecen aumentar o disminuir el riesgo de enfermedades no transmisibles como cáncer y enfermedades cardiovasculares, como sugiere un estudio que describe una interacción entre este polimorfismo y patrones de dieta antioxidante y otras variables del estilo de vida como el tabaquismo sobre el riesgo de cáncer de pulmón.²⁰

Dado que los estudios sugieren una asociación entre la obesidad y el estrés oxidativo, permanece abierta la cuestión de

hasta qué punto el aumento del estrés oxidativo sería sólo una consecuencia de la obesogénesis o también podría ser un factor causal de este fenómeno metabólico. Desafortunadamente, este es un tema que apenas ha sido estudiado en profundidad. En este sentido, los estudios relativos al polimorfismo Ala16Val-SOD2 podrían ser relevantes para la comprensión de en qué grado el desequilibrio oxidativo en sí sería "agente causal" de la obesidad.

Dentro de este contexto ha sido diseñada esta investigación, con el objetivo de examinar la cuestión desde dos puntos de vista, el primero consistente en un análisis epidemiológico de la asociación entre el polimorfismo Ala16Val-SOD2 y la obesidad y el segundo que implica una investigación complementaria *in vitro* del metabolismo de la glucosa con los diferentes genotipos Ala16Val-SOD2.

En este sentido, la decisión de investigar el efecto del polimorfismo Ala16Val-SOD2 sobre el metabolismo de la glucosa en linfocitos fue tomada por las siguientes razones: (1) puesto que los estudios epidemiológicos describen asociaciones entre alteraciones multifactoriales, como es el caso de la obesidad y los polimorfismos genéticos, que pueden estar influidas por otros factores genéticos y ambientales no controlados en el estudio, son deseables estudios complementarios en condiciones controladas; (2) en principio, la primera opción de estudio serían los cultivos de tejido adiposo; sin embargo, puesto que todavía no se conoce de qué manera el polimorfismo puede influir en los mecanismos relacionados con la obesogénesis, y las células del tejido adiposo son de difícil acceso, investigaciones iniciales *in vitro* en células con mayor facilidad de acceso y control experimental, como es el caso de los linfocitos, también son relevantes; (3) además de que los linfocitos son células de fácil acceso y la normalización de su cultivo celular está bien establecida –lo que facilita los estudios iniciales sobre el efecto de los polimorfismos genéticos–, investigaciones preliminares llevadas a cabo por Montagner et al.²¹ en 2010 han demostrado diferencias

en el índice mitótico y el perfil oxidativo de cultivos de linfocitos con diferentes genotipos del polimorfismo Ala16Val-SOD2 expuestos a la radiación ultravioleta; (4) en relación con el metabolismo de los carbohidratos los linfocitos también presentan características importantes y relevantes; dado que la regulación de la homeostasis de los linfocitos es fundamental para el desarrollo y la formación de la respuesta inmune, el número de linfocitos se debe mantener para permitir que haya una cantidad suficiente de linfocitos que combatan los agentes patógenos pero que no aparezcan en exceso con el aumento del riesgo de desarrollo de enfermedades autoinmunes o incluso cáncer.²² Por lo tanto, las líneas de linfocitos en reposo se mantienen por el metabolismo oxidativo mitocondrial que utiliza la glucosa y la glutamina para la producción de energía.^{23,24}

En presencia de antígenos, las líneas de linfocitos T sufren una explosión mitótica que requiere el aporte de una gran cantidad de energía. Las células T, a diferencia de los monocitos, son insensibles a la insulina y no presentan receptores para estas hormonas. Sin embargo, cuando son activadas por antígenos, como es el caso de la fitohemaglutinina (PHA), se desarrollan receptores para la insulina y comienzan a metabolizar la glucosa en función de la dosis de la hormona. Los linfocitos cuando pasan de un estado inactivo a un estado de gran actividad alteran drásticamente su metabolismo. Así, el metabolismo de la glucosa aumenta muy rápidamente. Es decir, la principal fuente de energía pasa a ser la ruta glucolítica a través de la ruta de las pentosas. En este sentido, la mayor producción de energía así como la aparición de hiperglucemia incrementa también las concentraciones de EROs generados por los linfocitos. Cuando finaliza la respuesta inmune, el sistema vuelve a su estado quiescente a través de mecanismos de apoptosis que harán disminuir la tasa de linfocitos circulantes. Las células cesan de proliferar, disminuyen y revierten su metabolismo oxidativo para volver al estado de reposo. Por lo tanto, si el sistema antioxidante endógeno determinado genéticamente tiene influencia sobre el

metabolismo de los carbohidratos, serían pertinentes estudios utilizando como modelo el cultivo *in vitro* de linfocitos que regresan desde una elevada actividad mitótica hacia el modo de reposo. Es decir, estas actividades complementarias podrían indicar si nuevos elementos del metabolismo oxidativo determinados genéticamente -como es el caso de la enzima SOD2- con capaces de interferir con las respuestas metabólicas de la glucosa y la energía en el organismo.

Siendo una cuestión todavía poco explorada y de interés científico, clínico y epidemiológico, el tema central del estudio presentado aquí es la posible asociación de las variaciones genéticas del sistema antioxidante enzimático con la obesidad y su influencia en el metabolismo de la glucosa.

2 Antecedentes

2.1 Epidemiología de la obesidad

La obesidad se considera una enfermedad reconocida desde 1985, como un trastorno patológico caracterizado por la acumulación excesiva de grasa en comparación con los valores previstos para una determinada altura, edad y género.^{25,26}

Las tres últimas décadas han sido testigos de un alarmante aumento en las tasas de obesidad en los países industrializados y muchos países en desarrollo como Brasil. Este fenómeno parece estar relacionado con un cambio drástico en el estado de nutrición de la población.

Anteriormente el riesgo principal de salud era la desnutrición. Sin embargo, la transición a un estado de sobrealimentación también ha significado problemas para la salud pública. Esto es porque el exceso de nutrición calórica está directamente relacionado con un marcado incremento en la prevalencia de la obesidad y las enfermedades relacionadas con la obesidad, entre ellas la hipertensión, la diabetes tipo II, hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares.²⁷

Por lo tanto, la obesidad es una epidemia de nuestro siglo, con tasas de prevalencia en aumento de manera continua y nítida.²⁸ El aumento de la prevalencia de la obesidad refleja los cambios contemporáneos en el estilo de vida, incluyendo cambios en el comportamiento alimentario determinado por el mayor consumo de alimentos con alta contenido en grasa y carbohidratos simples y cambios en el perfil de gasto de energía determinados por el aumento de los niveles de inactividad física.

Este fenómeno sin precedentes ha alentado la formación de una nueva rama de la epidemiología enfocada directamente sobre la

obesidad. En el estudio de la obesidad se utilizan métodos epidemiológicos para examinar las causas y consecuencias de la obesidad en las poblaciones humanas. Incluye el estudio de múltiples y extensas áreas relacionadas entre sí como son (a) los patrones de distribución y la dinámica de la obesidad en las poblaciones, (b) la salud y otras consecuencias de la obesidad, (c) los factores o causas de la obesidad, y (d) el desarrollo y la validación de medidas de composición corporal utilizadas en estudios epidemiológicos.²⁹

Los conocimientos adquiridos se pueden aplicar a todas las iniciativas de salud pública con el objetivo de prevenir y controlar la obesidad y las condiciones de salud relacionadas con ella.

Sin embargo, los estudios sistemáticos de la asociación entre la obesidad y la composición corporal y el metabolismo son un fenómeno relativamente reciente. Sólo a partir de mediados del siglo XX se han efectuado estudios epidemiológicos de amplio espectro, y estudios de cohorte para constatar las tendencias y analizar los predictores de la nutrición y del estilo de vida en las enfermedades crónicas. En este sentido, la metodología básica utilizada en los estudios epidemiológicos sobre la obesidad data del siglo XIX, cuando Quetelet (1832)³⁰ desarrolló el concepto de índice de masa corporal (IMC) para determinar la adiposidad de las poblaciones. El IMC es un índice calculado dividiendo el peso entre el cuadrado de la altura. Los estudios poblacionales han determinado que los valores normales se encuentran entre 18,5 y 35 kg/m². Valores más bajos indican desnutrición, refiriéndose sobrepeso para valores comprendidos entre 25 y 30 kg/m² y obesidad para IMC superiores a 30 kg/m².³¹

Como la mayoría de las otras ramas de la epidemiología, este campo relativamente nuevo tiene profundas raíces en los métodos de la epidemiología clásica. Esta unión de la epidemiología moderna junto con la comprensión biológica de la obesidad y sus

consecuencias parece ser vital para comprender mejor esta morbilidad. En consecuencia, una introducción al desarrollo histórico de los métodos epidemiológicos y de investigación sobre la obesidad da una perspectiva de cómo han convergido estos elementos para formar el campo de la epidemiología de la obesidad.

Bray (2007) comenta el contexto histórico de la investigación de la obesidad.³² La obesidad ha sido reconocida por las civilizaciones más antiguas. Casos de obesidad han sido identificados en representaciones gráficas de la Edad de Piedra y existen retratos de mujeres obesas desde hace miles de años. Hipócrates observó que "las muertes súbitas eran más frecuentes en los individuos más gordos que en los más delgados", y describió la obesidad como "no sólo una enfermedad en sí, sino un precursor de otras enfermedades". Bray también comenta que el libro escrito por Short 1727³³ fue la primera monografía sobre el tratamiento de las personas obesas a través del ejercicio y "otros medios naturales".

Este trabajo fue seguido por la descripción de Fleming (1760)³⁴ de cuatro casos de obesidad, uno de ellos claramente debido a la ingesta excesiva de alimentos. William Banting publicó en 1863 un texto titulado "*carta sobre la corpulencia dirigida al público en general*"³⁵ que fue considerado el primer libro de "dieta popular". Este consistió en un folleto de 21 páginas escrito para un paciente obeso tratado con una dieta que contenía altas concentraciones de proteínas para inducir la pérdida de peso. Por esta razón, podemos considerar que algunos conceptos que forman la base de la investigación actual sobre la obesidad, también tienen su origen en los siglos pasados, especialmente en el siglo XVIII. En 1720, Santorio, profesor de medicina en Padua, desarrolló una balanza para pesarse él mismo, utilizada para registrar sus cambios de peso diario, así como la variación de su peso en relación con sus niveles de actividad física y de ingesta de alimentos.

En 1777, Lavoisier realizó una contribución fundamental al concepto de balance energético, determinando que el consumo de oxígeno en humanos debido al metabolismo era similar al provocado por la combustión.

Sin embargo, tendría que transcurrir otro siglo antes de que Atwater(1895)³⁶ efectuase la demostración de la Ley de Conservación de la Energía aplicada a los seres humanos y Quetelet (1832)³⁰ desarrollase el índice de masa corporal que permanece como la medida de la obesidad más ampliamente utilizada hasta el día de hoy.

Sobre la base de los conocimientos sobre la obesidad adquiridos históricamente, durante el siglo XX han tenido lugar grandes avances en los enfoques experimentales a la investigación de la obesidad a niveles celular, genético y metabólico. Además, se realizaron estudios que permitieron una serie de avances tecnológicos en las medidas de la obesidad, entre ellas la absorciometría de rayos X de energía dual (*dual-emission X-ray absorptiometry*, DXA), tomografía computerizada (TC) y resonancia magnética por imagen (*magnetic resonance imaging*, MRI).

Estas tecnologías han proporcionado estimaciones cuantitativas del porcentaje de distribución de grasa tanto corporal como regional. El método del agua doblemente marcada permite medir el gasto de energía del cuerpo. Estas innovaciones constituyen en la actualidad la base de la investigación moderna de la obesidad que ha permitido aumentar el conocimiento sobre la fisiopatología de esta enfermedad, así como avances sustanciales relacionados con el comportamiento, la farmacología y el tratamiento quirúrgico de la obesidad. Los estudios experimentales desarrollados a finales del siglo pasado condujeron a un importante descubrimiento: la existencia de la leptina, una hormona producida por las células del tejido adiposo. Esta hormona tiene como principal función la regulación del apetito y el metabolismo energético.

Aunque el descubrimiento de la leptina no ha tenido efecto en la terapia de la obesidad, su importancia ha sido fundamental, ya que abrió la puerta a nuevas investigaciones que llevaron al descubrimiento de otras moléculas reguladoras importantes, entre las que se encuentran citoquinas como adiponectina, resistina y adiposina, ASP (*acylation-stimulating protein*), angiotensinógeno y TGF- β .

Estas evidencias han conducido a la aceptación general de que el tejido adiposo, además de ser un tejido de almacenamiento de energía, es también un órgano endocrino.

2.2 La obesidad y sus aspectos fisiopatológicos

Antes de efectuar la revisión de los aspectos fisiopatológicos de la obesidad es necesario incidir en la información histo-funcional del tejido adiposo en sí mismo.

El tejido adiposo se localiza en distintas ubicaciones anatómicas configurando múltiples depósitos que pueden ser referidos colectivamente como grasa corporal.³⁷ El tejido adiposo se puede dividir en dos tipos principales: el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo pardo o marrón (BAT) diferenciados a lo largo de la embriogénesis. El tejido adiposo blanco representa la gran mayoría del tejido adiposo en el organismo adulto y el depósito principal de almacenamiento de energía, mientras que el papel fundamental del tejido adiposo pardo es la termogénesis sin temblores (*non-shivering thermogenesis*), especialmente en pequeños mamíferos y humanos recién nacidos. El tejido adiposo blanco se compone de varios tipos de células, siendo los adipocitos las más abundantes. Otro tipo de células presentes en el tejido adiposo blanco incluyen la fracción del estroma vascular en que alrededor del 10% son macrófagos CD141 y CD311.³⁸

El número de macrófagos en el tejido adiposo blanco está directamente relacionado con la adiposidad y con el tamaño de los adipocitos tanto en humanos como en ratas y ratones, sin mostrar diferencias significativas entre el tejido adiposo blanco y subcutáneo visceral.³⁹ En las ratas hembras aparece un mayor número de macrófagos en el tejido adiposo blanco que en machos, pero en la actualidad no se sabe si esto mismo sería cierto para los seres humanos.⁴⁰ Pese a que se han descrito sorprendentes similitudes entre los macrófagos y los adipocitos, y los pre-adipocitos pueden diferenciarse hacia macrófagos, estos dos tipos de células son de hecho diferentes.⁴¹

Los experimentos con médula ósea de ratones quiméricos han mostrado que los macrófagos del tejido adiposo blanco se derivan de la médula ósea, lo que indica que los macrófagos presentes en el tejido adiposo no derivan de la diferenciación *in situ* de preadipocitos sino de los monocitos circulantes que infiltran el tejido adiposo blanco. La incubación de adipocitos en medio acondicionado aumenta la expresión de moléculas de adhesión intracelular ICAM-1 y moléculas de adhesión plaquetaria endotelial intracelular 1 en las células endoteliales e induce la adhesión y trans migración de monocitos de la sangre, un efecto imitado por las altas dosis de leptina.⁴²

También es posible que quimiocinas como la proteína quimioattractora de monocitos 1 (MCP-1), que se expresa en el tejido adiposo y cuya concentración se correlaciona con la adiposidad, pueda contribuir al reclutamiento de monocitos en el tejido adiposo blanco.⁴³

En términos anatómicos el tejido adiposo blanco esta constituido por dos compartimientos principales: subcutáneo (anterior y posterior) y por diversos depósitos viscerales. Además, existen depósitos adiposos especializados en los ganglios linfáticos, glándulas mamarias y células troncales de la médula ósea.⁴⁴

Desde hace tiempo se pensaba que la única función del tejido adiposo era la de almacenamiento energético y ayuda en la termorregulación del cuerpo. Sin embargo, este punto de vista ha cambiado en los últimos años a partir de estudios en modelos experimentales y en seres humanos. Hoy en día, el tejido adiposo se considera un órgano secretor de gran importancia para el metabolismo corporal. En la revisión efectuada por Prado et al. (2009)⁴⁵ se hace hincapié en que "cuantitativamente, las secreciones más importantes del tejido adiposo son los ácidos grasos que se liberan durante los períodos de balance energético negativo (especialmente el ayuno)". Además, las células adiposas sintetizan otras diversas moléculas de lípidos, entre las que se incluyen las prostaglandinas (derivadas de ácidos grasos poliinsaturados) sintetizadas por el propio tejido adiposo, así como colesterol y retinol, que no se sintetizan en los adipocitos, pero son almacenados y liberados por este tejido.

El tejido adiposo secreta una gran cantidad de péptidos bioactivos que no sólo influyen en la función de los adipocitos, sino que también actúan sobre otros tejidos del cuerpo. Aunque cada uno de los adipocitos produce una pequeña cantidad de estas moléculas, en su conjunto, ya que el tejido adiposo es considerado uno de los órganos corporales de mayor tamaño, la producción de estos factores tiene un impacto importante en el funcionamiento del organismo.⁴⁶

Dentro de los péptidos secretados por el tejido adiposo se encuentran las llamadas adipoquinas. Estas moléculas también se conocen como citoquinas, ya que son producidas por otras células pertenecientes al sistema inmunológico del organismo. Las citoquinas son generalmente definidas como proteínas solubles, sintetizadas o no por las células inmunes, que median en la comunicación intercelular mediante la transmisión de información a las células diana a través de la interacción con receptores

específicos. Por lo tanto, muchas citoquinas tienen otras actividades fisiológicas además de las originalmente descubiertas.⁴⁷

Debido al descubrimiento de un gran número de citoquinas producidas por los adipocitos ha sido necesario crear un término específico para su identificación. Esto fue propuesto por Matsuzawa et al.⁴⁸ quienes en 1999 nombraron a estas moléculas "adipocitoquinas". Sin embargo, a causa de un cierto nivel de confusión, el término se convirtió en "adipoquinas", denominación ampliamente utilizado en todas partes y caracteriza a toda proteína bioactiva producida por los adipocitos sea o no una citoquina. Las adipoquinas son moléculas muy diversas en relación con su estructura y función, incluyendo además de las citoquinas clásicas factores de crecimiento, proteínas sistémicas complementarias implicadas en la regulación de la presión arterial, homeostasis vascular, angiogénesis y metabolismo glucídico y lipídico. La obesidad directamente relacionada con el aumento del número y tamaño de los adipocitos se considera una disfunción o morbilidad de origen multifactorial, con participación de interacciones genéticas y ambientales. Los estudios genéticos han sugerido que más de 200 genes están directa o indirectamente asociados con la obesidad.^{49,50,51,52,53}

Independientemente de sus factores el estado obesogénico induce cambios fisiológicos importantes, ya que rompe la homeostasis corporal. Además, las alteraciones en algunos procesos metabólicos también pueden contribuir al desencadenamiento de la obesidad. Dada la gran complejidad del tema y del conjunto de la evidencia científica descrita en la literatura podemos destacar los siguientes cambios como contribuyentes en un circuito de causa y efecto de la obesidad, que se muestran esquemáticamente en la Figura 1: (1) en el metabolismo de la glucosa y la fisiología vascular, (2) en la modulación de hormonas y moléculas relacionadas con el estrés, en especial el cortisol, (3) en

la respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, (4) en el control del apetito y la saciedad y el metabolismo basal, y (5) en el metabolismo oxidativo. A continuación se efectúa una revisión de estos factores en relación con la obesidad.

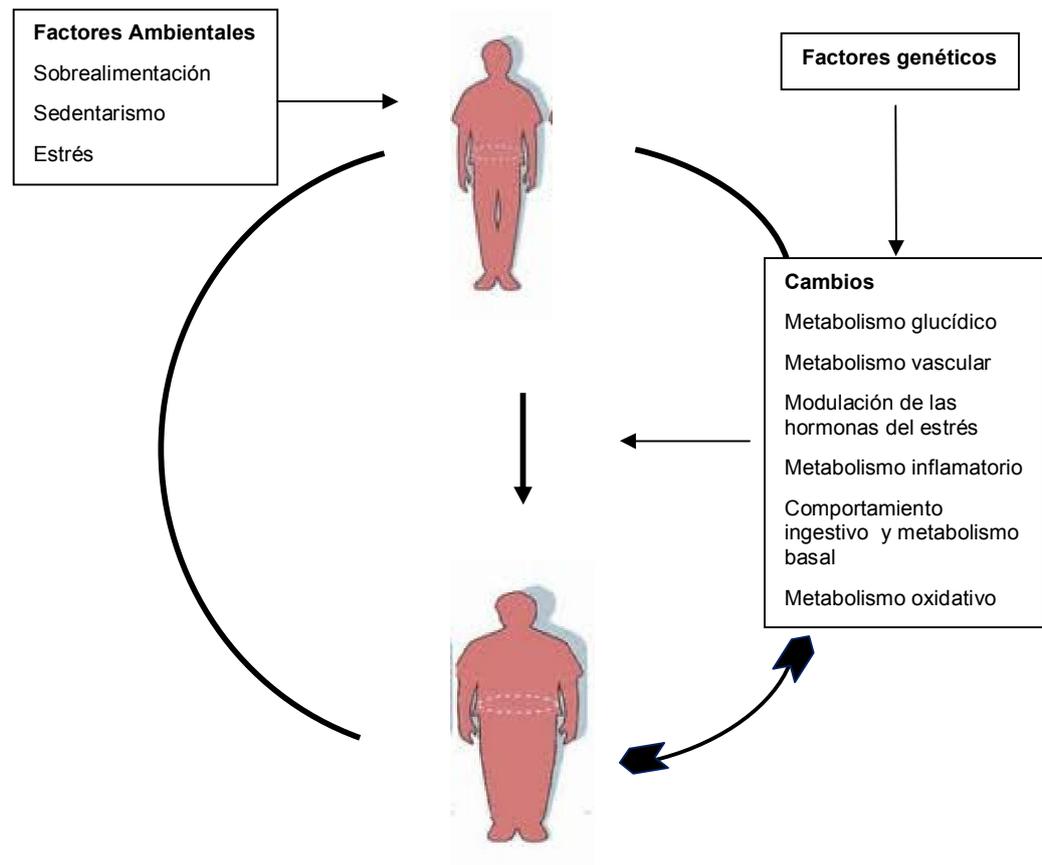


Figura 2.1 Esquema de los principales factores y cambios que están relacionados con la obesogénesis o producidos como consecuencia de la obesidad.

2.2.1 Obesidad, metabolismo glucémico y fisiología vascular

El principal efecto adverso de la obesidad se relaciona con los profundos cambios metabólicos que son provocados por este fenómeno, que se pone de relieve en la resistencia a la acción de la insulina. Este proceso se produce una vez que el individuo obeso, ingiere persistente y sistemáticamente una gran cantidad de alimentos ricos en glucosa. La glucosa absorbida a nivel intestinal desencadena la liberación de insulina, que a su vez actúa sobre los receptores de glucosa (GLUT) presentes en muchas células corporales. Estos receptores, una vez estimulados, introducen la glucosa en la célula. En los adipocitos, gran parte de esta glucosa a su vez es transformada en lípidos que son almacenados en su interior.

La constante liberación de insulina conduce a la resistencia de los receptores de glucosa y en consecuencia aumenta tanto la concentración de glucosa plasmática como de insulina. La resistencia a la insulina se considera, pues, como el primer paso hacia el desarrollo de diabetes mellitus tipo II.

Además, la ruptura del metabolismo homeostático de la glucosa-insulina altera la fisiología de los vasos sanguíneos induciendo aterogénesis como primer paso hacia el desarrollo de aterosclerosis y las enfermedades coronarias, tales como el infarto agudo de miocardio y cerebrovasculares como el accidente vasoencefálico popularmente conocido como derrame cerebral. Además, los estudios epidemiológicos sugieren que la obesidad también aumenta el riesgo de desarrollo de neoplasias. Estos últimos datos indican la urgente necesidad de desarrollar modalidades terapéuticas eficaces para la prevención y el tratamiento de la obesidad.

2.2.2 Obesidad y glucocorticoides

El eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal también parece tener un papel importante en la obesogénesis. Esto se debe a que la obesidad provoca la disfunción metabólica sistémica generando una respuesta endocrina al estrés relacionada con el cortisol, que también tiene un gran impacto en el organismo principalmente en relación con la obesidad visceral.^{54,55}

Esta afirmación se basa en la evidencia de que una condición de estrés corporal caracterizada por concentraciones elevadas de glucocorticoides es necesaria para el desarrollo y la diferenciación de preadipocitos en adipocitos.⁵⁶

Estudios adicionales han demostrado una correlación entre el aumento de la tasa de producción de cortisol y la expresión de la enzima 11β -HSD-1 con el desarrollo de adiposidad visceral y resistencia a la insulina en hombres.⁵⁷ Además, se ha descrito la asociación entre obesogénesis y la mayor expresión de la enzima 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β -HSD), que cataliza la conversión de cortisol inactivo (cortisona) para cortisol activo (11β -HSD1 activo) o viceversa (es decir, cortisol activo hacia inactivo, 11β -HSD2). Esta enzima regula las acciones locales de los glucocorticoides, y su expresión es específica de tejido.⁵⁸ Otros estudios en ratones demostraron que la obesidad y la resistencia a la insulina inducida por la dieta se reduce en animales que no producen la enzima 11β -HSD1. Por otra parte, los animales con exceso de producción de esta molécula desarrollan fenotipos obesos con mayor facilidad.^{59,60,61} Los estudios en seres humanos obesos también han referido resultados similares^{62,63} que sugieren que la capacidad de regular la actividad de la enzima 11β -HSD se pierde en los pacientes con diabetes tipo II y también resulta debilitada en obesos no diabéticos.⁶⁴

La obesidad central se asocia con varias alteraciones periféricas en la producción y el metabolismo de cortisol, incluyendo un aumento en su aclaramiento, anormal rotación (*turnover*) y alteración de su metabolismo en el tejido adiposo, especialmente visceral. Esta desregulación está relacionada con la presencia de algunos neurotransmisores y con las condiciones ambientales, especialmente las relativas a la nutrición. La obesidad central se caracteriza por un aumento de la producción de cortisol, debido a la hiperactivación del eje hipotálamo-adrenal (HPA) mediante retroalimentación positiva. La presencia de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo, por ejemplo IL-6, también contribuye a la activación del HPA.

França et al. (2003)⁶⁵ evaluaron por fluorimetría la cantidad de cortisol en la orina de 455 pacientes obesos (IMC>30), con seguimiento en el ambulatorio de Obesidad y Enfermedades Metabólicas del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo (HC-FM-USP), y encontraron que el 11,6% presentaba concentraciones de cortisol urinario superiores a 300 µg/24 horas. El índice de hipercortisoluria encontrado en esta población fue mayor que otros resultados de la literatura y se relaciona con niveles más altos de índice de masa corporal.

Pasquali et al. (2006)⁶⁶ demostraron que la privación de alimentos (en ayunas) estimula las regiones del hipotálamo responsables de la activación de las neuronas que producen hormona liberadora de corticotropina (CRH), lo que aumenta la producción de cortisol especialmente en individuos obesos. En el estudio se encontró que la privación de alimentos conduce a la activación de áreas del cerebro que incrementan la producción de cortisol para intervalos entre ingestión de alimentos superiores a tres horas. Estos datos muestran la importancia de la frecuencia de las comidas cada tres horas para la prevención del tratamiento de la obesidad.⁶⁷

El hipercortisolismo también pueden mediar la actividad ingestiva compulsiva puesto que las neuronas secretoras de neuropéptido Y (NPY) en el núcleo arqueado del hipotálamo son ricas en receptores de glucocorticoides. Otro factor importante para la regulación de la concentración de cortisol es el aumento de la actividad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-1 responsable de la conversión de corticosterona inactiva en cortisol. Así, el estrés crónico también representa una amenaza prolongada a la homeostasis, pudiendo progresivamente conducir a un estado pro-obesogénico. También es importante mencionar que la sobrealimentación es capaz de inducir estrés endocrino crónico pudiendo alterar el equilibrio entre la función metabólica y la respuesta inmune. Esta condición es probable que contribuya al desarrollo de la obesidad visceral, diabetes tipo II, aterosclerosis y síndrome metabólico.⁶⁸

2.2.3 Obesidad, sistema inmunitario e inflamación

Se han descrito una amplia gama de proteínas farmacológicamente activas de peso molecular relativamente bajo, denominadas citoquinas, que son secretadas por una célula con el propósito de alterar sus propias funciones (efecto autocrino) o las de las células adyacentes (efecto paracrino). En muchas situaciones las citoquinas individuales tienen múltiples actividades biológicas.⁶⁹

Citoquinas diferentes pueden tener la misma actividad, lo que proporciona una redundancia en los sistemas biológicos inflamatorios y las reacciones inmunes. Como resultado de ello, es raro que la pérdida o la neutralización de una citoquina interfiera notablemente con cualquiera de estos sistemas. Este hecho tiene gran importancia en el desarrollo de estrategias terapéuticas.

En cuanto al tejido adiposo, sólo se ha estudiado un pequeño número de citoquinas, en particular el factor de necrosis tumoral

TNF- α y varias interleuquinas (IL) como IL-1, IL-6 e IL-8. Afortunadamente, parece existir una jerarquía de citoquinas, de modo que citoquinas de "orden superior" como el TNF- α , organizan la síntesis, secreción y actividad de otras citoquinas. Con referencia a su papel en el tejido adiposo es importante conocer:

- 1) la regulación de la producción de citoquinas en el tejido adiposo,
- 2) los efectos de las citoquinas en el tejido adiposo,
- 3) el posible papel de las citoquinas como agentes de señalización intercelular producidas por el tejido adiposo.

La asociación de la inflamación con la obesidad ya fue sugerida en los estudios epidemiológicos realizados desde los años 50, aunque los mecanismos subyacentes a este proceso han permanecido desconocidos durante muchas décadas. Así, hoy en día se considera que la obesidad está asociada con una activación crónica del sistema inmune innato y, posteriormente, puede dar lugar a resistencia a la insulina, disminución de la tolerancia a la glucosa o diabetes.

2.2.3.1 TNF- α

El descubrimiento inicial de la molécula TNF- α abrió perspectivas para la identificación de otras moléculas producidas por el tejido adiposo que también tienen función inmune.

El factor de necrosis tumoral TNF- α fue descrito por primera vez como un factor sérico inducido por endotoxinas que causa necrosis tumoral tras infección bacteriana aguda.⁷⁰ Sin embargo, esta citoquina también está involucrada en la inflamación, enfermedades autoinmunes, tumorigénesis, metástasis, replicación viral, shock séptico y fiebre. Posteriormente, el TNF- α se vio que era

idéntico a la caquectina ⁷¹, que se encuentra en el sobrenadante de cultivo de macrófagos expuestos a endotoxinas. ^{72, 73}

Hoy en día, el TNF- α es reconocido como un regulador de multifuncional de las citoquinas implicadas en inflamación, apoptosis y supervivencia celular, citotoxicidad, producción de otras citoquinas como IL-1 e IL-6, y la inducción de resistencia a la insulina en una variedad de situaciones clínicas. El TNF- α se sintetiza como un monómero de 26 kDa ligado a la membrana plasmática. ⁷⁴

Dos tipos de receptores de TNF- α , tipo I y tipo II, median en la transducción de la señal del TNF- α por la formación de complejos proteicos con proteínas adaptadoras citoplasmáticas ⁷⁵. Hotamisligil et al. (1993) ⁷⁶ informaron de que tanto los niveles de RNAm como de proteína de TNF- α estaban altamente inducidos en el tejido adiposo de animales ⁷⁶ y humanos obesos. ⁷⁷

Aunque el tejido adiposo está compuesto por una variedad de tipos celulares, incluyendo adipocitos, células del estroma, células inmunitarias, y células endoteliales vasculares, que son capaces de producir citoquinas, los adipocitos son la principal fuente de TNF- α , ^{78,79} y expresar los dos tipos de receptores de TNF.

Posteriores investigaciones revelaron que a largo plazo la exposición de cultivos celulares ⁸⁰ o animales ⁸¹ a TNF- α induce resistencia a la insulina, mientras que la neutralización de TNF- α en ratas Zucker fa/fa durante 3 días aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce la hiperinsulinemia ⁸². El TNF- α es producido en el estroma del tejido adiposo, principalmente por los macrófagos, y se observa un aumento significativo en el número de macrófagos agregados en el tejido adiposo visceral, sobre todo en la obesidad.

Así, la grasa visceral, sobre todo en la obesidad, es la principal fuente de TNF- α . Muchos estudios han demostrado que el TNF- α está más correlacionado con la grasa omental que con la

grasa subcutánea.^{83,84} Pero al mismo tiempo, se han publicado resultados contradictorios acerca de las diferencias en la expresión de TNF- α en el tejido subcutáneo o visceral.⁸⁵

2.2.3.2 *Interleucina 6*

El tejido adiposo es el lugar de producción de varios factores pro-inflamatorios como la interleucina 6 (IL-6).^{86,87,88}

El término interleucina describió originalmente una proteína derivada de leucocitos con actividad sobre otros leucocitos. Ahora se entiende que tanto las células inmunes como las no inmunes sintetizan interleucinas y otras citoquinas, que presentan diversas actividades biológicas. La interleucina-6 se considera como una citoquina inducida por el estrés, así como un mediador inflamatorio con efectos pleiotrópicos sobre una variedad de tejidos, incluyendo la estimulación de la síntesis de proteínas de fase aguda y el aumento de la termogénesis, junto con un aumento de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario.^{89,90}

Se ha publicado que los cultivos de tejido adiposo secretan IL-6, y su ARNm se ha observado en los adipocitos.^{91,92} Asimismo, la concentración plasmática de citoquinas puede ser modificada en proporción a la masa grasa.⁹³ Sin embargo, la proporción de IL-6 producida exclusivamente por las células adiposas parece ser tan sólo el 10% del total de producción de citoquinas. Aproximadamente un tercio de la concentración total de IL-6 se estima que procede del tejido adiposo.⁹⁴

2.2.3.3 *Interleucina 1*

Otra interleucina importante es la interleucina 1 (IL-1). La principal actividad de la IL-1 es la mediación en la inflamación. Asociado con el TNF induce la respuesta de fase aguda de infección o daño tisular. La IL-1 se produce por los monocitos y macrófagos. Su acción más importante en la inflamación se debe a los efectos

sobre el endotelio, leucocitos y fibroblastos, así como la inducción de reacciones de fase aguda.

En el endotelio, la IL-1 induce diversos cambios, la mayoría relacionados con el nivel de transcripción de genes para la síntesis de moléculas de adhesión endotelial, mediadores químicos como otras citoquinas y factores de crecimiento y óxido nítrico, producción de enzimas asociadas con la remodelación de las células madre, y aumento de la superficie trombogénica endotelial.

Esta actividad específica de la IL-1, también desencadenada por los monocitos, tiene mucho que ver con la regulación de la leucopoesis durante un proceso infeccioso. La IL-1 actúa junto con los fibroblastos y las células endoteliales estimulando la secreción de factores de crecimiento de granulocitos, macrófagos y monocitos. Además, posibilita la liberación de factor de necrosis tumoral, que estimulará los linfocitos para producir anticuerpos específicos.^{95,96}

2.2.3.4 Interferón gamma

El interferón gamma (IFN- γ) es un actor importante en el sistema inmunológico, dado que la expresión aberrante de IFN- γ se asocia con una serie de enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias. Es la principal citoquina que estimula los macrófagos y la inmunidad celular.⁹⁷

El IFN- γ , interferón o tipo II, es una citoquina que es crucial para la inmunidad innata y adaptativa frente a virus e infecciones bacterianas intracelulares y para controlar el tumor.^{98,99} La importancia de IFN- γ en el sistema inmunológico se debe en parte a su capacidad para inhibir la replicación viral directamente, y más importante de sus efectos inmunoestimulantes e inmunomoduladores.

IFN- γ tiene propiedades antivirales, inmunomoduladoras y antitumorales. Se altera la transcripción de 30 genes que producen

una variedad de respuestas celulares y fisiológicas. Sus efectos principales inciden en el aumento de la presentación de antígenos por los macrófagos, activación y aumento de la actividad lisosomal en los macrófagos, supresión de la actividad de las células Th2, promoción de la adhesión a la necesaria y obligatoria para la migración de los leucocitos, aumento de la actividad de las células NK, y activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).¹⁰⁰

En relación al tejido adiposo, se ha propuesto que el IFN- γ , interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria que acompaña a la obesidad.¹⁰¹ Ratones obesos deficientes en IFN- γ presentaban significativamente menor expresión de genes inflamatorios como TNF- α y proteína quimioattractora de monocitos-1, con un descenso en la acumulación de células inflamatorias AT y mejor tolerancia a la glucosa que los animales control mantenidos con la misma dieta.¹⁰¹

2.2.3.5 Interleucina 10

Por otro lado, existen otras citoquinas que actúan exactamente en la dirección opuesta, es decir, inhibiendo la producción de células de defensa productoras de inflamación o inhibiendo la producción de citoquinas que estimulan la inflamación. Las más conocidas de este tipo incluyen la interleucina 10 (IL-10) y la interleucina-13 (IL-13), son llamadas citoquinas antiinflamatorias. La interleucina10, producida por los linfocitos, tiene notables propiedades anti-inflamatorias, tales como la capacidad de inhibir la producción de TNF e interleuquinas IL-1, IL-6 yIL-8. Esto representa una reducción sustancial de la intensidad del proceso inflamatorio.^{102,103,104}

La interleucina 10 (IL-10) tiene un papel importante en el control homeostático de la respuesta inmune innata y la inmunidad celular. Su función es inhibir la producción de IL-12 y TNF- α por macrófagos activados, pero también inhibe la expresión de

moléculas co-estimuladoras y el complejo mayor de histocompatibilidad MHC clase II en los macrófagos¹⁰⁵, y estimula la proliferación de cultivos de células B humanas.¹⁰⁶

IL-10 es una citoquina secretada por macrófagos activados y linfocitos. Se ha demostrado una baja producción de IL-10 en la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes tipo II. IL-10 es sensible a la insulina, las células anti-inflamatorias y endoteliales como antagonista de TNF- α y IL-6.^{107,108} En un estudio que incluyó 184 niños con obesidad y apnea del sueño obstructiva, se encontró correlación negativa entre las concentraciones de IL-10 y el índice de masa corporal.¹⁰⁹ La reducción de la concentración de IL-10 en pacientes con obesidad es un factor de riesgo importante para la resistencia a la insulina, la inestabilidad de la placa aterosclerótica y la isquemia coronaria aguda.¹¹⁰

2.2.3.6 Obesidad e inflamación

Las concentraciones plasmáticas de moléculas inflamatorias tales como la proteína C-reactiva, el amiloide A sérico, el fibrinógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 están elevadas en pacientes obesos.^{111,112} En el estado obeso el tejido adiposo está infiltrado por macrófagos, que son en parte responsables de modificar el estado inflamatorio asociado a dicha situación.^{113,114} En condiciones fisiológicas, el tejido adiposo produce una cantidad relativamente grande de TNF- α . Sin embargo, sólo una pequeña parte de estas moléculas procede de los adipocitos, siendo la mayor parte sintetizada por los macrófagos infiltrados en el tejido.¹¹⁵ La cantidad de TNF- α secretada por el tejido adiposo ha sido objeto de gran debate. Aunque el TNF- α producido por el tejido adiposo no es secretado directamente a la circulación sistémica, pues actúa de modo autocrino, se ha descrito una asociación entre las concentraciones plasmáticas de TNF- α y la obesidad.¹¹⁶

Una serie de estudios a partir de estos resultados iniciales mostraron que la administración de TNF- α impedía la acción de la insulina en las células y participaban en el desarrollo de resistencia a la insulina.^{117,118,119}

Estos resultados fueron confirmados por estudios experimentales en ratones obesos que fueron genéticamente incapaces de expresar TNF- α y que mostraron una mejoría significativa en el perfil fisiológico de resistencia a la insulina.¹²⁰

Por lo tanto, se puede decir que todas estas investigaciones sugieren que el denominador común en la patogénesis de las comorbilidades de la obesidad es la presencia de un proceso inflamatorio activo, crónico y de bajo grado que se presenta principalmente en los tejidos que son importantes para el metabolismo de la energía, como son el tejido adiposo, el hígado, el músculo y el endotelio. Esta propuesta se ve apoyada por las evidencias epidemiológicas que han vinculado la obesidad y la diabetes tipo II con la inflamación desde hace más de 100 años.¹²¹

Por lo tanto, la etiopatogenia de la obesidad parece implicar una condición inflamatoria crónica que tiene especificidades diferenciales en comparación con otros tipos de procesos inflamatorios del cuerpo. Además, la evidencia clínica muestra que la obesidad provoca importantes disfunciones inmunes al reducir el número de células asesinas naturales (*natural killer*, NK), linfocitos T y neutrófilos en los pacientes obesos.^{122,123} Sin embargo los mecanismos moleculares que subyacen a esta asociación comenzaron a ser investigados tan sólo desde los años 90 y aún no están totalmente dilucidados.^{124,125}

Se ha propuesto que el proceso de pre-diferenciación de adipocitos se caracteriza por una gran plasticidad, lo que se reflejaría en su capacidad de transdiferenciarse.^{126,127} Esto significa que los adipocitos almacenados en diversas partes del cuerpo

pueden tener diferencias en el fenotipo inflamatorio. Los estudios sugieren pues que los adipocitos que componen la grasa visceral expresan un fenotipo más maligno en términos de pérdida de la homeostasis y de evolución de disfunciones fisiológicas y morbilidades como la aterosclerosis y diabetes tipo II, que las células adiposas constitutivas de los depósitos grasos subcutáneos. De este modo, cuando la grasa visceral es eliminada del cuerpo se produce una inversión del estado inflamatorio asociado a la obesidad.¹²⁸

La secreción de factores pro-inflamatorios por el tejido adiposo y, más importante aún, la regulación de su secreción por el aumento de la adiposidad otorga un mayor apoyo a la hipótesis de una inflamación continua de bajo grado durante la obesidad. Por otra parte, la identificación de cambios similares en la expresión de estos factores en la circulación sistémica de los pacientes con obesidad proporciona un estímulo adicional para continuar la investigación sobre los mecanismos subyacentes relacionados con el desarrollo de la inflamación de la obesidad. Se han identificado por ejemplo receptores inmunes innatos como los receptores de tipo Toll (TLR4 y TLR2) en el tejido adiposo, y su expresión se ve inducida notablemente en individuos obesos.^{129, 130}

La unión de los ácidos grasos libres al TLR4 conduce a la inducción de la cascada de eventos que desemboca en la activación del sistema I κ B/NF κ B y la quinasa Jun N terminal (JNK) y la posterior inducción de factores pro-inflamatorios. Los análisis derivados de ratones genéticamente deficientes en la producción de TLR4 mostraron que, incluso ante una dieta inductora de obesidad, tales ratones no presentan signos fisiológicos de inflamación.¹³¹

Las citoquinas proinflamatorias que se expresan por los adipocitos también pueden ser producidas por los macrófagos infiltrados en el tejido conectivo (estroma) que rodea a estas células. Por lo tanto, para diferenciar estas moléculas como citoquinas específicas producidas por los adipocitos se denominan

colectivamente adipocinas. Recientemente se demostró que los efectos antiinflamatorios de las estatinas en el tejido adiposo son también mediados por receptores inmunes innatos expresados a nivel local.¹³²

Juge-Aubry et al. (2003)¹³³ demostraron que el tejido adiposo, tanto subcutáneo como visceral, de los individuos obesos produce grandes cantidades de interleucina 6 (IL-6), receptor antagonista de la interleucina 1 (IL-1ra) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), cuya secreción puede ser inducida por estímulos inflamatorios, tales como aumento de la producción de PGE2 y LTB4 y las concentraciones plasmáticas de proteína C-reactiva (PCR), así como por factores asociados con la obesidad.¹³⁴ Cuanto mayor sea el índice de masa corporal (IMC), mayor la concentración de PCR en el plasma. Los valores encontrados para hombres y mujeres con IMC<25 son de 0,40 mg/dl; con IMC comprendido entre 25 y 30, 1,28 mg/dl en mujeres y 0,84 mg/dl en hombres; con IMC>30 se han medido 1,16 mg/dl en mujeres.

Los estudios también han demostrado que estas citoquinas pro-inflamatorias y el aumento de los ácidos grasos intracelulares tienen la capacidad de inhibir la fosforilación de la tirosina de los sustratos del receptor de la insulina (IRS-1) en adipocitos y hepatocitos. Esto se debe a que estas sustancias fosforilan un residuo de serina del IRS-1, que a diferencia de la fosforilación de la tirosina (que permite la transmisión de la señal de la insulina), bloquea la acción intracelular de la insulina, impidiendo la internalización de la glucosa en las células.¹³⁵ Una vez que se fosforila la serina, los sustratos IRS-1 pasan a tener baja afinidad por el receptor de la insulina.

Por lo tanto, cuando hablamos hoy de obesogénesis se entiende que se trata de un proceso inflamatorio innato diferenciado que genera y se retroalimenta por importantes alteraciones

metabólicas y funcionales, sobre todo la resistencia a la insulina y la hipertensión.

2.2.4 Obesidad, control de la ingestión y metabolismo basal

El requisito básico para el metabolismo celular, y por ende el funcionamiento orgánico en su conjunto, es el comportamiento ingestivo, que se refiere a la adquisición por parte del cuerpo de las materia primas esenciales y de las fuentes de energía a partir del medio ambiente. Como requisito previo para la supervivencia, todo organismo heterótrofo debe conseguir el alimento de su entorno en una cantidad suficiente como para satisfacer su gasto de energía.

A fin de mantener los niveles de energía para la supervivencia existen una serie de mecanismos que provocan el estado fisiológico que conduce a un animal o un ser humano a manifestar el comportamiento ingestivo. Este estado se denomina genéricamente como fase apetitiva del comportamiento (hambre), al que sigue una fase de búsqueda y una fase consumatoria en la que se efectúa la ingestión del alimento. Por otro lado, a consecuencia del estado fisiológico que indica que el organismo ha ingerido suficiente cantidad de energía para el mantenimiento aparece la fase de saciedad ¹³⁶ Se permiten pequeñas variaciones, como por ejemplo, el que una persona pierda una comida, sin mayores consecuencias. Los cambios en el proceso de adquisición de alimentos (apetito/saciedad) que van más allá de las fluctuaciones aceptables en el peso del individuo acarrearán estados patológicos.

La ingesta de alimentos, cuando es excesiva, provoca obesidad, y cuando es insuficiente determina desnutrición e incluso la muerte. A principios del siglo pasado predominaba la denominada teoría periférica de la conducta alimentaria, que consideraba que el hambre estaba causada por sensaciones periféricas, especialmente

en relación con las contracciones del estómago. Por lo tanto, los defensores de esta idea concluían que la sensación consciente de hambre era en principio proveniente de la estimulación sensorial causada por estas contracciones. Una persona sentiría saciedad cuando el estómago estuviese distendido y se hubiesen detenido las contracciones. Sin embargo, a lo largo de los años fueron surgiendo evidencias en contra de esta idea. Entre ellos se destacaron dos: 1) en los animales vagotomizados (y por tanto con desafereciación sensorial del tracto digestivo), la inyección de insulina provocaba un aumento en la ingestión de alimentos, 2) tanto hombres como animales con el estómago extirpado podían manifestar un consumo regular de alimentos.

Estas evidencias favorecieron la idea de que el control de la conducta ingestiva podría tener lugar en el sistema nervioso central, dando paso a la teoría centralista. Esta teoría se basa en experimentos que demostraron que el hipotálamo ejerce un claro control sobre la el comportamiento ingestivo. Dos núcleos dentro de esta compleja estructura parecían estar activamente involucrados en la regulación del apetito en los mamíferos: el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN) y el área hipotalámica lateral (HLA), que fueron denominados el centro de la saciedad y el centro del hambre, respectivamente.

La idea de que estas regiones del hipotálamo pueden actuar como zonas contrapuestas para la regulación de la alimentación, aunque conceptualmente atractiva, está actualmente superada. A pesar de la clara implicación de numerosos núcleos hipotalámicos y troncoencefálicos en la regulación de la conducta ingestiva, y de las relaciones entre la ingestión y los centros hedónicos del sistema límbico, el cerebro en su totalidad no parece que esté organizado en centros aislados que controlen funciones específicas. En realidad, las funciones individuales se realizan por circuitos neuronales distribuidos en varias estructuras cerebrales. Por lo tanto, se cree

que la regulación de la homeostasis energética y el mantenimiento del peso corporal en los seres humanos son procesos muy complicados que implican sistemas de regulación que, en conjunto, pueden contribuir a la patogénesis de la obesidad. La responsabilidad del control de la homeostasis de la energía se reparte entre las diferentes regiones del hipotálamo y del tronco encefálico que interactúan entre sí en complejos circuitos involucrando varios niveles de neurotransmisores que dan como resultado la regulación del apetito y del peso corporal. Estos circuitos se componen de redes interconectadas de señales orexigénicas y anorexigénicas producidas por neuronas que propagan o atenúan los impulsos que estimulan e inhiben el apetito y la homeostasis de la energía, y modulan las hormonas y moléculas biológicamente activas que participan en estas interconexiones.

La existencia y liberación de señales orexigénicas, junto con la interconexión de las vías orexigénicas y anorexigénicas en el hipotálamo, proporcionan un entorno más favorable a la hiperfagia que a la anorexia. Los mecanismos de regulación son activados por las rutas multisinápticas que permiten la restricción de las señales anorexigénicas y la activación de las señales orexigénicas cuando se siente hambre. Una vez producida la saciedad, las señales orexigénicas son inactivadas por las anorexigénicas.¹³⁷

Las ideas admitidas en la actualidad acerca de la modulación del apetito y la saciedad, así como del metabolismo basal, que aumenta o disminuye el gasto energético del organismo, incluyen una interacción entre el sistema nervioso central y el tejido adiposo a través de la expresión de hormonas y otras importantes moléculas reguladoras. Las funciones de las moléculas clave que participan en este proceso y que parecen estar alteradas en los estados obesogénicos se mencionan brevemente a continuación, especialmente referidas a la leptina, la grelina, el neuropéptido Y, la serotonina y la adiponectina.

Dada la fuerte asociación entre el exceso de ingesta de calorías y la obesidad, la naturaleza del control del apetito y la saciedad, así como la regulación del metabolismo energético basal, también ha sido un tema ampliamente estudiado en los últimos años. Ciertamente estos estudios sufrieron una revolución en 1994, cuando el grupo de investigación coordinado por el Dr. Friedman, de la Universidad de Columbia, Nueva York, consiguió clonar el gen de la leptina. La leptina tiene propiedades y funciones hormonales y se manifiesta como un polipéptido de 167 aminoácidos codificado por el gen *ob* y expresado principalmente por los adipocitos.

El aislamiento de la leptina en 1994 por Zhang et al.¹³⁸ transformó nuestras ideas sobre el papel biológico del tejido adiposo en el mantenimiento del balance energético. Se puso de manifiesto que el tejido adiposo no es un sitio aislado de almacenamiento de lípidos, sino que participa en la regulación de la homeostasis energética y se comunica activamente con los demás participantes en este proceso, como hígado, músculo, e hipotálamo.

La función principal de la leptina es actuar como señal del estado de energía del cuerpo actuando a través de receptores específicos expresados en diversos tejidos además del adiposo. Funcionalmente, la leptina actúa como un factor de señalización entre el tejido adiposo y el sistema nervioso central para regular la ingesta de alimentos y el gasto energético del cuerpo. En consecuencia, la concentración circulante de leptina refleja directamente la cantidad de masa adiposa blanca corporal. La acción de la leptina en el sistema nervioso central (hipotálamo) promueve la reducción de la ingesta de alimentos y hace aumentar el gasto energético, además de regular la función neuroendocrina y el metabolismo glucídico y lipídico.¹³⁹

Otros estudios también mostraron que la leptina interviene en otras importantes funciones fisiológicas tales como la hematopoyesis, la actividad gastrointestinal, el transporte de

moléculas por la placenta, etc.^{140,141} La leptina también interviene en las respuestas de los linfocitos T regulando la proliferación de los linfocitos T vírgenes y los linfocitos T de memoria.¹⁴²

La acción de la leptina se realiza mediante la unión y la activación de receptores específicos presentes en los tejidos diana. Hay dos tipos de receptores para la leptina, el receptor OBRb, de cadena larga, expresado mayoritariamente en el hipotálamo, y los receptores de cadena corta, OBRa, que se encuentran en otros órganos como el páncreas y más específicamente en las células de los islotes de Langerhans.¹⁴³

El máximo de liberación de leptina se produce durante la noche y en las primeras horas de la mañana, y su vida media en plasma es de 30 minutos.^{144,145} Sin embargo, la expresión de leptina es modulada por diversas sustancias, como la insulina, los glucocorticoides y las citoquinas proinflamatorias. Estados infecciosos y endotoxinas también pueden aumentar la concentración plasmática de leptina. Por el contrario, la exposición a la testosterona, al frío y las catecolaminas reducen la síntesis de leptina. Las situaciones de estrés que se imponen al cuerpo, tales como el ejercicio prolongado, ayuno y fatiga, provocan una disminución en la concentración circulante de leptina, lo que demuestra las acciones de inhibición del sistema nervioso central respecto a la liberación de leptina por los adipocitos.¹⁴³

La leptina actúa en la reducción del consumo de alimentos mediante la inhibición de la formación de los neuropéptidos relacionados con el apetito, como el neuropéptido Y, y también mediante el incremento en la expresión de neuropéptidos anorexigénicos: hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y el péptido relacionado con la anfetamina y la cocaína (CART).¹⁴⁶ Por lo tanto, concentraciones elevadas de leptina reducen la ingesta de alimentos, mientras que bajas concentraciones inducen hiperfagia.

Esto queda demostrado en animales de laboratorio obesos con concentraciones bajas de leptina o deficiencia total de esta hormona.

Sin embargo, la obesidad también puede ser caracterizada por la resistencia a la leptina, lo cual promueve un círculo vicioso de "regulación" de la homeostasis de la energía asociada con esta afección.¹⁴⁷ Las personas obesas presentan concentraciones plasmáticas elevadas de leptina, aproximadamente cinco veces mayor que las encontradas en sujetos delgados.¹⁴⁸ En este caso, también hay diferencias en las concentraciones de leptina relacionadas con el sexo porque las mujeres tienen mayores concentraciones de leptina en plasma que los hombres. Estos contrastes indican que los mecanismos que controlan el metabolismo y el peso corporal en los seres humanos son más complejos de lo imaginado, y son necesarios nuevas investigaciones relacionadas con el sexo y la especie.

Los estudios en humanos, sin embargo, indican que la leptina es un medio de evaluar la cantidad de energía almacenada en forma de grasa¹⁴⁸, debido a que su mayor concentración se encuentra precisamente en las personas obesas. Es producida por los adipocitos y secretada por el tejido adiposo blanco hacia la circulación, por lo que se puede medir mediante el análisis de radioinmunoensayo.¹⁴⁹

Diversas investigaciones en animales y estudios clínicos han demostrado que la hiperleptinemia observada en las personas obesas se atribuye a cambios en el receptor de leptina o a una deficiencia en su sistema de transporte en la barrera hematoencefálica, un fenómeno conocido como resistencia a la leptina, similar al que ocurre en la diabetes mellitus tipo II. Esto puede atribuirse a que el aumento de la leptina plasmática se correlaciona positivamente con el aumento de la insulina plasmática, del porcentaje de grasa y del IMC.¹⁴⁸

Sin embargo, la falta de producción de leptina o la producción anormal de esta hormona no es una causa primaria de la obesidad en humanos.¹⁴⁸ Por otra parte, no hay pruebas de que la obesidad en los seres humanos sea causada por la presencia anormal de receptores de leptina.¹⁴⁸ La hipótesis principal es que la causa de la mayor concentración de leptina en plasma en individuos obesos se debe a la disminución de la respuesta de la señal a los receptores del gen Ob en el hipotálamo, por lo que estos receptores son insensibles a la leptina endógena y ello conduce a un estado de resistencia a la leptina.¹⁵⁰

La contribución directa de la resistencia a la leptina en la obesidad asociada con la inflamación no ha sido aún aclarada. Tras el descubrimiento de la leptina han sido identificadas otras adipoquinas, siendo las más abundantemente expresadas la resistina, la visfastina y la adiponectina.¹⁵¹ La concentración plasmática de adipoquinas en los seres humanos refleja el grado de su obesidad. Se han descrito propiedades inmunomoduladoras, pro- o anti-inflamatorias para las adipoquinas, aunque no está claro cómo se relacionan los cambios en la expresión con el desarrollo de la inflamación en la obesidad. El tejido adiposo expresa neuropéptidos y/o sus receptores específicos, como es el caso de la angiotensina, el neuropéptido Y (NPY) y los receptores de NPY.^{152,153} Se ha sugerido que la actuación del NPY en el tejido adiposo está involucrada en el desarrollo del síndrome metabólico.¹⁵⁴ Además, se han demostrado receptores funcionales para las orexinas en el tejido adiposo ya que la estimulación con orexinas origina la activación de PPARc y la inhibición de la lipasa sensible a hormonas.¹⁵⁵

Con todo, los cambios en el tejido adiposo dan como resultado cambios concomitantes en las concentraciones séricas de leptina. Los cambios en la ingesta de calorías, como el ayuno y la sobrealimentación pueden cambiar la concentración de leptina en

ausencia de cambios en el tejido adiposo. Por lo tanto, la leptina es considerada una hormona directamente asociada con la obesidad.

Otra hormona de gran importancia en el control de la ingestión de alimento y relacionada con la obesidad es la grelina. La grelina es una hormona gastrointestinal que se identificó hace poco más de diez años en el estómago de ratas.^{156,157} El nombre proviene de la palabra *ghre*, que en la lengua proto-indoeuropea es correspondiente al término inglés *grow*, crecimiento.¹⁵⁷

La grelina es un pequeño péptido compuesto por 28 aminoácidos con una modificación peculiar consistente en la incorporación de un radical octanoilo al grupo hidroxilo de la serina 3, que es esencial para el desempeño de sus funciones. Fue aislada por primera vez de la mucosa oxíntica del estómago, y se produce principalmente por las células Gr del tracto gastrointestinal. También se produce en pequeñas cantidades en el sistema nervioso central, riñón, corazón y placenta.¹⁵⁸

La liberación de grelina endógena se reduce después de la ingesta de alimentos, volviendo poco a poco a los valores basales cerca del final del período posprandial. De acuerdo a una revisión de Romero et al. (2006),¹⁵⁹ los estudios efectuados acerca de la liberación de esta hormona en humanos muestran que son los tipos de nutrientes en la comida, y no su volumen, los responsables del aumento o disminución de la concentración plasmática postprandial de la grelina. La concentración plasmática de grelina se reduce después de las comidas ricas en hidratos de carbono, junto con la elevación de la concentración plasmática de insulina. Por otra parte, se encuentra aumento de la concentración de grelina después de comidas ricas en proteína animal y lípidos, relacionadas con pequeños aumentos de insulina en plasma.¹⁶⁰

Existen evidencia de que los efectos orexigénicos de la grelina están mediados por la actividad del neuropéptido Y (NPY) en

el hipotálamo en el sentido de que el NPY estimula la liberación de la grelina en el estómago, que aumenta la ingesta de alimentos por las personas obesas.¹⁶¹

Shiia et al. (2002)¹⁶² mostraron que el ayuno aumenta la concentración plasmática de grelina, coincidiendo con el inicio de la ingesta de alimentos. Durante el día esta concentración aumenta y disminuye de acuerdo a la ingestión. Aunque la concentración de esta hormona se reduce en el estado postprandial, esto no ocurre en individuos obesos, lo que sugiere que estas personas presentan una disregulación en la actividad funcional de la grelina y en la liberación de neurotransmisores de saciedad. Además, los estudios muestran que la concentración de grelina en individuos obesos no disminuye después de la ingestión de alimentos, como sucede con los individuos no obesos.

Esta disregulación en la producción de grelina podría, en parte, incrementar aún más el peso de esta población.¹⁶³ A pesar de que la glucosa sérica regula la grelina, el contacto de los nutrientes con las células del estómago (más que la utilización de sustratos) puede ser más importante para inhibir la liberación de grelina. Cummings et al. (2002)¹⁶⁴ encontraron que la curva de grelina era un 77% menor en pacientes sometidos a cirugía bariátrica en comparación con la observada en los no obesos, posiblemente debido a que la grelina se segrega en las células del estómago.

En este sentido, para comprender la dinámica de la modulación de la grelina es necesario caracterizar en profundidad la naturaleza funcional del neuropéptido Y. El NPY es un neuropéptido orexigénico miembro de la familia del polipéptido pancreático, que contiene 36 residuos de aminoácidos, y es el más potente agente orexigénico del sistema nervioso central.

En condiciones normales, está altamente expresado en los núcleos arqueado y paraventricular así como en el área hipotalámica

lateral. En el núcleo arqueado, regula no sólo su propia liberación, sino también de otras señales orexigénicas.¹⁶⁵

El NPY promueve la actividad enzimática lipogénica en el tejido adiposo, reduciendo la actividad del sistema nervioso simpático e inhibiendo la lipólisis. El NPY está involucrado en la ingestión compulsiva nocturna, el aumento de la cantidad de alimentos ingerido, el número de episodios de ingestión de alimentos, el tiempo dedicado a la ingestión, la velocidad de consumo de alimento y los intervalos entre episodios de ingesta alimentaria. Los esteroides gonadales y suprarrenales ejercen influencia moduladora en la síntesis y liberación de NPY. Los estrógenos promueven la neurosecreción del NPY, y existe asimismo una conexión entre las neuronas simpáticas del NPY y CRH. Por último, podemos decir que la resistencia a la insulina, una característica de algunos casos de obesidad, puede aumentar la actividad de neuropéptido. Tanto la disminución como el aumento de actividad del NPY desembocan en hiperfagia y obesidad.

Otro neurotransmisor que interviene en el sistema de control nervioso de la ingestión es la serotonina. Esta monoamina y sus agonistas son capaces de inhibir la ingesta de alimentos en el hipotálamo ventromedial. En los seres humanos se utiliza en el tratamiento de la obesidad puesto que intensifica la potencia saciante de los componentes de post-ingestión y post-absorción de los alimentos. Las bajas concentraciones de serotonina causan diversos tipos de psicopatologías, incluyendo depresión, suicidio, agresión, ansiedad y bulimia.

Los niveles adecuados de este neurotransmisor en el cerebro dependen de la ingesta alimentaria de triptófano (aminoácido precursor de la serotonina) y de carbohidratos, que aumentan la concentración de triptófano del cerebro y la síntesis y liberación de la serotonina. El triptófano es un aminoácido aromático que por la acción de la enzima triptófano hidroxilasa se convierte en serotonina.

Para que esta conversión se produzca correctamente se necesita una cantidad adecuada de ácido fólico, vitamina B₆ y magnesio, que aumentan la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa. La concentración de triptófano disminuyen con la edad, y una elevada concentración de triptófano inhibe la gluconeogénesis, aumenta la glucemia y la liberación de glucosa al cerebro (indicado en casos de hipoglucemia), a la vez que hace disminuir el apetito. Hombres y mujeres presentan cantidades similares de serotonina almacenada en el cerebro, pero la síntesis en hombres no obesos es un 52% más elevada que en mujeres delgadas. Esta notable diferencia puede ser un factor relevante, teniendo en cuenta la baja incidencia de depresión en hombres.¹⁶⁶ Por lo tanto, la serotonina también participa en el circuito del metabolismo de la energía asociada con la obesidad.

Otra importante molécula que está implicada en el control de la ingesta de alimentos y el metabolismo energético es la adiponectina. Esta molécula es un péptido de 244 residuos de aminoácidos, secretada sólo por el tejido adiposo como un producto del gen apM1, que se expresa en abundancia en el tejido adiposo blanco. A diferencia de la leptina, la concentración plasmática de adiponectina se ve reducida significativamente en los obesos en comparación con los individuos no obesos.¹⁶⁷ La concentración plasmática media de adiponectina es de 3,7 µg/mL en obesos, y 8.9 µg/ml en no obesos, siendo más elevada en mujeres que en hombres.

La adiponectina es la única proteína específica del tejido adiposo regulada negativamente por la obesidad. La concentración plasmática de adiponectina se correlaciona negativamente con el IMC, porcentaje de grasa, concentración de leptina, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, LDL-c y triglicéridos.¹⁶⁸ La hipoadiponectinemia está más correlacionada con el grado de

resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia que con la adiposidad o la intolerancia a la glucosa.

Fasshauer et al. (2002)¹⁶⁹ mencionan que la principal causa de hipoadiponectinemia en la obesidad es la resistencia a la insulina causada por el aumento de TNF- α en el tejido adiposo. La adiponectina puede aumentar la sensibilidad a la insulina mediante la inhibición de la producción y de la acción del TNF- α , lo que demuestra que ambos ejercen funciones antagónicas en el tejido adiposo. Por otra parte, la adiponectina puede potenciar la fosforilación de la tirosina de los sustratos del receptor de la insulina (IRS) en el músculo esquelético y aumentar la actividad de PKA, estimulando la fosforilación de las enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos. Otras acciones de la adiponectina incluyen la supresión de los macrófagos en la formación de células espumosas y la inhibición de la señalización endotelial a través del AMP cíclico.¹⁶⁸

En resumen, podemos afirmar que la obesidad es un estado alterado de alta complejidad fisiológica que induce importantes cambios en el metabolismo que a su vez incrementan la susceptibilidad a otros trastornos y enfermedades crónicas no transmisibles. Además de los factores descritos anteriormente, la obesidad se asocia directamente con un cuadro de desequilibrio oxidativo que será descrito a continuación.

2.3 Obesidad y estrés oxidativo

Las especies aerobias como los seres humanos utilizan el oxígeno para reaccionar con la glucosa y así permitir la generación eficiente de energía. Sin embargo, muchas vías metabólicas, y no sólo las relacionados con el oxígeno, generan moléculas altamente reactivas cuya producción y degradación debe ser bien controlada para que no causen daños significativos al organismo.

Se denominan radicales libres (RL) a las especies químicas que poseen un electrón no apareado en su órbita externa, lo que les confiere una elevada reactividad química.¹⁷⁰ Estas moléculas se forman de tres maneras: (i) por fisión homolítica de una unión covalente de una molécula reteniendo cada fragmento un par de electrones, (ii) por la pérdida de un solo electrón de una molécula, (iii) mediante la adición de un solo electrón a una molécula. Este último mecanismo, la transferencia de electrones, es el proceso más común en los sistemas biológicos, puesto que la fisión homolítica requiere mucha energía, luz ultravioleta o radiación ionizante.^{171,172,173} Son ejemplos de radicales libres el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}).

Además, bajo el término *especies reactivas del oxígeno* (EROs) se incluyen no sólo los radicales libres de O_2 , sino también algunos derivados no radicales, pero capaces de generar radicales libres de O_2 . Como ejemplo de EROs se pueden mencionar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), capaz de generar el radical hidroxilo OH^{\cdot} .^{174,175}

Las especies reactivas del oxígeno pueden provenir de fuentes exógenas o endógenas. Ejemplos de fuentes exógenas son las radiaciones ionizantes, el tabaco, determinados aditivos químicos y los pesticidas.¹⁷⁴

En una célula son cuatro las principales fuentes endógenas responsables de la generación de oxidantes: la reducción del oxígeno en las mitocondrias, la degradación de los ácidos grasos en los peroxisomas, la enzima citocromo P-450 y el proceso de fagocitosis.¹⁷⁵ La reducción del oxígeno en las mitocondrias requiere el transporte de cuatro electrones para cada molécula de oxígeno. Sin embargo, en alrededor del 5% de las veces el transporte de electrones es imperfecto, lo que resulta en la formación de EROs, en concreto, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} . Los peroxisomas producen H_2O_2 como subproducto de la oxidación de los ácidos grasos.

2.3.1 Especies reactivas de oxígeno producidas en el metabolismo

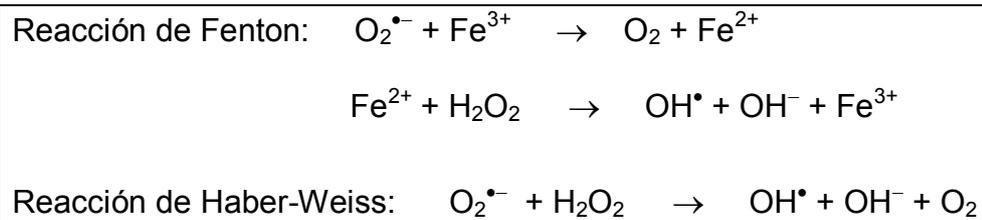
Puesto que el organismo produce EROs de forma constante en su metabolismo, es importante que las principales moléculas de EROs sean caracterizadas a fin de entender su función fisiológica y su acción potencialmente negativa sobre la homeostasis del organismo.

2.3.1.1 Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

En las células aeróbicas la más importante fuente de $O_2^{\cdot-}$ es la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias y el retículo endoplásmico.¹⁷⁶ En los organismos que utilizan respiración aerobia, el O_2 actúa como molécula aceptora de electrones en la cadena respiratoria, siendo reducido a H_2O . Sin embargo, bajo ciertas condiciones, el O_2 sólo acepta un electrón, lo que conduce a la formación de superóxido. Esta reducción anómala se produce principalmente a nivel de la acción de las enzimas fumarato reductasa, NADH deshidrogenasa y en presencia de flavoproteínas. El radical superóxido se considera también un compuesto intermedio de las reacciones catalizadas por oxidasas, entre ellas la glucosa oxidasa y la xantina oxidasa. Esta última puede generar superóxido *in vitro* y por esta razón se utiliza en pruebas de actividad de la enzima que pretendan evaluar los niveles de superóxido dismutasa.¹⁷⁷

El radical $O_2^{\cdot-}$ puede difundir a una distancia considerable antes de encontrar un posible objetivo crítico, lo que lo hace particularmente perjudicial.^{178,179} Su participación en los sistemas biológicos se descubrió en 1969 a raíz del descubrimiento de la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), una enzima que cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 .¹⁷⁶ En los organismos el $O_2^{\cdot-}$ participa en la reacción de Fenton generando oxígeno y hierro reducido, el

cual cataliza la reacción de Haber-Weiss formando el radical hidroxilo.^{180,181}



Se cree que la membrana mitocondrial, que se considera la principal fuente de radicales $O_2^{\bullet-}$, es impermeable a estas moléculas. Esta condición hace que el superóxido tiende a permanecer atrapado dentro de la mitocondria. Por lo tanto, es necesaria su degradación a fin de no causar perjuicios cito-funcionales.

El superóxido también reacciona con otras moléculas, como la enzima ribonucleótido reductasa, responsable de la producción de desoxirribonucleótidos. Esta enzima utiliza un radical presente en un aminoácido tirosina para su actividad enzimática. En este caso, el superóxido puede reaccionar con este radical y anularlo, lo que conduce a la eliminación de la actividad enzimática y la producción de peróxido de hidrógeno.

El superóxido se asocia también con la producción de otras EROs muy perjudiciales para las células. Este es el caso del peroxinitrito ($ONOO^-$) que es formado a partir de la condensación del superóxido con el óxido nítrico (NO^{\bullet}).¹⁸² Esta reacción es muy rápida ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y siempre tiende a ocurrir cuando el superóxido se encuentra *in vivo* con el NO^{\bullet} . El nitrito de peróxido posee una elevada afinidad por los lípidos de membrana de la célula, estando directamente asociado con el aumento de las tasas de peroxidación lipídica que conduce a la pérdida de la fluidez y la función de la membrana plasmática y las membranas que rodean los orgánulos celulares.

Dado que el superóxido se produce constantemente existe un sistema antioxidante endógeno que involucra a la enzima superóxido dismutasa. Esta enzima presenta una variante dependiente de manganeso (SOD2 o SOD2) que actúa solamente dentro de la mitocondria para catalizar la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno. El $O_2^{\cdot-}$ es dismutado por la SOD hacia H_2O_2 , que a su vez puede cruzar fácilmente las membranas celulares, ya que es una molécula neutra.¹⁸¹

Todos los resultados disponibles sobre la acción del superóxido en el metabolismo sugieren que el principal determinante de la toxicidad de este agente en las células es su mayor disponibilidad y la ubicación de iones metálicos que puedan catalizar la formación de radicales hidroxilo a partir del superóxido.¹⁸³

2.3.1.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno se genera con frecuencia en los sistemas biológicos, a través de la producción del radical superóxido, ya que dos moléculas de superóxido pueden reaccionar entre si y formar peróxido de hidrógeno y oxígeno. El peróxido de hidrógeno es un compuesto importante en la bioquímica de los radicales libres, ya que puede fácilmente, en presencia de iones metálicos de transición, producir el más reactivo y perjudicial de los radicales libres de oxígeno, el radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$).¹⁷¹ El peróxido de hidrógeno tiene la capacidad de difundir a través de membranas hidrofóbicas,¹⁸⁴ lo que aumenta su importancia citotóxica. Puede inactivar los grupos tioles (-SH), esenciales para la acción enzimática, como en el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de la vía glucolítica. Así, la exposición de la célula a grandes dosis de H_2O_2 puede conducir al agotamiento de ATP por la inhibición de la glucólisis.

2.3.1.3 Radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)

El radical hidroxilo es muy reactivo y puede reaccionar con diferentes biomoléculas, difundiendo a grandes distancias y causando importantes daños celulares.¹⁷¹ Es el principal responsable de los efectos citotóxicos del oxígeno en las plantas, animales y microorganismos que viven bajo la atmósfera.¹⁸⁵

In vivo, gran parte de la producción de radicales hidroxilo se deriva de la reducción de H_2O_2 en presencia de Fe^{+2} y a veces Cu^+ a través de la reacción de Fenton.¹⁸⁶

2.3.2 Impacto de las EROs en el metabolismo celular

En algunas situaciones, la acción destructiva de los radicales libres actúa de forma beneficiosa para el cuerpo, como en el caso ya mencionado de la fagocitosis.¹⁸¹ Sin embargo, el mayor interés por las EROs está en función de sus efectos tóxicos. Todos los componentes celulares son susceptibles al ataque por especies reactivas del oxígeno, que puede conducir a cambios en proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN.¹⁸⁷

El estrés oxidativo se produce cuando el exceso de especies reactivas de oxígeno altera el estado redox de la célula, lo que puede llevar a la muerte celular. Entre todas las clases de biomoléculas que pueden ser atacadas por especies reactivas del oxígeno, los lípidos son probablemente los más susceptibles.¹⁸⁷

Las membranas celulares son ricas fuentes de ácidos grasos poliinsaturados, que son fácilmente atacados por los radicales de oxígeno. La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados es conocida como peroxidación lipídica,¹⁷¹ y genera como productos hidroperóxidos y aldehídos reactivos, por ejemplo, el malondialdehído (MDA).

La peroxidación lipídica se inicia por cualquier especie que tiene suficiente reactividad como para sustraer un átomo de hidrógeno de las cadenas de ácidos grasos de las membranas celulares.¹⁸⁸ El principal efecto de la peroxidación lipídica es la disminución de la fluidez de la membrana, lo que altera las propiedades de ésta y conduce a la ruptura de las proteínas transmembrana.¹⁷⁵

El malondialdehído, como producto resultante de la peroxidación lipídica, es una especie química con gran difusibilidad y capacidad de reaccionar con biomoléculas importantes, tales como proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos generando efectos mutagénicos y carcinogénicos.^{189,190} Los ensayos capaces de determinar la concentración de los productos finales de la peroxidación de lípidos a menudo se utilizan como marcadores en enfermedades humanas.¹⁹¹

Los efectos causados por las EROs sobre las biomoléculas pueden contribuir a numerosos procesos patológicos, entre ellos artritis, cataratas, enfisema, enfermedad de Parkinson, lesión isquémica, porfiria aguda intermitente, envejecimiento y cáncer.¹⁷² Estas especies también están relacionadas con los procesos de apoptosis por activar factores de transcripción desencadenantes de los mismos.¹⁷⁶

2.3.3 Los mecanismos de defensa antioxidante

La producción continua de radicales libres durante los procesos metabólicos ha llevado a los organismos al desarrollo de numerosos mecanismos de defensa antioxidante a fin de limitar su concentración intracelular y evitar la inducción de daños. Los antioxidantes son agentes responsables de la inhibición y la reducción de las lesiones causadas por los radicales libres en las células. Una definición amplia de un antioxidante sería "cualquier

sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de este sustrato con eficacia". Los agentes que protegen las células contra los efectos de los radicales libres pueden ser clasificados en antioxidantes no enzimáticos o enzimáticos.¹⁶⁸

Se considera que los antioxidantes trabajan a diferentes niveles en la protección de los organismos:

- El primer mecanismo de la defensa contra los radicales libres es prevenir su formación, principalmente por inhibición de las reacciones en cadena con iones hierro y cobre.
- Los antioxidantes son capaces de interceptar los radicales libres generados por el metabolismo celular, o por fuentes exógenas, evitando el ataque a los lípidos, proteínas y aminoácidos, los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados y bases del ADN, previniendo la formación de lesiones y la pérdida de la integridad celular. Los antioxidantes obtenidos de la dieta, como las vitaminas C, E y A, flavonoides y carotenoides, son extremadamente importantes en la interceptación de los radicales libres.
- Otro mecanismo de protección es la reparación de las lesiones causadas por los radicales. Este proceso está relacionado con la eliminación de la molécula de ADN dañado y reparación de las membranas celulares dañadas.
- En algunas situaciones puede tener lugar una adaptación del organismo en respuesta a la generación de estos radicales con el aumento de la síntesis de enzimas antioxidantes.

Controlar el nivel de enzimas antioxidantes en las células es extremadamente importante para la supervivencia en el ambiente aeróbico.¹⁹²

Los organismos eucariotas poseen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa que reaccionan con compuestos oxidantes y protegen las células y los tejidos del estrés oxidativo.¹⁹³

Además de los efectos protectores de los antioxidantes endógenos, la inclusión de antioxidantes en la dieta tiene una gran importancia, estando relacionado el consumo de frutas y verduras con la disminución del riesgo de desarrollo de enfermedades asociadas con la acumulación de radicales libres.¹⁹⁴ Sin embargo, los estudios realizados sobre los efectos metabólicos de los antioxidantes han destacado principalmente el uso de nutrientes aislados en el tratamiento y prevención de las enfermedades.

En los alimentos se encuentra una gran variedad de sustancias que pueden actuar en sinergia para la protección de las células y tejidos.^{195,196} El efecto cooperativo entre las vitaminas C y E presentes principalmente en ciertas frutas y verduras se menciona a menudo en la literatura, señalando que la interacción de estas vitaminas es eficaz en la inhibición de la peroxidación de los lípidos de la membrana y la protección del DNA.¹⁹⁷

A pesar de su gran relevancia para mantener el equilibrio oxidativo del organismo, la importancia en relación al rendimiento *in vivo* de los antioxidantes depende también de los tipos de radicales libres que se formen, de dónde y cómo se generen estos radicales, de los métodos de análisis para identificar los daños, y de la dosis ideal para la protección. Es muy posible que un antioxidante actúe como protector en un sistema, pero que no proteja o incluso aumente las lesiones inducidas en otros tejidos o sistemas.¹⁹⁸ La vitamina C, por ejemplo, opera en la fase acuosa como un excelente

antioxidante sobre los radicales libres, pero es incapaz de actuar en compartimentos lipofílicos para inhibir la peroxidación lipídica. Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que esta vitamina en presencia de metales de transición como el hierro, puede actuar como una molécula pro-oxidante y generar radicales OH^{\cdot} y H_2O_2 . Normalmente, estos metales se encuentran disponibles en cantidades muy limitadas y las propiedades antioxidantes de la vitamina predominan *in vivo*.¹⁹⁹

Debido a que tienen diferentes acciones se cree que el gran repertorio de antioxidantes que se encuentran a bajas concentraciones en algunos alimentos tiene más efectos beneficiosos que la ingesta de uno o pocos antioxidantes a dosis no fisiológicas. Por lo tanto, una dieta rica en verduras y frutas se encuentra sin duda vinculada a la protección contra muchas enfermedades crónicas. El papel individual de los compuestos responsables de la protección ha sido ampliamente estudiado para que se administren los mejores agentes de manera que pueden inhibir o impedir la instauración de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Muchos de estos actúan como captadores de radicales libres, quelantes de metales y/o bloqueadores de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

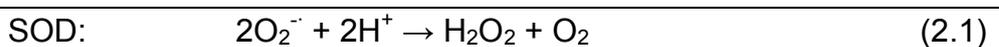
Anteriormente se creía que la mera presencia de radicales libres significaba el daño a células y tejidos que podría alterar la fisiología y afectar a la salud de los individuos. En la medida en que un número mayor de EROs y compuestos químicos con funciones celulares se observó que presentaban un papel importante en determinadas funciones fisiológicas, esta concepción comenzó a cambiar. Así, el paradigma actual es que el problema no es la presencia de radicales libres, sino el desequilibrio entre los radicales libres y antioxidantes que afecta al organismo. También es importante tener en cuenta que, dado que existen funciones metabólicas para los radicales libres en determinados sistemas

fisiológicos, el equilibrio oxidativo varía entre los diferentes tipos de células y también a lo largo de sus diferentes momentos funcionales. Para ayudar en esta regulación diferencial del balance oxidativo en los tejidos corporales existe un sistema antioxidante enzimático endógeno.

Este sistema incluye principalmente las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR).¹⁹¹ La desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno implica un mecanismo de elevada sincronía y una actuación altamente cooperativa. La regulación de sistema de defensa antioxidante enzimático depende principalmente de su sustrato (los radicales libres y especies reactivas de oxígeno), de la producción de co-sustratos y de la afinidad, selectividad y especificidad de este sustrato.¹⁸⁷ A pesar de una gran cantidad de estudios en este área, el sistema de defensa antioxidante enzimático aún no está totalmente aclarado, ya que es un campo de la ciencia complejo y fascinante en extremo.

2.3.3.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Descubiertas en 1969 por McCord y Fridovich, las SOD son metaloenzimas abundantes en las células aeróbicas y las enzimas antioxidantes más importantes. Su acción consiste en la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno, que es menos reactivo y puede ser degradado por enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa. La tasa de degradación no enzimática del superóxido es de aproximadamente $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que la tasa de la reacción catalizada por la SOD es de aproximadamente $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, la SOD es capaz de aumentar 10^4 veces la velocidad de la reacción de dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno a pH fisiológico, conforme a la reacción:



En las células eucariotas hay varios tipos de isoenzimas SOD, a menudo confinadas en diferentes compartimentos celulares, y pueden contener cobre, zinc, hierro o manganeso en sus sitios activos.²⁰⁰

En la actualidad, cuatro tipos de SOD ya están caracterizados a nivel bioquímico y molecular:

a) La SOD1 o Cu/ZnSOD, que depende de cobre y zinc, fue la primera enzima SOD que se caracterizó y es un homodímero de cobre y zinc que se encuentra casi exclusivamente en el espacio citoplasmático.²⁰¹

b) La SOD2 o SOD2, que depende de manganeso, es un tetrámero que contiene manganeso en su centro activo y se puede encontrar en bacterias, plantas y animales. En la mayoría de los tejidos se encuentra en las mitocondrias.²⁰⁰

c) La SOD3 o ECSOD depende también de cobre y zinc y ha sido la que se caracterizó más recientemente. Se trata de un tetrámero que contiene cobre y zinc y presenta un péptido señal que confina esta enzima exclusivamente al espacio extracelular. El papel que juega la SOD3 en diferentes estados fisiológicos están empezando a ser esclarecidos.²⁰¹ La gran cantidad de ECSOD en la córnea y la esclerótica puede estar relacionada con el riesgo de producción fotoquímica de superóxido en estos tejidos.

d) La FeSOD contiene hierro y se encuentra en bacterias, algas y plantas superiores. Esta enzima no ha sido identificada en humanos. Por lo general, la FeSOD contiene dos subunidades de proteína con uno o dos átomos de hierro por molécula de enzima. Sin embargo, en algunos casos existen tetrámeros.¹⁸⁸

En términos bioquímicos la distinción entre los tipos de SOD (dependientes de Cu/Zn y Mn) pueden obtenerse con el uso de cianuro (CN⁻), que inhibe Cu/ZnSOD y no inhibe SOD2 ni FeSOD.

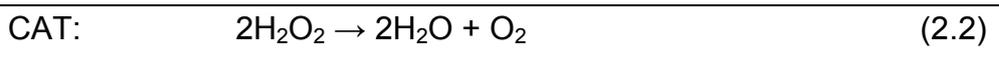
Otra forma es la exposición de Cu/ZnSOD y FeSOD al H₂O₂, lo que provoca la inactivación de estas enzimas.¹⁸⁸

El papel beneficioso y protector de la SOD ha sido demostrado en una variedad de patologías, tanto clínicas como preclínicas. El uso de orgoteina (Cu/ZnSOD bovina) mostró resultados prometedores en el tratamiento de la artritis reumatoide y la osteoartritis, así como reducción de los efectos secundarios asociados con quimioterapia y radioterapia. Las principales limitaciones de estos productos son su gran tamaño, que limita la permeabilidad celular, y su vida media corta, antigenicidad y alto coste.

Un gran número de variantes SOD de bajo peso molecular han sido desarrolladas para superar algunas de estas limitaciones. Las SOD también pueden ser generadas por síntesis recombinante, pudiendo ser administradas en forma natural. Su vida media en plasma se puede prolongar por conjugación con polietilenglicol o albúmina. Se estima que las SOD en *Escherichia coli* proporcionan alrededor del 95% de protección frente a objetivos susceptibles de ser atacados por O₂^{•-}.

2.3.3.2 Catalasa (CAT)

La catalasa es una ferrihemoenzima cuya función principal es transformar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular¹⁷⁹ conforme a la reacción:



Esta enzima es un tetrámero compuesto por unidades idénticas, y cada monómero contiene un grupo prostético hemo en el centro catalítico. La conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, requiere la presencia de NADPH para que la activación de los tetrámeros de la enzima. La principal fuente de

NADPH es la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la primera reacción de la vía de las pentosas.

La actividad de la catalasa en animales y plantas se concentra en orgánulos subcelulares denominados peroxisomas. Los cloroplastos, las mitocondrias y el retículo endoplasmático contienen poca o prácticamente ninguna actividad catalasa. Por lo tanto, la actividad de la catalasa en homogeneizados de tejidos de animales y plantas, tiene probablemente su origen en la ruptura de los peroxisomas durante la homogeneización. La mayoría de las células aeróbicas contienen catalasa, aunque organismos como *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, y las algas *Euglena* y *Gloecapsa* y varios parásitos helmínticos no presentan esta enzima. En las células eucariotas han sido identificados dos tipos de catalasas, una citosólica y una peroximal, codificadas por los genes *cat-t1* y *cat-a1*, respectivamente.²⁰²

En los animales, la catalasa está presente en todos los órganos importantes del cuerpo, principalmente en el hígado. Debido a la falta de peroxisomas algunos órganos son más susceptibles a los daños por producción de especies reactivas del oxígeno, como el corazón, los pulmones y el cerebro.

En estos órganos, como mecanismo de defensa, puede ocurrir la difusión de peróxido de hidrógeno al torrente sanguíneo, donde reacciona con la CAT eritrocitaria. La enzima eritrocitaria es altamente específica y sólo tiene actividad para el peróxido de hidrógeno y los metil- y etil-hidroperóxidos.

La actividad de la catalasa tiene una cinética mucho más rápida que la de la glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno, lo que implica la desintoxicación de H_2O_2 cuando su concentración es alta, mientras que la glutatión peroxidasa actúa a bajas concentraciones de este sustrato. En los órganos que

presentan una elevada actividad catalasa, como es el hígado, la concentración de peróxido de hidrógeno es ligeramente baja.²⁰²

La disociación de la catalasa en subunidades se produce con facilidad en el almacenamiento y la congelación o la exposición a la acidosis o álcalis, causando la pérdida de actividad enzimática.

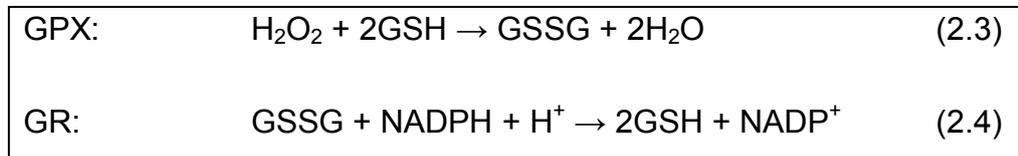
El gen que codifica la catalasa se encuentra en el cromosoma 11. Las mutaciones en este gen pueden dar lugar a acatalasemia, una enfermedad en la que el único problema clínico observado ha sido la mayor incidencia de úlceras en la boca. La aniridia, que es también resultado de la mutación en el cromosoma 11, da lugar a disminución de la actividad de la catalasa y se asocia con aumento de incidencia de retraso mental y un tipo de cáncer conocido como tumor de Wilms.

2.3.3.3 *Glutación peroxidasa (GPx)*

Las peroxidasas son enzimas que utilizan una variedad de agentes reductores celulares para inactivar peróxidos.¹⁷⁹ Además de actuar sobre H_2O_2 , también neutralizan los peróxidos orgánicos, como los alquil-hidroperóxidos. Existen NADPH-peroxidasas (*Escherichia coli*), peroxidasas de citocromo (levaduras), ascorbato peroxidasa (plantas) y otras. En los mamíferos, las principales peroxidasas son glutación-dependientes (GPx). Hay enzimas especializadas que actúan sobre peróxidos específicos, por ejemplo, hidroperóxidos fosfolipídicos, y en determinados compartimentos celulares como citoplasma o mitocondrias, o asociadas a membranas. En las mitocondrias de mamíferos esta enzima constituye la principal defensa contra el H_2O_2 , ya que estos orgánulos, en general, no presentan actividad catalasa.¹⁹¹

La GPx es una enzima que utiliza selenio como cofactor, cuya acción se basa en la oxidación de glutación (GSH) formando el disulfuro correspondiente (GSSG) (reacción 2.3). La

relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado (GSH / GSSG) es elevada en las células normales, debido a la existencia de un mecanismo para reducir de nuevo el GSSG a GSH, reacción llevada a cabo por la glutatión reductasa (GR), que cataliza la reacción 2.4 señalada a continuación:



El NADPH necesario para esta reacción es suministrado en los tejidos de animales y plantas a través de una serie de sistemas enzimáticos. Entre estos sistemas, el más conocido y más importantes es la vía de las pentosas fosfato, como se mencionó anteriormente. La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es responsable de mantener las concentraciones de NADPH adecuadas para reducir el glutatión oxidado.¹⁷⁹

Un suministro constante de NADPH es vital para la integridad de los eritrocitos. Los eritrocitos de los individuos con deficiencia de G6PD son particularmente susceptibles al daño oxidativo. Los eritrocitos maduros no presentan núcleo ni mecanismo de síntesis de proteínas, no siendo capaces de sintetizar nuevas moléculas de enzima para reemplazar a las degradadas y proveer de nuevos componentes a la membrana, lo que contribuye a explicar la gran sensibilidad de estas células a las lesiones de la membrana.

Se estima que aproximadamente 400 millones de personas tienen deficiencia de G6PD, que es la deficiencia de la enzima humana más común. Una función importante de la GPx en los eritrocitos es eliminar reductivamente H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos, que pueden dañar irreversiblemente la hemoglobina y efectuar ruptura del enlace C-C de los fosfolípidos presentes en las membranas celulares.

La acumulación incontrolada de peróxidos provoca la ruptura prematura de la célula, y por lo tanto se puede producir anemia hemolítica. La glutatión peroxidasa no puede actuar sobre los peróxidos de moléculas de ácidos grasos que están esterificados hacia moléculas de lípidos en las membranas o las lipoproteínas. Estos deben ser primero liberados por la acción de lipasas. La GPx en combinación con otras enzimas, impide la interacción de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y los iones metálicos que conducen a la formación del altamente destructivo OH^{\cdot} y también regenera el dehidroascorbato hacia ascorbato. La actividad GPx puede ser promovida mediante la suplementación alimentaria con selenio.²⁰³

2.4 Genética de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso

Al comparar el metabolismo antioxidante endógeno y exógeno la principal diferencia es que el primero, por ser enzimático se efectúa por moléculas proteicas sintetizadas por la propia célula.

Por lo tanto, para todas las enzimas antioxidantes existen genes responsables de su producción. Todos los genes de las enzimas antioxidantes son nucleares, aunque muchas de estas enzimas como la catalasa y glutatión deshidrogenasa actúan dentro de orgánulos como es el caso de la SOD2 en las mitocondrias. En el interior de la mitocondria, la SOD2 proporciona la principal defensa contra el daño oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno.

Existen tres isoformas de SOD en el cuerpo humano (SOD1, SOD2 y SOD3), con tres genes diferentes responsables de su síntesis. La SOD2 se traduce en el citosol y es trasladada a la mitocondria por un péptido señal, que desempeña un papel clave en el establecimiento de la enzima en la mitocondria. Varios estudios han demostrado que la expresión de SOD2 es esencial para la

supervivencia de la vida aeróbica, y una baja concentración de esta enzima induce carcinogénesis.²⁰⁴ Estos estudios se efectuaron en ratones modificados genéticamente (*knock-out*) que carecían de la enzima SOD2.²⁰⁵ Estos animales morían a los primeros días de vida mientras que los ratones sin los genes para SOD1 o SOD3 eran capaces de sobrevivir a pesar de los gran daños fisiológicos debidos al estrés oxidativo.

El gen SOD2 está localizado en el cromosoma 6q25.2. Debido a que después de haber sido sintetizada la SOD2 en el retículo endoplasmático rugoso requiere ser transportada al interior mitocondrial, en la proteína SOD2 recién formada y todavía inactiva existe una pequeña secuencia diana mitocondrial (*mitochondrial target sequence*, MTS), que induce y permite la entrada de la proteína SOD2 en el orgánulo. Es en su interior cuando la enzima pasa a ser activa.

Dada su gran importancia en el control de la producción de superóxido muchos estudios se han dedicado a elucidar el papel de SOD2 no sólo en los procesos fisiológicos de los individuos sanos, sino en disfunciones o enfermedades como el cáncer y las enfermedades cardiometabólicas. En este sentido, se ha observado deficiencia de la enzima SOD2 en tumores humanos, probablemente debido al hecho de que la sobreexpresión de esta enzima en las células tumorales en cultivo suprime la división celular, mientras que la sobreexpresión misma inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.²⁰⁶

Aunque las razones exactas de estas relaciones entre crecimiento tumoral y actividad intracelular de la SOD no se conocen aún, estos resultados apoyan la idea de que la expresión de SOD está directamente relacionada con la carcinogénesis. De este modo, muchos autores opinan que el gen de la SOD, en especial de la SOD2, sería un gen de supresión tumoral.

Investigaciones como la realizada por Huang et al. (2000)²⁰³ sugieren que la SOD puede ser un blanco selectivo prometedor para la eliminación de las células cancerosas.

En estudios genéticos previos se identificó la presencia de un polimorfismo genético en la región MTS que es el resultado de una sustitución de alanina por valina en el codón 16 (Ala16Val), ubicado en el segundo exón del gen. Este polimorfismo es también conocido como "Val(-9)Ala", debido al noveno aminoácido de la secuencia del péptido señal. Por lo tanto, todos los seres humanos tienen enzimas SOD2 que pueden proceder de tres genotipos y, en consecuencia, tres fenotipos. Los genotipos homocigotos son AA (alanina/alanina) y VV (valina/valina) y el heterocigoto AV (alanina/valina). En términos de fenotipo, es decir, en relación con la estructura y función de la SOD2 respecto de los alelos A y V, los estudios han demostrado que la variante Ala-SOD2 es fácilmente importada en la mitocondria, mientras que la variante Val-SOD2 se mantiene parcialmente retenida en el poro de la membrana mitocondrial interna, lo que causa que parte de la enzima sea degradada, originando una variante de menor actividad enzimática.²⁰⁷

Este fenómeno se produce porque la post-transcripción Ala-SOD2 asume una conformación tridimensional en hélice alfa, mientras que la Val-SOD2 presenta una conformación en lámina beta. Así, los resultados mostraron que el precursor Ala-SOD2 genera un 30-40% más actividad en la matriz, en el procesamiento del monómero de la SOD2, que el precursor Val-SOD2.

A pesar de la mayor eficiencia del alelo A, muchos estudios epidemiológicos han descrito una asociación entre esta variante genética y cánceres de mama, próstata y colon. Se cree que este fenómeno se debe a que la mayor eficiencia de la SOD2 no va acompañada de un aumento de la glutatión peroxidasa, lo que se traduce en mayor concentración de H₂O₂, que puede atravesar más fácilmente la membrana mitocondrial y conduce a la formación de

radicales hidroxilo, de fuerte actividad mutagénica y carcinogénica. Esta hipótesis es difícil de probar en estudios poblacionales ya que los individuos están expuestos de forma crónica a una serie de agentes pro- y antioxidantes que interfieren con los resultados. Los estudios también informan que la asociación del alelo con el cáncer se puede revertir a través de una dieta rica en antioxidantes.²⁰⁸ Por otra parte, la investigación también sugiere que el genotipo VV, que presenta una menor eficiencia de la enzima SOD2, está relacionado con la disfunción endotelial e indicadores bioquímicos asociados con el riesgo cardiometabólico, como es el caso de las LDL oxidadas, y también interactúa con la hipercolesterolemia aumentando la tasa de peroxidación de lípidos y disminuyendo los niveles de enzimas antioxidantes como la propia SOD.²⁰⁹

Las investigaciones realizadas por el equipo de investigación relacionado con la ejecución del presente estudio han encontrado una asociación entre el genotipo/alelo y el cáncer de mama en mujeres y hombres^{210,211}, el cáncer de próstata y la inmunosenescencia²¹², mientras que otros estudios, también llevados a cabo por nuestro equipo de investigación, han encontrado una asociación entre el genotipo VV/alelo V y altas concentraciones de LDL oxidado, especialmente en pacientes mayores con diabetes tipo II²¹³ e hipercolesterolemia²¹⁴, y sorprendentemente con mayor agresividad tumoral en aumento (mayor probabilidad de afectación ganglionar en el cáncer de mama).²¹⁵

Con base a estos resultados se desplegaron también en las investigaciones *in vitro* mediante la construcción de líneas de linfocitos primarios y secundarios derivados de los individuos sanos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2. Una investigación inicial por Montagner et al. (2010)²¹⁶ ha demostrado diferencias en la respuesta al estrés oxidativo causado por la exposición a la radiación ultravioleta del cultivo primario de linfocitos de individuos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2. En este sentido, los

linfocitos AA tendían a tener mayor genotoxicidad analizada por el ensayo alcalino Cometa. Además, los linfocitos VV presentaron tasas más altas de peroxidación lipídica probablemente debido a la elevada afinidad entre el superóxido no catalizado y el óxido nítrico, producido por virtualmente todas las células, cuyo principal producto de la reacción es el peroxinitrito, que a su vez es una especie reactiva de oxígeno directamente relacionada con la peroxidación lipídica de las membranas. Estos primeros resultados *in vitro* son importantes porque existe un mayor control de las variables asociadas con las condiciones experimentales que no pueden ser controladas en estudios epidemiológicos de poblaciones.

El conjunto de estos resultados sugiere que la enzima SOD2 podría tener algún nivel de impacto asociado con la obesidad. Si este impacto sería más bien una consecuencia del estrés oxidativo agudo causado por la acumulación de grasa corporal o también podría actuar aumentando la susceptibilidad a la obesogénesis es una pregunta que está abierta. Entre tanto, puede ser realista considerar la posible asociación entre el gen SOD2 y la obesidad, ya que los mecanismos moleculares de la acumulación de masa adiposa y mantenimiento no están bien estudiados y comprendidos.

Otro problema está relacionado con un gran cuerpo de evidencias que sugieren que la obesidad es el resultado directo de la interacción de factores ambientales. Esto ha sido demostrado por numerosos estudios epidemiológicos en grandes poblaciones y en los gemelos monocigóticos y dicigóticos criados juntos o por separado.²¹⁷ Sin embargo, la obesidad tiene una expresión fenotípica muy heterogénea y los mecanismos implicados en su desarrollo son más diversos. El papel de los factores ambientales, comportamentales y socioeconómicos de los individuos con diferente susceptibilidad biológica tiene una reconocida importancia. Según diversos estudios, entre un 30 y un 80% de la variación en el peso puede estar determinado por factores genéticos. El riesgo para la

obesidad común puede ser debido a un gran número de loci, cada uno con múltiples alelos de predisposición a enfermedades, pero con baja frecuencia.²¹⁸ En la actualidad, estas dos hipótesis siguen siendo válidas, ya que el enfoque genético no permite aún una confirmación de una hipótesis más que otra.

La obesidad también se asocia con múltiples síndromes genéticos. Inicialmente pensados como enfermedades monogénicas, la investigación molecular nos lleva cada vez más a la idea de una contribución de diferentes genes en la determinación de estos síndromes. Para identificar nuevas vías metabólicas implicadas en el control del peso corporal, los equipos de investigación están tratando de identificar los genes y mutaciones responsables de estas enfermedades. Entre las más conocidas están los síndromes de Prader-Willi, Cohen, Alström y Bardet-Bied, pero muchos otros han sido referidos.²¹⁹

Aunque algunos genes han sido clonados, deben ser identificados aun los vínculos fisiopatológicos entre los productos y sus proteínas y el desarrollo de enfermedades caracterizadas por múltiples características clínicas que a menudo se superponen (enfermedades de la retina, retraso mental, resistencia a la insulina).²²⁰ El porqué estos fallos conducen a la obesidad es una cuestión por elucidar. Sin embargo, es cierto que la mayoría de estas enfermedades también muestran cambios en el metabolismo oxidativo produciéndose estrés oxidativo propiamente dicho.

Dado que en la literatura también aparecen observaciones relativas a que la sobreproducción de superóxido se relaciona con la obesidad, han sido dos los temas principales investigados en este estudio:

(1) ¿Está la obesidad asociada a un estado inflamatorio de bajo grado? ¿Puede el aumento del estrés oxidativo, causado por

desequilibrio oxidativo debido al polimorfismo genético Ala16Val-SOD2, aumentar el riesgo de obesidad?

(2) ¿Podría esta diferencia influir en la producción de las propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias relacionadas con la obesidad?

3 Objetivos

General:

Evaluar la asociación entre el polimorfismo Ala16Val-SOD2 y la obesidad, la posible interacción entre estos dos factores sobre indicadores de la conducta alimentaria, y la respuesta *in vitro* en linfocitos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2 de marcadores del metabolismo y la producción de citoquinas relacionadas con la obesidad.

Específicos:

- Analizar la asociación entre el polimorfismo Ala16Val del gen superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2) y la obesidad en una muestra de personas mayores de Brasil;

- Analizar el impacto de la interacción entre el polimorfismo Ala16Val del gen de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2) y la obesidad sobre indicadores del comportamiento alimentario (ingestión calórica, porcentaje de proteínas, grasas, carbohidratos y micronutrientes) en una muestra de adultos mayores brasileños;

- Analizar el impacto de la interacción entre el polimorfismo Ala16Val del gen de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2) y la obesidad en los perfiles glucídico y lipídico (colesterol total, triglicéridos, colesterol-LDL, colesterol-HDL) en adultos mayores brasileños;

- Evaluar *in vitro* si el metabolismo de la glucosa en cultivos de linfocitos después de la expansión mitótica es similar para los linfocitos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2 en medios de cultivo celular que imitan entornos propicios a la obesidad (con mayor concentración de glucosa y de insulina), y

- Evaluar *in vitro* la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias relacionadas con la obesidad en linfocitos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2.

4 Diseño experimental

Para que los objetivos anteriores pudieran alcanzarse fue concebido un diseño experimental con dos protocolos paralelos e independientes.

En el primer protocolo se llevó a cabo un estudio caso-control, observacional, en el que fueron comparadas las frecuencias alélicas (alelos A y V) y genotípicas (genotipos AA, VV y AV) entre obesos y no obesos.

En el protocolo 2 se efectuó un estudio *in vitro* con linfocitos obtenidos de individuos sanos con diferentes genotipos del polimorfismo Ala16Val-SOD2 para investigar el efecto potencial sobre la producción de pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de citoquinas.

4.1 Protocolo 1

La primera parte del presente estudio se estructuró de la siguiente forma:

1. Estudio caso-control de una muestra de 1028 adultos mayores participantes en el Proyecto Gravatai.
2. Selección de una submuestra con descendencia caucásica sin cáncer ni enfermedades cardiovasculares (N=815).
3. Caracterización en dos grupos: Obesos (IMC superior a 30 kg/m² y más de 102 cm de cintura abdominal) y no obesos.
4. Genotipado del polimorfismo Ala16val-SOD2
5. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre obesos y no obesos

4.2 Protocolo 2

El protocolo 2 del presente estudio consta de las siguientes fases:

1. Selección de adultos sanos (N=100)
2. Genotipado del polimorfismo Ala16Val-SOD2
3. Recogida de sangre (N=4 por genotipo)
4. Estudio *in vitro*: Cultivo de linfocitos T (T-AA, T-VV y T-AV) durante 6 h bajo cuatro tratamientos: control en medio Hanks con glucosa 10mM (C), suplementación con glucosa 15mM (G), suplementación con insulina 5mM (I) y exposición combinada a glucosa 15mM más insulina 5mM (GI).
5. Análisis de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ) y anti-inflamatorias (IL-10)

5 Materiales y métodos

5.1 Protocolo 1 - Población y muestra

Se llevó a cabo un estudio observacional transversal en que fueron seleccionados adultos mayores obesos y no obesos a partir de una base de datos de 1.058 voluntarios que participaron en el Proyecto Gravataí, Brasil. Este proyecto tuvo como objetivo investigar las interacciones genéticas y ambientales en el envejecimiento y los estudios de las enfermedades no transmisibles relacionadas fueron publicados y se describen con más detalle sobre este proyecto de investigación.^{11,14,18}

Debido a que este estudio incluye variables genéticas, las muestras fueron reclutadas por selección aleatoria de individuos caucásicos, que representan el grupo étnico predominante en la región de Gravataí del estado de Rio Grande do Sul en Brasil. Además, todos los pacientes obesos y no obesos fueron seleccionados sin enfermedades coronarias, accidente cerebrovascular, cáncer y otras enfermedades o trastornos previos que pudieran influir en el estado de obesidad, patrones alimentarios y distribución de los genotipos. Estas exclusiones se justifican debido a que estas variables pueden interferir en los análisis.¹¹

Por lo tanto, un total de 815 sujetos fueron seleccionados y clasificados como obesos (301) o no obesos (514). La obesidad se determinó mediante el índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m² y obesidad central, definida como una circunferencia de la cintura (CC) \geq 102 cm para los hombres y \geq 80 cm para las mujeres.²²¹

5.2 Protocolo 1 - Análisis antropométrico

5.2.1 Índice de masa corporal

Se determinó el índice de masa corporal o índice de Quetelet (IMC) como el cociente entre el peso y el cuadrado de la talla de cada sujeto. Valores de IMC hasta 25 kg/m² fueron considerados normales, los valores entre 25 kg/m² y 30 kg/m² se consideraron indicativos de existencia de sobrepeso, y los valores superiores a 30 kg/m² fueron considerados indicativos de obesidad, según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud.²²¹

5.2.2 Estimación de la circunferencia de cintura

Se midió la circunferencia de cintura como indicador de adiposidad visceral. Esta medida se considera de gran relevancia epidemiológica. En este caso, la medición se realizó en la cresta ilíaca. Valores de hasta 80 cm se consideran normales para mujeres y hasta 102 cm se consideran normales para los hombres. Por encima de estos valores, se considera que los individuos presentan obesidad central.²²²

5.2.3 Presión arterial

La presión arterial sistémica se obtuvo a partir de la medición de la presión arterial (PAS) y diastólica (PAD), con un esfigmomanómetro de mercurio (Erka, Alemania) con manguito adecuado para la circunferencia del brazo derecho. Para ello, cada participante se mantuvo en reposo (sentado) durante al menos 5 minutos antes del inicio de la medición. Se tomaron dos medidas, manteniendo intervalos de aproximadamente 30 minutos entre cada una de ellas. La aparición de los sonidos fue utilizada para identificar la PAS y su desaparición (fase V de Korotkoff) para la identificación de la PAD.

Debido a la posibilidad de pseudo-hipertensión causada por la rigidez de la arteria braquial por aterosclerosis (lo cual puede aumentar la presión arterial en 30 mmHg o más) se utilizó al mismo tiempo que la medida de la PAS la maniobra de Osler de palpación de la arteria radial (que se considera positiva cuando la arteria radial sigue siendo palpable cuando el brazalete se infla por encima del nivel de PAS)²²³, y estos casos fueron excluidos. Niveles de presión arterial de 140/90 mmHg se consideraron normales, según lo recomendado por el III Consenso Brasileño de Hipertensión Arterial.²²⁴

5.3 Protocolo 1 - Análisis bioquímicos

Fueron recogidas muestras de sangre de los individuos incluidos en el Proyecto Gravatai después de un periodo de ayuno nocturno de 12 horas o superior; se ofreció posteriormente un desayuno y café.

Para los análisis bioquímicos fueron recogidas muestras de sangre venosa, estando los voluntarios en ayunas durante al menos 12 horas. Las muestras fueron recogidas en tubos sin anticoagulante para la cuantificación del perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos) y glucemia, pruebas efectuadas en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de Instituto de Geriatria y Gerontología de la Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Se utilizó la técnica manual de reacción enzimática colorimétrica para la cuantificación de colesterol total mediante el uso del reactivo enzimático comerciales Cholesterin/Colesterol Chad-Pap (MPR2, Boehringer Mannheim, Alemania). Se efectuaron lecturas de patrones de colesterol 50 mg/dl, 100 mg/dl, 200 mg/dl y 400 mg/dl de Preciset Colesterol Calibrator 125512 (Boehringer-Mannheim, Alemania), y el valor final fue el promedio de dos determinaciones para cada muestra de plasma.

El HDL-colesterol fue analizado por la técnica de precipitación con heparina-Mn²⁺ de Gildez con algunas modificaciones para la determinación de HDL-c. Las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B-100 (VLDL y LDL) fueron precipitadas con heparina Mn²⁺ (Sigma Chemical Co, USA.), a lo que siguió incubación y centrifugación (centrífuga refrigerada RB-18II, Tomy Seiko Co. Ltd, Japón). El sobrenadante resultante se utilizó para la cuantificación de HDL-c por la reacción enzimática colorimétrica para el colesterol, siendo considerado como valor final la media de dos mediciones para cada muestra de plasma.²²⁵ Los triglicéridos fueron evaluados por la técnica manual de reacción enzimática colorimétrica mediante el kit comercial Labtest TG Gpo-Ana (Argentina).

Se efectuaron mediciones de patrones de triglicéridos de 150 mg/dl y 300 mg/dL del Preciset Trigliceride Calibrador 125512 (Boehringer-Mannheim, Alemania), y el valor final fue el promedio de dos mediciones para cada muestra plasmática.²²⁵ La concentración de lipoproteínas de baja densidad LDL-c fue obtenida indirectamente utilizando la fórmula de Friedewald para valores de triglicéridos por debajo de 400 mg/dl.²²⁶ Las muestras con niveles de triglicéridos superiores a 400 mg/dl fueron excluidas.

La concentración de glucosa en plasma fue medida mediante un método enzimático colorimétrico, utilizando el kit comercial de Bio Diagnóstica ICQ Inc. (Paraná, Brasil), considerado como valor final la media de dos mediciones para cada muestra plasmática.²²⁵ Concentraciones superiores a 126 mg/dL se consideraron elevadas.

5.4 Protocolo 1 - Evaluación de la conducta alimentaria

Se realizó un análisis adicional para evaluar el efecto de la interacción entre la obesidad y las variables bioquímicas y

nutricionales. Este análisis fue similar al efectuado en un estudio anterior por Prado-Lima et al. (2006)²²⁷ en el mismo grupo de personas mayores. Por lo tanto, se utilizó en los ancianos un recordatorio alimentario de 24 horas y un cuestionario de frecuencia alimentaria.^{228,229} En este caso, el cuestionario de frecuencia de alimentos fue adaptado para incluir los principales alimentos consumidos por la población brasileña ha sido validado previamente por Lopes et al. (2005).²³⁰

Este mismo procedimiento se realizó por segunda vez transcurrido un año desde la primera evaluación. Así, los dos recordatorios fueron comparados con el fin de ver si había coherencia en el patrón habitual de alimentación de los ancianos. Los que mostraron mucha discrepancia o no poseían al menos dos evaluaciones nutricionales, no se incluyeron en el análisis. El elemento de alimentación principal que contribuye a la ingesta de alimentos en este estudio fue compilado; algunos elementos fueron eliminados y otros añadidos de acuerdo con las prácticas de la dieta común en Brasil.

A partir de los datos obtenidos se efectuaron estimaciones cuantitativas de macro y micronutrientes utilizando el programa estadístico comercial Diet Win 4.0 que evalúa los componentes de la dieta brasileña. La estimación de estos nutrientes se comparó posteriormente entre obesos de edad avanzada y voluntarios no obesos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2. También se efectuaron comparaciones entre los parámetros bioquímicos relacionados con el perfil de lípidos y glucemia y niveles de presión arterial de los sujetos de estudio. El protocolo siguió los mismos pasos metodológicos descritos en estudios previos en estos adultos mayores.^{11,15}

El contenido de macro y micronutrientes fue estimado por el programa estadístico DietWin Clínic, estructurado en base a los valores nutricionales de los alimentos brasileños previamente

validados y disponibles en la Tabla de Composición de Alimentos (TACO) de Brasil.²³¹

5.5 Protocolo 2 - Aspectos experimentales del cultivo de linfocitos

El segundo protocolo de este trabajo implica un estudio *in vitro* de líneas celulares de linfocitos procedentes de individuos con diferentes genotipos del polimorfismo Ala16Val-SOD2. Los cultivos de linfocitos fueron efectuados según el protocolo descrito previamente por Montagner et al.²¹ Para ello, en voluntarios ayunados durante 12 horas, se realizó la extracción de sangre por punción venosa en tubos heparinizados de 8 ml.

Se añadió 1 ml de sangre a 5 ml de medio de cultivo estéril RPMI suplementado con suero fetal bovino y gentamicina. El estímulo para la expansión clonal tuvo lugar por la adición del antígeno fitohemaglutinina (PHA). La PHA, extraída de *Phaseolus vulgaris* se utiliza tradicionalmente para estimular la explosión mitótica de linfocitos de 48h a 72h.²³² Existen estudios bien establecidos desde los años 60 (como el de Hedekov(1968)²³²) sobre el catabolismo de la glucosa en linfocitos humanos sanos colocados en buffer de bicarbonato utilizando PHA como antígeno mitógeno.

Los cultivos de linfocitos, una vez establecidos, permanecieron creciendo durante 72 horas bajo atmósfera de 5% CO₂ en el Laboratorio de Biogenómica de la Universidad Federal de Santa María. Durante este período no recibieron ningún tratamiento. Transcurridas 72 horas se midió la concentración de linfocitos por microscopía óptica en cámara de Neubauer a 400X. A continuación, los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos y el sobrenadante fue descartado.

Los linfocitos de los tres genotipos Ala16Val-SOD2 y tres cepas fueron entonces resuspendidos en buffer Hanks (HBSS) conteniendo la siguiente composición química: KCl 5,5 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 4.2 mM, MgCl₂ 0,5 mM, NaCl 122,6 mM, D-glucosa 10 mM, Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1,3 mM. Este buffer permite la supervivencia celular sin estrés fisiológico. Sin embargo, puesto que carece de nutrientes y estimulantes, las células disminuyen su metabolismo y cesan su división mitótica. La concentración de células en cada alícuota fue de 5×10^4 células. Después de este procedimiento las muestras se almacenaron a -20C hasta su análisis de las citoquinas.

5.5.1 Tratamientos

Una vez obtenidas las alícuotas de los linfocitos en que la concentración de glucosa del medio de cultivo era conocida (10 mM), se efectuaron tratamientos adicionales con suplementación de glucosa e insulina. Para cada línea de linfocitos con diferentes genotipos se efectuaron los siguientes tratamientos: (1) control, linfocitos en medio Hanks con glucosa 10 mM, tratamiento C; (2) suplementación con glucosa, linfocitos en medio Hanks con glucosa 15 mM, tratamiento G; (3) suplementación con insulina, linfocitos en medio Hanks con glucosa 10 mM e insulina 5 mM, tratamiento I; y (4) suplementación con glucosa e insulina, linfocitos en medio Hanks con glucosa 15 mM e insulina 5 mM, tratamiento GI.

Los linfocitos permanecieron durante 6 horas bajo estos tratamientos. Transcurrido este período, se realizó un análisis de la utilización de la glucosa a través de la cuantificación de este compuesto en el medio Hanks. Una vez cuantificada se calculó el porcentaje de glucosa que fue consumido por las células durante dicho periodo. También fue evaluada la concentración de glucosa intracelular.

Puesto que los linfocitos producen citoquinas pro- y anti-inflamatorias como parte de su metabolismo, se efectuaron asimismo análisis adicionales de la concentración de las siguientes citoquinas: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), TNF- α , interferón gamma (IFN- γ).

De este modo se pretendió evaluar: (1) si la tasa de catabolismo de la glucosa era similar entre linfocitos con diferentes genotipos; (2) si existía interacción entre los genotipos y los tratamientos en el metabolismo de la glucosa por los linfocitos; (3) si la expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias era diferente en función del genotipo y del tratamiento, y si existía interacción genotipo-tratamiento que afectase a dicha expresión.

5.5.2 Determinación de citoquinas

Para la determinación de las concentraciones de citoquinas (IL-1,IL-6,TNF- α ,IF γ , IL-10) se utilizó la técnica de ELISA sobre homogeneizados de linfocitos cultivados.

5.5.2.1 Determinación de IL-1

Se partió de un homogeneizado de linfocitos cultivados y del kit Human IL-1 ELISA de Invitrogen (Invitrogen Corp., 542 Flynn Rd., Camarillo CA, USA) y se procedió conforme al protocolo del fabricante. Para la sensibilización de las placas se determinó en primer lugar el número de pocillos que serían utilizados (siempre analizando las muestras por duplicado). Se añadieron 50 μ L de patrones y muestras a cada pocillo, pipeteando 100 μ L de solución anti-IL-1 biotinilada (*conjugado de biotina*) en cada pocillo, excepto el cromógeno en blanco. La placa fue agitada suavemente, y posteriormente cubierta e incubada durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se descartó el material (vertiendo la placa), lavando con la solución de lavado del kit e incorporando 100 μ L de la solución de trabajo de estreptavidina-HRP

en cada pocillo, excepto en el cromógeno en blanco. La placa fue de nuevo cubierta e incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Tras descartar nuevamente el material no ligado, se procedió a un nuevo lavado y se incorporaron 100 μ L de cromógeno estabilizado en cada pocillo. Se incubó durante 25 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se incorporó una solución de parada con 100 μ L en cada pocillo. La placa fue agitada suavemente para su homogeneización. La absorbancia de la solución fue determinada a 450 nm en un lector automático de ELISA TP-Reader NM (Thermoplate, China).

Se realizó una recta patrón con las concentraciones estándar de IL-1 suministradas en el kit (0-250 pg/mL). Los resultados de la detección de IL-1 en cada muestra experimental obtenidos en forma de densidad óptica fueron convertidos en concentración de acuerdo con dicha recta.

5.5.2.2 *Determinación de IL-6*

Se partió de un homogeneizado de linfocitos cultivados y del kit Human IL-6 Ultrasensitive ELISA de Invitrogen (Invitrogen Corp., 542 Flynn Rd., Camarillo CA, USA) y se procedió conforme al protocolo del fabricante. Para la sensibilización de las placas se determinó en primer lugar el número de pocillos que serían utilizados (siempre analizando las muestras por duplicado). Se añadieron 100 μ L de patrones y muestras a cada pocillo. Se cubrió la placa y se procedió a su incubación durante 3 horas a 37 °C, descartando el material vertiendo la placa y lavando 6 veces con la solución de lavado del kit. A continuación se incorporaron 100 μ L de solución de Hu IL-6 biotinilada (*conjugado de biotina*) en cada pocillo, excepto el cromógeno en blanco. La placa fue agitada suavemente, y posteriormente cubierta e incubada durante 45 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se descartó nuevamente el material (vertiendo la placa), lavando 6 veces con la solución de lavado del kit e incorporando 100 μ L de la solución de trabajo de

estreptavidina-HRP en cada pocillo, excepto en el cromógeno en blanco. La placa fue de nuevo cubierta e incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Tras descartar nuevamente el material no ligado, se procedió a un nuevo lavado y se incorporaron 100 μ L de cromógeno estabilizado en cada pocillo, comprobando el virado del color a azul. Se incubó durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se incorporó una solución de parada con 100 μ L en cada pocillo. La placa fue agitada suavemente para su homogeneización, comprobando el cambio de color desde azul a amarillo. La absorbancia de la solución fue determinada a 450 nm en un lector automático de ELISA TP-Reader NM (Thermoplate, China).

Se realizó una recta patrón con las concentraciones estándar de IL-6 suministradas en el kit (0-10 pg/mL). Los resultados de la detección de IL-6 en cada muestra experimental obtenidos en forma de densidad óptica fueron convertidos en concentración de acuerdo con dicha recta.

5.5.2.3 *Determinación de TNF- α*

Se partió de un homogeneizado de linfocitos cultivados y del kit Human TNF- α ELISA de Invitrogen (Invitrogen Corp., 542 Flynn Rd., Camarillo CA, USA) y se procedió conforme al protocolo del fabricante. Para la sensibilización de las placas se determinó en primer lugar el número de pocillos que serían utilizados (siempre analizando las muestras por duplicado). Se añadieron 50 μ L de patrones y muestras a cada pocillo. Se cubrió la placa y se procedió a su incubación durante 2 horas a 37 °C, descartando el material vertiendo la placa y lavando 4 veces con la solución de lavado del kit. A continuación se incorporaron 50 μ L de solución de Hu TNF- α biotinilada (*conjugado de biotina*) en cada pocillo, excepto el cromógeno en blanco. La placa fue agitada suavemente, y posteriormente cubierta e incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se descartó nuevamente el material (vertiendo la placa), lavando 4 veces con la solución de

lavado del kit e incorporando 100 μ L de la solución de trabajo de estreptavidina-HRP en cada pocillo, excepto en el cromógeno en blanco. La placa fue de nuevo cubierta e incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Tras descartar nuevamente el material no ligado, se procedió a un nuevo lavado y se incorporaron 100 μ L de cromógeno estabilizado en cada pocillo, comprobando el virado del color a azul. Se incubó durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se incorporó una solución de parada con 100 μ L en cada pocillo. La placa fue agitada suavemente para su homogeneización, comprobando el cambio de color desde azul a amarillo. Transcurridas 2 horas tras la adición de la solución de parada, la absorbancia de la solución fue determinada a 450 nm en un lector automático de ELISA TP-Reader NM (Thermoplate, China).

Se realizó una recta patrón con las concentraciones estándar de TNF- α suministradas en el kit (0-32 pg/mL). Los resultados de la detección de TNF- α en cada muestra experimental obtenidos en forma de densidad óptica fueron convertidos en concentración de acuerdo con dicha recta.

5.5.2.4 Determinación de IFN- γ

Se partió de un homogeneizado de linfocitos cultivados y del kit Human IFN- γ ELISA de Invitrogen (Invitrogen Corp., 542 Flynn Rd., Camarillo CA, USA) y se procedió conforme al protocolo del fabricante. Para la sensibilización de las placas se determinó en primer lugar el número de pocillos que serían utilizados (siempre analizando las muestras por duplicado). Se añadieron 50 μ L de patrones y muestras a cada pocillo. A continuación se incorporaron 50 μ L de conjugado anti-IFN- γ HRP a todos los pocillos, incubando durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 700 rpm. Transcurrido este tiempo se descartó el material vertiendo la placa y lavando 4 veces con la solución de lavado del kit. A continuación se incorporaron 200 μ L de cromógeno estabilizado en cada pocillo, en un plazo máximo de 15 min. Se incubó durante 15

min evitando la luz solar directa en agitador horizontal a 700 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, se incorporaron 50 μ L de solución de parada a cada pocillo. La absorbancia de la solución fue determinada a 450 nm y 490 nm (con filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 30 min en un lector automático de ELISA TP-Reader NM (Thermoplate, China).

Se realizó una recta patrón con las concentraciones estándar de IFN- γ suministradas en el kit (0-500 pg/mL). Los resultados de la detección de IFN- γ en cada muestra experimental obtenidos en forma de densidad óptica fueron convertidos en concentración de acuerdo con dicha recta.

5.5.2.5 Determinación de IL-10

Se partió de un homogeneizado de linfocitos cultivados y del kit BIOSOURCE IL-10 EASIA (Biosource Europe S.A., Nivelles, Bélgica) y se procedió conforme al protocolo del fabricante. Para la sensibilización de las placas se determinó en primer lugar el número de pocillos que serían utilizados (siempre analizando las muestras por duplicado). Se añadieron 100 μ L de solución B en los pocillos de patrones y controles, y 100 μ L de solución A a cada pocillo de muestras, pipeteando 100 μ L de patrón, control y muestras en su pocillo correspondiente. La placa fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente en agitador horizontal a 700 rpm. Se incorporaron 100 μ L de solución A, siguiendo con 50 μ L de conjugado anti-IL-10 en cada pocillo. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación horizontal a 700 rpm. Se aspiró el líquido de cada pocillo y se procedió nuevamente a lavar 3 veces con 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo retirando nuevamente el contenido. Se incorporaron 200 μ L de solución cromogénica recién preparada antes de transcurridos 15 min, incubando 30 min a temperatura ambiente en agitador horizontal (700 rpm) evitando luz solar directa. Finalmente, se incorporó una solución de parada con 50 μ L en cada pocillo. La absorbancia de la

solución fue determinada a 450 y 490 nm con filtro de referencia a 630 o 650 nm antes de 3 horas en un lector automático de ELISA TP-Reader NM (Thermoplate, China).

Se realizó una recta patrón con 6 concentraciones estándar de IL-10 suministradas en el kit (0-1335 pg/mL). Los resultados de la detección de IL-10 en cada muestra experimental obtenidos en forma de densidad óptica fueron convertidos en concentración de acuerdo con dicha recta.

5.6 Determinación del polimorfismo genético Ala16Val-SOD2

El polimorfismo Ala16Val-SOD2 se analizó tanto en el primer como el segundo protocolo de este trabajo. Los análisis de determinación del genotipo de la SOD2 fueron similares a los empleados por Gottlieb et al (2005)¹⁸ Para la realización del genotipado se recogió una muestra de sangre desde una vena periférica mediante el sistema de venoclisis con un dispositivo de vacío desechable y almacenada en tubos con EDTA al 0,1% (concentración final de 1 mg/dl). Posteriormente, el material recogido se mantuvo a 4 °C hasta la extracción de ADN durante 24 h. El ADN genómico fue aislado a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el kit GFX Genomic Blood DNA Purification kit (Amersham Biosciences Inc., Uppsala, Suecia).

La genotipificación de la SOD2 se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Se preparó un volumen total de 50 µl que contenía 1,25 µl de dNTP 10 mM, 0,5 µl con 5.0 µl de buffer 10x, 1,0 µl de MgCl₂ 25 mM, Taq DNA polimerasa (Gibco Inc.), 1,0 µl de 40 pmol de cada iniciador, 3,0 µl de ADN genómico (0,25 µg), 34,5 µl. Los iniciadores de amplificación (Gibco Inc., Co.) para un fragmento de 110 pb del gen SOD2 humano fueron

5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3' (cadena de sentido) y 5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3' (cadena antisentido) con parámetros de termociclador consistentes en un ciclo inicial a 95 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 1 min y 61 °C durante 1 min. El ciclo final fue seguido por un período adicional de 2 min a 72 °C. El producto de PCR (10 µl) fue digerido con *HaeIII* (15 U, a 37 °C durante 6 h, Gibco Inc., Billings, MO). Los productos de la digestión (23 y 85 pb) se visualizaron en un gel de agarosa al 6% (Amersham Biosciences Inc., Suecia) teñido con bromuro de etidio. Una mutación fue presentada por un desajuste del iniciador para crear un sitio de corte de restricción para *HaeIII* en el codón -9, de tal manera que fueron observados los genotipos siguientes: -9Ala/Ala (23 y 85 pb), -9Ala/Val (23,85 y 110 pb), y -9Val/Val (110 pb) (Figura 5.1).

Todos los genotipos fueron evaluados por al menos dos observadores ciegos. Cuando se encontró un conflicto en la identificación del genotipo (rara vez), el análisis de PCR-RFLP fue repetido y analizado de nuevo.

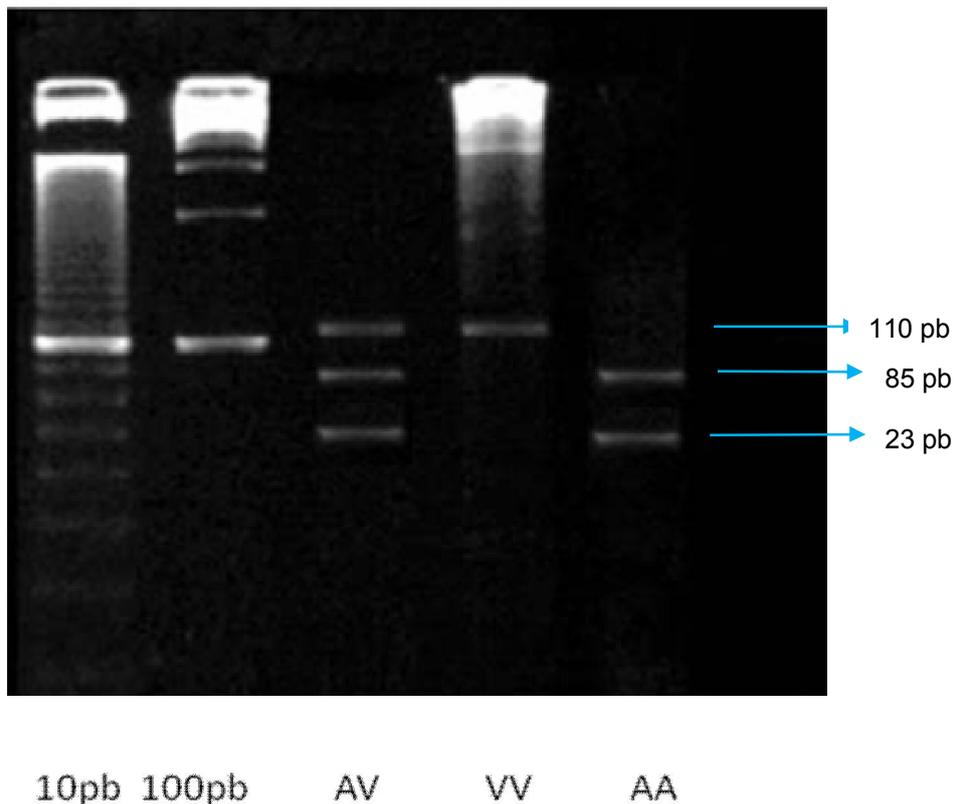


Figura 5.1 Electroforesis en gel de agarosa mostrando los productos de digestión con *HaeIII* de ADN humano con los diferentes polimorfismos Ala16Val-SOD2

5.7 Aspectos éticos

El Comité de Ética en Investigación de la Pontificia Universidad Católica do Rio Grande do Sul aprobó el protocolo de un estudio (N ° 537/02) y se obtuvo el consentimiento individual de todas las personas de las que se obtuvo la información de forma prospectiva.

El segundo protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Federal de Santa María. Todos los voluntarios firmaron un formulario de consentimiento (Anexo II). Los

procedimientos de estudio siguieron los preceptos de la Resolución 196/1996 de la Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

5.8 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS (versión 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL). En el primer análisis, investigando la asociación entre el polimorfismo Ala16Val del gen de la SOD2, se comparó la frecuencia alélica y genotípica mediante la prueba de χ^2 . La regresión logística (método *Forward Wald*) fue utilizada para investigar los posibles factores implicados. Todas las variables que presentaron significación estadística univariante se incluyeron en las pruebas ($P \leq 0,1$) (sexo, edad, diabetes, hipertensión, dislipemias, síndrome metabólico). Los valores de riesgo (*odds ratio*) e intervalos de confianza al 95% fueron asimismo calculados. Las concentraciones de LDL-ox y otras variables bioquímicas en obesos y no obesos frente a los diferentes polimorfismos génicos Ala16Val-SOD2 fueron comparadas utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba *post-hoc* de Bonferroni. En el segundo protocolo, fueron comparadas las concentraciones de glucosa y de citoquinas entre los diferentes genotipos del polimorfismo Ala16Val-SOD2 mediante el análisis de varianza de una vía seguido del test *post-hoc* de Tukey. El valor α considerado fue $P = 0,05$. Todos los valores de P fueron de dos colas.

6 Resultados

6.1 Protocolo 1

En la primera fase del estudio se evaluó un protocolo para investigar la posible asociación entre la obesidad y el polimorfismo Ala16Val-SOD2 en una amplia muestra de personas mayores, cuyas características generales se presentan en la Tabla 1.

Como se puede observar, el grupo de individuos obesos constaba de mayor número de mujeres y presentaba mayor prevalencia de diabetes tipo II y síndrome metabólico que el grupo de individuos no obesos.

Tabla 1. Características basales entre los individuos obesos y los controles no obesos. Las variables se expresan como media +/- desviación estándar o porcentaje del grupo.

	Obesos (n=301)	No obesos (n=514)	<i>p</i>	
Edad (años)	66,0±7,8	66,5±8,7	0,459	
Sexo (%)	Hombre	54 (17,9)	141 (27,4)	0,002
	Mujer	247 (82,1)	373 (72,6)	
IMC (Kg/m ²)	35,79±4,87	25,48±2,51	0,0001	
Circunferencia de cintura (cm)	100,10±9,3	88,52±9,17	0,0001	
Dislipidemia (%)	132 (43,9)	225 (43,8)	0,982	
Diabetes tipo II (%)	49 (16,3)	56 (10,9)	0,027	
Hipertensión (%)	159 (52,8)	259 (50,4)	0,502	
Síndrome metabólico(%)	84 (27,9)	11 (2,1)	0,001	

IMC = índice de masa corporal. *p* = estadístico de la prueba t de Student o Chi-cuadrado (variables categóricas). *n* = tamaño de la muestra.

El genotipo y la frecuencia del polimorfismo del gen Ala16Val-SOD2 se determinaron y se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Frecuencia alélica y porcentaje del polimorfismo del genotipo Ala16Val-SOD2 en sujetos obesos y controles no obesos.

Genética	Obesos	No Obesos
	n (%)	n (%)
Genotipos		
AA	30 (10,0)	95 (18,5)
VV	85 (28,2)	110 (21,4)
AV	186 (61,8)	309 (60,1)
Alelos		
A	0,4086	0,4854
V	0,5914	0,5146
Odds ratio (IC 95%)		
AA+ AV	1	1
VV	1,949 (1,223-3,008)	0,809 (0,720-0,910)

Valor de Chi cuadrado de Pearson = 12,774, $p = 0,002$. El grupo de control está en equilibrio de Hardy-Weinberg (valor de Chi-cuadrado = 4,115, $p = 0,1277$).

Las frecuencias del genotipo del grupo control se mostraron de acuerdo con la frecuencia esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que garantiza que la muestra es uniforme para los estudios genéticos de este tipo. Los resultados mostraron una asociación positiva entre los genotipos Ala16Val SOD2 y la obesidad. En este caso, los sujetos obesos presentaron una mayor

prevalencia del genotipo VV en comparación con los pacientes no obesos ($\chi^2 = 12,774$, $P = 0,002$).

El cálculo del efecto dosis-alelo en que se comparó la prevalencia de la obesidad entre los individuos VV y la suma de los individuos AA y AV confirmó esta asociación del genotipo, lo que sugiere que la mayor susceptibilidad a la obesidad se produce sólo en el genotipo VV en comparación con los genotipos AA y AV. Es decir, aparece una relación genética de recesividad en la asociación entre el polimorfismo Ala16Val-SOD2 y la obesidad ($\chi^2 = 4,090$, $P = 0,03$).

A continuación, se calculó la probabilidad de que un individuo obeso presentase el genotipo VV. El valor de riesgo (*odds ratio*) se determinó en 1,949 (95% IC: desde 1,223 hasta 3,008), lo que indica que los portadores del genotipo VV tienen casi el doble de probabilidades de ser obesos que los portadores de los otros genotipos. Un análisis adicional de regresión logística multivariante demostró que la asociación entre el genotipo VV y la obesidad es independiente de sexo, edad, diabetes, dislipidemia, hipertensión y síndrome metabólico ($P = 0,524$), es decir, no se ve afectada por estas variables.

A partir de estos resultados, también se realizaron análisis adicionales para ver si los genotipos del polimorfismo Ala16Val-SOD2 podrían influir en la conducta alimentaria. Es decir, si los individuos con desequilibrio oxidativo determinado genéticamente podrían buscar algún tipo de compensación a través de un comportamiento ingestivo diferente. El conjunto de resultados que se presenta en las tablas 3 y 4 muestran un indicio de influencia entre el polimorfismo y el comportamiento ingestivo.

A pesar de que las variables fisiológicas que aparecen en la Tabla 3 no presentan cambios debidos a la presencia de uno u otro genotipo, parece detectarse un descenso no significativo en la

concentración de triglicéridos y un aumento de presión arterial en los individuos que presentan el genotipo VV.

Tabla 3. Comparación de variables fisiológicas entre obesos y no obesos con diferentes polimorfismos del gen Ala16Val-SOD2.

Variables	SOD2	Obesos		No Obesos	
		Media	± SD	Media	± SD
Glucosa en ayunas (mg/dL)	AA	100,4	± 11,7	95,1	± 12,1
	VV	97,0	± 10,5	102,8	± 16,9
	AV	96,3	± 10,8	97,2	± 9,7
	Total	97,2	± 10,9	97,7	± 11,5
Colesterol (mg/dL)	AA	224,7	± 41,2	208,6	± 38,6
	VV	215,2	± 31,5	219,6	± 31,3
	AV	204,7	± 36,4	220,8	± 38,8
	Total	210,3	± 36,4	218,9	± 37,8
Triglicéridos (mg/dL)	AA	149,1	± 92,6	120,1	± 37,0
	VV	134,2	± 62,1	146,8	± 43,6
	AV	151,9	± 73,2	154,0	± 65,8
	Total	146,9	± 73,3	148,2	± 60,6
HDL-Colesterol (mg/dL)	AA	47,1	± 8,8	42,4	± 6,8
	VV	45,0	± 8,8	46,6	± 8,7
	AV	44,6	± 10,1	44,2	± 7,4
	Total	45,0	± 9,5	44,3	± 7,5
LDL-Colesterol (mg/dL)	AA	147,7	± 32,6	142,3	± 34,9
	VV	143,3	± 29,9	143,6	± 25,4
	AV	129,7	± 37,5	145,8	± 39,1
	Total	135,9	± 35,6	145,0	± 36,7
PAS (mmHg)	AA	145,9	± 38,6	148,9	± 24,0
	VV	153,1	± 24,1	144,0	± 15,1
	AV	149,9	± 27,3	147,4	± 31,0
	Total	150,2	± 28,3	147,1	± 28,2
PAD (mmHg)	AA	74,1	± 16,9	77,4	± 13,0
	VV	80,5	± 12,7	76,6	± 8,7
	AV	77,5	± 12,8	77,6	± 13,8
	Total	77,8	± 13,4	77,4	± 13,0

SD=desviación estándar, IMC=índice de masa corporal, PAS=presión arterial sistólica, PAD=Presión arterial diastólica. Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos ($p < 0,05$). ANOVA multivariante seguido del test post-hoc LSD.

Los resultados relativos a la ingesta de macronutrientes y micronutrientes por los voluntarios participantes en el estudio aparecen en la Tabla 4.

Puede apreciarse que los individuos obesos VV presentaron una menor ingesta calórica que los obesos AA, así como un menor consumo de lípidos que este genotipo. Además, los obesos VV y AV manifiestan índices significativamente más bajos de vitamina E y una tendencia hacia un menor consumo de ácido fólico que los individuos AA.

Sólo la ingesta de proteínas fue mayor en los individuos AA no obesos, mientras que otros parámetros nutricionales fueron similares en los voluntarios no obesos con diferentes polimorfismos Ala16Val-SOD2.

Tabla 4. Comparación de la ingesta de macro- y micronutrientes entre individuos obesos y no obesos con diferentes genotipos del gen Ala16Val-SOD2.

Ingestión en 24h	SOD2	Obesos		No Obesos		
		Media	± SD	Media	± SD	
Calorías (Kcal)	AA	1.907	± 307	a	1.216 ± 405	a
	VV	1.558	± 403	a	1.481 ± 555	a
	AV	1.666	± 534	a	1.671 ± 526	a
	Total	1.594	± 522		1.456 ± 34	
Carbohidratos (%)	AA	53	± 5	a	48 ± 7	a
	VV	60	± 15	b	54 ± 11	a
	AV	56	± 8	ab	55 ± 10	a
	Total	57	± 11		54 ± 10	
Proteínas (%)	AA	17	± 2	a	25 ± 5	a
	VV	17	± 5	a	20 ± 5	ab
	AV	20	± 3	a	19 ± 5	b
	Total	19	± 4		20 ± 5	
Lípidos (%)	AA	26	± 0	a	27 ± 7	a
	VV	22	± 8	b	25 ± 8	a
	AV	23	± 7	b	25 ± 9	a
	Total	24	± 6		26 ± 8	
Vitamina C (mg)	AA	135	± 144	a	144 ± 135	a
	VV	137	± 164	a	194 ± 57	a
	AV	86	± 66	a	123 ± 108	a
	Total	110	± 114		142 ± 125	
Ácido fólico (µg)	AA	377	± 91	a	377 ± 238	a
	VV	197	± 141	a	967 ± 359	a
	AV	258	± 175	a	306 ± 72	a
	Total	248	± 159		470 ± 152	
Retinol (µg)	AA	395	± 45	a	339 ± 4	a
	VV	787	± 775	a	819 ± 0,9	a
	AV	548	± 498	a	1,002 ± 0,2	a
	Total	620	± 586		881 ± 0,8	
Vitamina E (mg)	AA	6,9	± 1,0	a	4,1 ± 2,7	a
	VV	4,1	± 2,6	b	6,2 ± 5,7	a
	AV	3,5	± 1,7	b	7,6 ± 9,8	a
	Total	4,1	± 2,2		6,8 ± 8,4	

6.2 Protocolo 2

La segunda etapa del presente trabajo fue un estudio de cultivo *in vitro* de linfocitos con diferentes genotipos del polimorfismo Ala16Val-SOD2 y su influencia en el metabolismo de la glucosa y la expresión de citoquinas pro- y anti-inflamatorias.

Inicialmente se verificó si la tasa de consumo de glucosa fue similar o no entre los linfocitos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2.

El efecto del tratamiento con suplementación de glucosa e insulina fue evaluado en cada cultivo de linfocitos. Los resultados obtenidos en cuanto al consumo de glucosa tras 6 horas de tratamiento se presentan en la Tabla 5. Los resultados mostraron que, en el grupo control, los linfocitos heterocigóticos presentaron un menor consumo de glucosa que los homocigóticos. Asimismo, en todos los tratamientos los linfocitos VV presentaron un menor consumo de glucosa en comparación con los linfocitos AA y AV.

Los linfocitos VV suplementados con glucosa presentaron el menor consumo de glucosa, tanto respecto al grupo control como respecto al grupo suplementado solamente con insulina. Por lo tanto, el consumo de glucosa fue significativamente mayor en los linfocitos VV tratados sólo con insulina.

Tabla 5. Comparación del porcentaje de consumo de glucosa (media \pm SD) por linfocitos T procedentes de voluntarios no obesos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2 en medio de cultivo suplementado con glucosa e insulina.

Tratamientos	AA	VV	AV
C	87.3 \pm 0.9 ^a	86.5 \pm 0.8 ^a	82,4 \pm 0,4 ^b
G	97,4 \pm 1,7 ^b	81,7 \pm 0,4 ^c	98,2 \pm 1,0 ^b
I	91,0 \pm 1,0 ^c	85,1 \pm 0,5 ^a	90,4 \pm 0,8 ^c
GI	91,4 \pm 1,1 ^c	81,2 \pm 0,0 ^c	88,4 \pm 1,0 ^c
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001

SD = desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas evaluadas por ANOVA de una vía seguida de test *post-hoc* de Tukey. $p < 0,05$

Tabla 6. Concentración de citoquinas en linfocitos T de voluntarios no obesos con diferentes genotipos del gen Ala16Val-SOD2 para cada uno de los tratamientos experimentales.

Citoquina	Gen	C	G	I	GI
IL-1 (pg/ml)	AA	23,9 ± 1,8 ^a	23,3 ± 1,9 ^a	22,6 ± 1,6 ^a	21,3 ± 2,3 ^a
	VV	99,0 ± 2,0 ^b	90,5 ± 3,2 ^{b*}	93,3 ± 1,2 ^{b*}	96,6 ± 0,6 ^b
	AV	55,9 ± 2,5 ^c	54,0 ± 2,0 ^c	58,3 ± 0,6 ^c	50,0 ± 1,0 ^c
	Total	59,6 ± 32,7	56,0 ± 29,2	58,1 ± 30,6	56,0 ± 32,9
IL-6 (pg/ml)	AA	76,0 ± 2,1 ^a	67,7 ± 2,0 ^{a*}	69,3 ± 1,5 ^{a*}	70,1 ± 1,5 ^{a*}
	VV	122,7 ± 2,6 ^b	124,6 ± 1,5 ^b	131,7 ± 1,5 ^{b*}	134,0 ± 1,0 ^{b*}
	AV	87,3 ± 2,5 ^c	87,0 ± 1,0 ^c	87,7 ± 1,6 ^c	79,3 ± 2,1 ^{c*}
	Total	95,3 ± 2,2	93,1 ± 25,1	96,2 ± 27,8	94,5 ± 29,9
TNF-α (pg/ml)	AA	85,1 ± 3,7 ^a	82,8 ± 1,6 ^a	86,0 ± 2,6 ^a	89,1 ± 0,1 ^a
	VV	142,3 ± 9,3 ^b	147,1 ± 1,7 ^b	150,3 ± 0,6 ^b	154,8 ± 2,5 ^b
	AV	104,0 ± 3,0 ^c	101,0 ± 1,7 ^c	106,0 ± 1,7 ^c	106,7 ± 1,2 ^c
	Total	99,9 ± 13,4	110,3 ± 28,7	114,1 ± 28,6	116,8 ± 9,8
IFN-γ (pg/ml)	AA	80,0 ± 2,0 ^a	88,7 ± 1,6 ^{a*}	80,3 ± 1,5 ^a	80,1 ± 1,5 ^a
	VV	199,9 ± 1,1 ^b	223,7 ± 2,2 ^{b*}	221,3 ± 2,1 ^{b*}	225,0 ± 1,9 ^{b*}
	AV	158,3 ± 2,5 ^c	154,3 ± 2,6 ^c	148,0 ± 2,0 ^{c*}	157,7 ± 2,8 ^c
	Total	146,0 ± 52,1	146,0 ± 52,1	155,5 ± 58,4	154,2 ± 52,8
IL-10 (pg/ml)	AA	55,6 ± 2,5 ^a	55,0 ± 2,1 ^a	59,9 ± 2,0 ^a	64,7 ± 1,5 ^{a*}
	VV	34,6 ± 2,5 ^b	34,1 ± 2,0 ^b	36,7 ± 1,7 ^b	38,7 ± 1,9 ^b
	AV	55,0 ± 2,6 ^c	56,3 ± 2,5 ^c	59,6 ± 2,7 ^{c*}	65,0 ± 2,0 ^{c*}
	Total	48,3 ± 10,6	48,4 ± 10,8	52,1 ± 11,6	56,1 ± 13,1

SD = desviación estándar. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas mediante ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de Tukey. Un asterisco (*) indica diferencias significativas entre tratamientos. p < 0,05

A continuación fueron comparados las concentraciones de citoquinas entre los tres tipos genéticos de linfocitos para cada uno de los grupos experimentales (Tabla 6). Los resultados mostraron diferencias en la expresión de estas moléculas asociadas con el genotipo. Como se puede observar en la Tabla 6, las concentraciones de todas las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas (IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ) fueron mayores en los linfocitos VV que en linfocitos AA. En cuanto a los linfocitos AV, presentaron concentraciones intermedias entre los homocigotos.

Los tratamientos con suplementación de glucosa e insulina provocan asimismo diferencias en las concentraciones de citoquinas tras 6 horas de cultivo (Figuras 6.1-6.5).

En los linfocitos VV los tratamientos G e I provocaron un descenso significativo de la concentración de IL-1 (Figura 6.1).

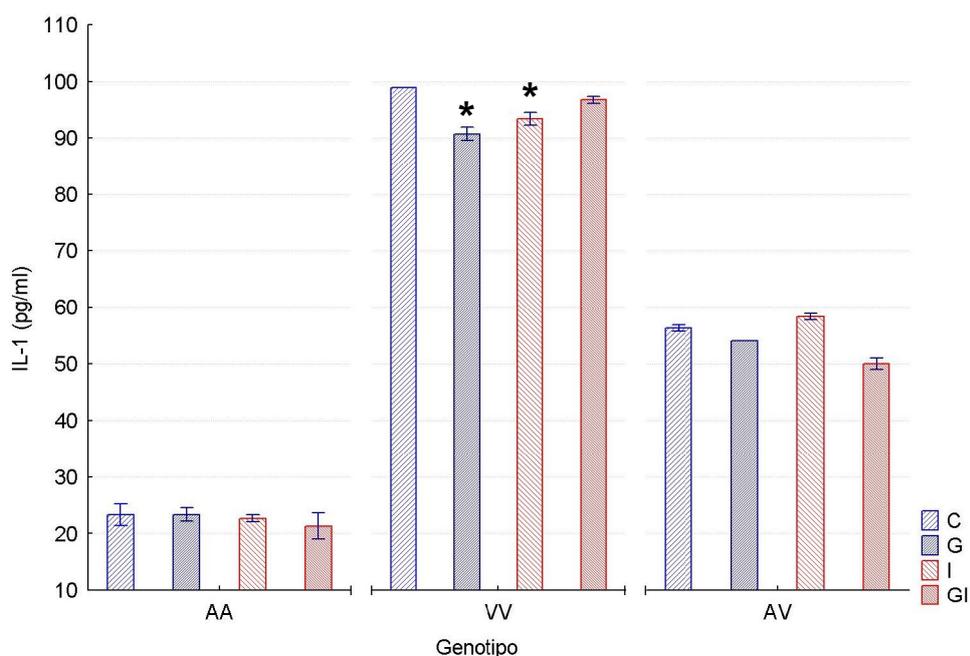


Figura 6.1 Producción de IL-1 por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina.

La concentración de IL-6 disminuye en los linfocitos AA y AV bajo suplementación conjunta de glucosa e insulina, mientras que aumenta en los linfocitos VV.

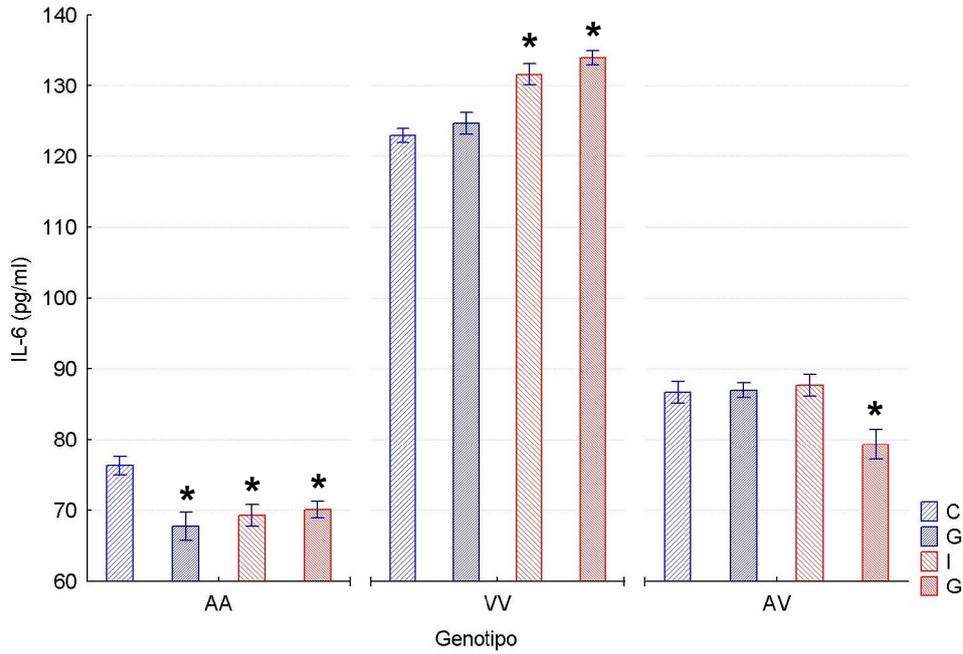


Figura 6.2 Producción de IL-6 por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina.

No se apreciaron diferencias significativas en la concentración de la citoquina TNF- α bajo los diferentes tratamientos experimentales (Figura 6.3).

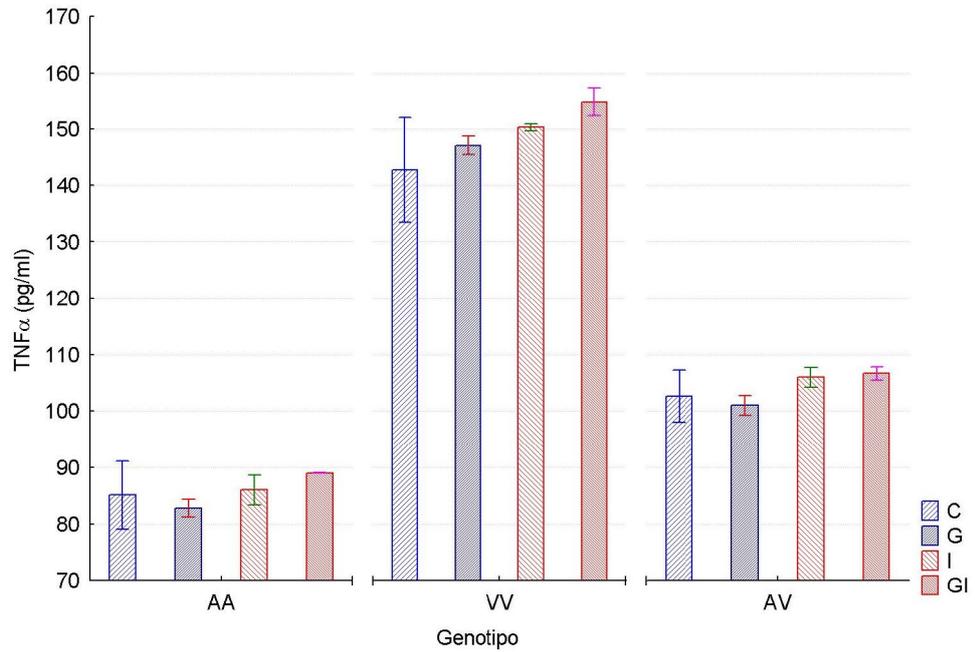


Figura 6.3 Producción de TNF α por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina.

Las concentraciones de Interferón gamma en los linfocitos VV aumentaron significativamente en todos los tratamientos experimentales. Asimismo, los linfocitos AA tratados con glucosa experimentaron un aumento en la concentración de IFN- γ , mientras que ésta disminuyó en los linfocitos AV tratados con insulina.

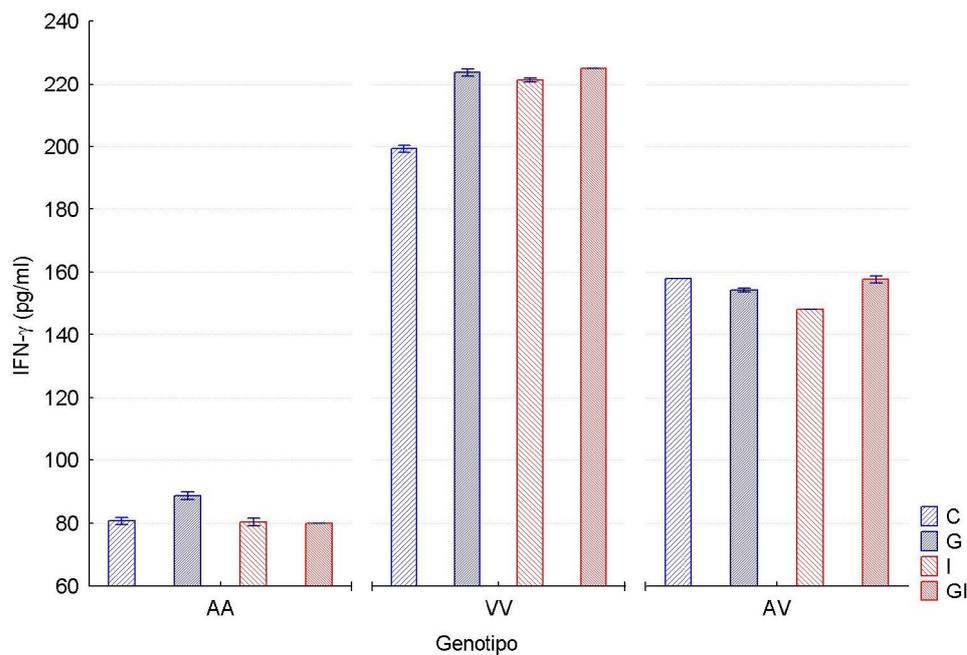


Figura 6.4 Producción de IFN- γ por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina.

Los linfocitos con genotipo VV presentan menores concentraciones de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 respecto a los genotipos AA y AV. La suplementación conjunta con glucosa e insulina (grupo GI) provoca un aumento en la concentración de IL-10 en los linfocitos AA y AV, y una tendencia al aumento en los linfocitos VV.

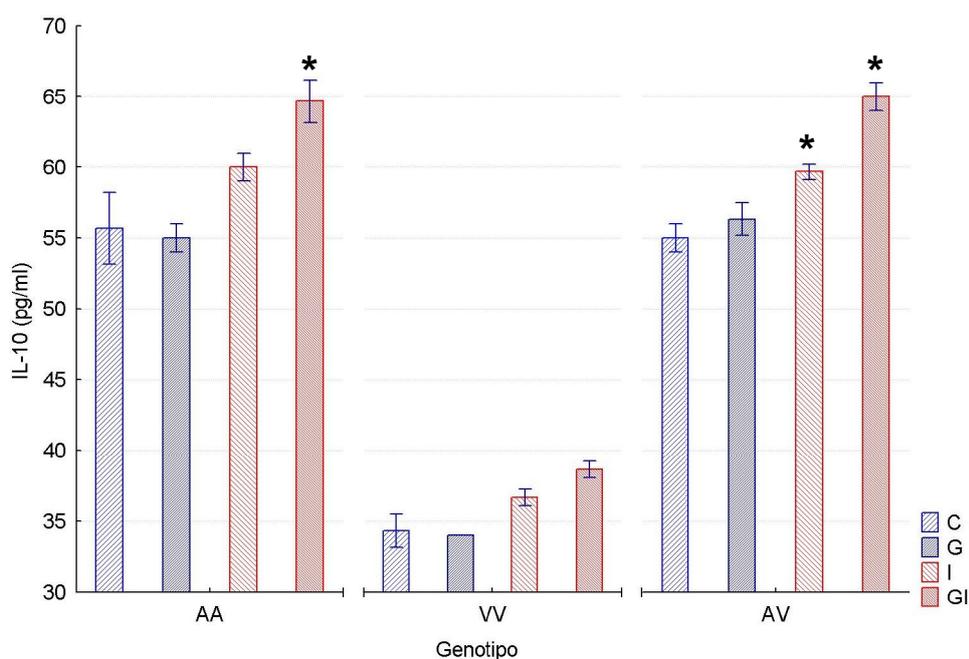


Figura 6.5 Producción de IL-10 por linfocitos T con diferentes genotipos de Ala16Val-SOD2 suplementados con glucosa e insulina.

Los resultados generales de la aplicación del Protocolo nº 2 indican que la tasa de absorción de glucosa y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias está influenciada por el polimorfismo Ala16Val-SOD2. Además, también hay indicios de que el consumo de glucosa se modula diferencialmente respecto a la presencia de glucosa e insulina adicional en el medio de cultivo.

7 Discusión

Este estudio describe por primera vez una asociación entre la obesidad y el polimorfismo Ala16Val del gen de la SOD2, con una interacción débil de estos dos factores teniendo en cuenta las variables biológicas relacionadas con el riesgo cardiovascular y patrones generales de la dieta. A pesar de las posibles limitaciones metodológicas, los resultados sugieren que existe una respuesta para una importante pregunta: ¿podría el estrés oxidativo causado por la exposición crónica a los radicales superóxido de modo genéticamente determinado dar lugar a patrones de obesidad en la misma forma que los patrones de obesidad inducen estrés oxidativo? Al parecer, la respuesta a esta pregunta es afirmativa.

Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la obesidad es el componente causal primario del síndrome metabólico y está relacionada con enfermedades crónicas, en especial la morbilidad cardiovascular. Estos hallazgos también son apoyados por estudios que demuestran que los adipocitos en los pacientes obesos presentan un mayor nivel de estrés oxidativo a través de la activación de la producción de especies reactivas del oxígeno y la inactivación de enzimas antioxidantes. Por ejemplo, Vassale et al. (2009)²³³ recientemente examinaron si la obesidad y el tabaquismo podrían ser factores causales de aumento en el estrés oxidativo asociado con la edad, encontrando una asociación positiva.

Dado que la obesidad está fuertemente asociada con una dieta rica en grasas y baja en alimentos antioxidantes, la idea de que el estrés oxidativo también pueda ser un factor causal que induce el estado de obesidad parece lógica. Por lo tanto, en este estudio se planteó si el portador de un genotipo que puede producir un desequilibrio en el estrés oxidativo también puede encontrarse en mayor riesgo para el desarrollo de la obesidad. Con este fin, se eligió el polimorfismo Ala16Val del gen de la SOD2 en base a estudios

previos llevados a cabo por distintos grupos de investigación que sugerían que los dos genotipos homocigóticos (AA, VV) podrían causar un desequilibrio oxidativo crónico al aumentar la producción de superóxido (VV) o la producción de peróxido de hidrógeno (AA).²³⁴

En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo han demostrado una asociación entre la obesidad y el genotipo VV independientemente de los posibles cambios metabólicos que podrían haber influido en esta asociación, como la diabetes tipo II. De este resultado se puede inferir que una retroalimentación positiva entre el estrés oxidativo crónico inducido por la grasa corporal, que a su vez amplificaría el estrés oxidativo, podría ser una posible explicación para la asociación observada.

Otras cuestiones relacionadas con los resultados presentados aquí incluyen el posible papel del desequilibrio del superóxido en la génesis de la obesidad. Se cree que el superóxido juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares, que están estrechamente relacionados con disfunciones como la hipertensión, la diabetes tipo II y la obesidad. En el sistema vascular el superóxido inhibe la acción biológica del NO, conocido como un factor de relajación endotelial, dando lugar a vasoconstricción. Añadido a este hecho, el superóxido afecta directamente a la función de las células endoteliales y de músculo liso vascular.²³⁵ Este efecto es estimulado en ciertas condiciones metabólicas como son los estados hiperglucémicos que inducen la producción de superóxido e inhiben la superóxido dismutasa por glicosilación no enzimática, conocida como reacción de Maillard.²³⁶ La hiperglucemia también aumenta la producción de superóxido endotelial.²³⁷

Una asociación entre la obesidad y la producción de superóxido ha sido puesta de manifiesto principalmente en relación con hormonas y moléculas relacionadas en el tejido adiposo y el metabolismo energético, como la leptina, la grelina, la orexina B y la

adiponectina. Tal vez la asociación entre el polimorfismo Ala16Val del gen de la SOD2 y la obesidad que se ha encontrado tenga un papel en la modulación de estas moléculas. Por lo tanto, se puede decir que la hipótesis que aquí se presenta sobre la posible relación causal del estrés oxidativo en la obesidad también está basada en recientes estudios experimentales relativos a estas sustancias.

Las pruebas obtenidas en estos estudios realizados en modelos experimentales sugieren una asociación entre la obesidad y el estrés oxidativo relacionado con la producción de superóxido. Lamentablemente, no hemos encontrado estudios que hayan investigado la influencia del estrés oxidativo en el desarrollo de la obesidad. Por esta razón, los resultados aquí presentados deben ser confirmados por otros modelos adicionales de investigación experimental, estudios caso-control en otras poblaciones y ensayos clínicos, sin excluir enfoques nutrigenéticos.

La producción de hormonas y moléculas reguladoras como la leptina y la adiponectina, que desencadenan estrés oxidativo²³⁸ causado por la acumulación crónica de superóxido y que potencialmente se produciría en los portadores VV, podría actuar en la regulación de estas moléculas para inducir un estado de obesidad. En este caso, puede establecerse un circuito de retroalimentación positiva como ha sido revisado con anterioridad.

En concreto, un desequilibrio inicial en la producción de superóxido puede modular el metabolismo de apetito y de energía en las moléculas reguladoras, aumentando la susceptibilidad a la obesidad. Dado que no se produce obesidad en todos los pacientes con VV, podemos pensar que existen otras variables genéticas y/o ambientales que influyen en este proceso. Para minimizar estos factores ambientales de confusión se han investigado aquí individuos obesos y no obesos aparentemente sanos, con edad igual o superior a 50 años que tenían un estilo de vida bien establecido, especialmente en relación a la dieta. Los individuos jóvenes no

presentan estos hábitos alimentarios bien establecidos, ya que varían ampliamente su dieta de acuerdo a sus condiciones de trabajo y a la disponibilidad de acceso.²³⁹

Puesto que se ha encontrado una asociación significativa entre el polimorfismo Ala16Val y la ingesta de macro y micronutrientes, se puede especular que la asociación entre la obesidad y el polimorfismo estudiada aquí también podría implicar la conducta alimentaria, en especial los comportamientos de selección de alimentos pero no necesariamente la regulación del apetito, evaluado en este caso por la mayor ingesta de calorías.

Sin embargo, a la vista de los resultados descritos se necesitan estudios adicionales para determinar cómo afecta el polimorfismo a la elección de los alimentos. En relación al primer protocolo de esta tesis, también es importante tener en cuenta algunas cuestiones relacionadas con el diseño metodológico.

Dado que la obesidad está fuertemente relacionada con otros trastornos metabólicos, los investigadores buscan una asociación entre gen y obesidad teniendo en cuenta estas otras morbilidades como variables intervinientes. De hecho, muchos estudios prefieren incluir a todos los individuos en un estudio y hacer más adelante exclusiones en ocasión del análisis estadístico. Obviamente, este enfoque aumenta el tamaño de la muestra y permite una potencia estadística más consistente. Sin embargo, el gran número de variables incluidas en el estudio y el gran número de asociaciones estadísticas positivas que a menudo aparece, hace muy difícil discutir los resultados en términos biológicos.

A pesar de las posibles limitaciones epidemiológicas de este estudio, los resultados descritos se pueden considerar importantes en términos clínicos, ya que plantean la posibilidad de que los alimentos ricos en antioxidantes (frutas y verduras) pueden jugar un papel anti-obesidad.

Basándonos en los resultados de esta primera fase del estudio se discutirán a continuación los resultados descritos en la segunda fase.

Inicialmente se comparó el consumo de glucosa y las concentraciones de citoquinas entre linfocitos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2. Los resultados descritos en la Tabla 5 muestran que el consumo de glucosa en condiciones control, esto es, con glucosa 10 mM en el medio de cultivo, fue menor en los linfocitos AV, seguido por los linfocitos homocigóticos AA y VV. Sin embargo, esta situación cambió cuando se incorporó al medio de cultivo glucosa 15 mM e insulina 5 mM, ya que los linfocitos VV presentaron menor captación de glucosa en el medio enriquecido con mayor concentración de glucosa, y los linfocitos AA y AV presentaron el comportamiento contrario, es decir, mayor captación de glucosa. Tales diferencias sugieren que el metabolismo glucídico está directamente influido por el metabolismo oxidativo, en especial por la eficiencia de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (genotipo AA).

Hasta donde sabemos, éste es también el primer estudio que describe la influencia del gen en el metabolismo oxidativo en cuanto al consumo de glucosa y las concentraciones de citoquinas de los linfocitos. Aunque el consumo de glucosa en los linfocitos T del grupo control fue similar entre los genotipos homocigotos AA y VV del polimorfismo Ala16Val de la SOD2, las concentraciones de citoquinas fueron radicalmente diferentes, presentando diferencias relacionadas con el genotipo de los linfocitos (Tabla 6).

Las diferencias encontradas en el consumo de glucosa por los linfocitos de diferentes genotipos del polimorfismo Ala16Val de la SOD2 pueden estar relacionadas con los cambios que se producen en estas células en presencia de un aumento de la concentración de glucosa en el medio. Stentz et al. (2005)²⁴⁰ investigaron linfocitos T activados por PHA (de forma análoga a nuestro estudio) y

encontraron aumento en la expresión de receptores para factores de crecimiento, GLUT4, IRS-1, citoquinas pro-inflamatorias y componentes de estrés oxidativo cuando se incorporaron al medio concentraciones de 15 y 30 mM. Este estudio refuerza la hipótesis de que el metabolismo oxidativo puede influir en el metabolismo glucídico y la inflamación. Siguiendo estos resultados, podría parecer que la deficiencia en la enzima SOD2 alteraría la tasa de captación de glucosa por los linfocitos T portadores del genotipo VV bajo la presencia adicional de glucosa e insulina. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios para elucidar estos aspectos tanto en linfocitos como en adipocitos.

El estudio encontró que los linfocitos VV presentaban un nivel más elevado de todas las citoquinas pro-inflamatorias, lo que sugiere un patrón *in vitro* similar a la bioquímica y la fisiología de la obesidad y la diabetes mellitus tipo II. Esto se debe a que estudios previos han mostrado que muchas de las citoquinas investigadas aquí presentan concentraciones más elevadas en presencia de obesidad y diabetes.²⁴¹ Este fenómeno está relacionado con la observación de que el tejido adiposo juega un papel importante en el estado inflamatorio de bajo grado asociado a la obesidad y diabetes. En estos términos, una serie de citoquinas pro-inflamatorias han sido identificadas en el tejido adiposo de los obesos, incluyendo TNF- α , IL-1, IL-6.^{242,243,244} Las citoquinas TNF- α e IL-1 inducen la expresión local y la secreción de grandes cantidades de IL-6 aumentando las concentraciones de esta citoquina en la circulación sistémica. Se ha descrito que tanto TNF- α como IL-6 interfieren con la señalización de la insulina, lo que parece conducir a un trastorno del metabolismo de la glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético.^{245,246} Dado que en el primer estudio llevado a cabo aquí se encontró asociación entre genotipo VV y obesidad, el segundo estudio que describe las concentraciones elevadas de estas proteínas proinflamatorias apoya la posible influencia del metabolismo oxidativo influido genéticamente en el proceso obesidad-inflamación.

También es interesante observar los resultados relativos a la citoquina IL-10. Se trata de una citoquina anti-inflamatoria que juega un papel crucial en la regulación del sistema inmune innato. A pesar de sus propiedades anti-inflamatorias, los estudios han descrito que en algunos individuos obesos las concentraciones de IL-10 son más elevadas.²⁴⁷ En linfocitos periféricos de sujetos obesos se observan concentraciones anormales de citoquinas, con disminución de los niveles de transcripción de estas citoquinas, tanto en linfocitos frescos como en cultivo. Estos resultados sugieren que los cambios relacionados con la obesidad en la inmunidad se reflejan en la función de los linfocitos de sangre periférica.^{247, 248}

Por otra parte, un estudio en seres humanos demostró que se produce una interacción entre los adipocitos y los linfocitos T en la obesidad, ya que se demostró que el grado de adiposidad se correlaciona positivamente con la acumulación de linfocitos en el tejido adiposo.²⁴⁹

En un estudio *in vitro* por Rubinstein et al.²⁵⁰ donde se efectuó pre-incubación de las células de ganglios linfáticos y bazo en un medio que contenía una concentración elevada de glucosa (0,5, 1, 2 g%) se observó una disminución significativa en la proliferación selectiva de linfocitos T y B inducida por mitógenos a dosis altas de glucosa. Los autores también encontraron que las concentraciones elevadas de glucosa disminuían la viabilidad celular mediante el aumento de la apoptosis y la inducción de un cuadro de estrés oxidativo linfocitario. A partir de estos resultados, los autores subrayaron que el aumento del estrés oxidativo podría estar implicado en este efecto nocivo. En este sentido, nuestros resultados están en esta misma línea, dado que los linfocitos VV, con mayor sensibilidad al estrés oxidativo, son los que menor consumo de glucosa presentan.

Se sabe que las especies reactivas del oxígeno (EROs) son subproductos de los procesos metabólicos normales de la célula y

en bajas concentraciones presentan funciones fisiológicas,²⁵¹ entre las que se cuentan la activación y proliferación de los linfocitos.²⁵² Sin embargo, el desequilibrio crónico causado por el polimorfismo Ala16Val-SOD2 podría exponer a los linfocitos a un contexto que daría lugar a la interrupción de la homeostasis celular, aumentando la susceptibilidad hacia enfermedades no transmisibles como la obesidad y la diabetes o incluso la evolución de complicaciones de salud relacionadas con estas enfermedades. Ejemplos que apoyan esta idea han sido descritos en la literatura.²⁵³

Los estudios realizados por otros grupos también han descrito resultados importantes que corroborar la hipótesis de que el desequilibrio de la superóxido dismutasa afecta la homeostasis de la glucosa y tiene que ver con complicaciones de salud asociadas con la diabetes. Rosen et al. (2001)²⁵⁴ encontraron una asociación significativa entre los pacientes daneses con diabetes tipo I y nefropatía diabética y el alelo V del polimorfismo Ala16Val-SOD2 independientemente de la edad, el inicio de la diabetes, el sexo, el tabaquismo o la duración de la diabetes. Los autores sugieren que este polimorfismo puede estar involucrado en el desarrollo de la nefropatía causada por la diabetes tipo I y es predictivo de enfermedad cardiovascular. Otros estudios también han descrito una asociación entre el polimorfismo Ala16Val-SOD2 y complicaciones relacionadas con la diabetes. Hovnik et al. (2010)²⁵⁵ describieron una asociación positiva del genotipo VV con retinopatía diabética. Liu et al. (2009) observaron un mayor riesgo de nefropatía diabética en pacientes diabéticos chinos portadores del genotipo VV en comparación con los AA y AV.²⁵⁶ En otro estudio, Nakanishi et al. (2008) describieron un mayor riesgo en los portadores del genotipo VV para el desarrollo de diabetes tipo II en japonés-americanos.²⁵⁷

Por lo tanto, se puede afirmar que en los últimos años un creciente número de informes han mostrado que el aumento de estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de anormalidades

en la hiperglucemia y la diabetes.²⁵⁸ Los resultados sugieren que la hiperglucemia no sólo genera EROs, sino también atenúa los mecanismos antioxidantes, generando un estado crónico de estrés oxidativo.^{259, 260} En cuanto a la función específica de los linfocitos, los estudios anteriores sugieren que el estrés oxidativo puede jugar un importante papel patogénico en el desarrollo de la inmunodeficiencia.^{261,262}

Sin embargo, los estudios epidemiológicos tienen algunas limitaciones en lo que respecta a las variaciones culturales, ambientales y genéticas de la población de estudio que pueden afectar a los resultados. Es por esta razón que se realizó un estudio adicional *in vitro* de algunos aspectos relacionados con el estrés oxidativo crónico generado por un factor genético. En un estudio *in vitro* previamente realizado se observó que los linfocitos VV mostraron una mayor peroxidación lipídica que los otros dos genotipos en tanto que los linfocitos AA tendían a presentar mayores daños en el DNA.²¹⁶

En el presente estudio también hemos encontrado que un desequilibrio en el metabolismo oxidativo causado genéticamente parece influir en la respuesta diferencial al tratamiento de glucosa e insulina, y lo más importante, las concentraciones de citoquinas previamente asociadas con la obesidad y la diabetes. Puesto que en los protocolos para el cultivo celular podemos eliminar la mayor parte de los factores ambientales, especialmente la influencia de los compuestos antioxidantes incluidos en la dieta, estos resultados corroboran la idea de que el estrés oxidativo influido genéticamente puede ser un factor causal de alteraciones metabólicas asociados a la susceptibilidad de enfermedades metabólicas.

Sin embargo, la naturaleza de estas diferencias metabólicas deben ser aclarados en futuros estudios que comparen, por ejemplo, los linfocitos con diferentes genotipos Ala16Val-SOD2 obtenidos a

partir de individuos no-obesos y obesos, así como en estudios *in vitro* que relacionen este polimorfismo y los cultivos de adipocitos.

Sobre la base de las pruebas obtenidas en los dos protocolos experimentales de esta tesis se sugiere que el estrés oxidativo crónico determinado genéticamente puede ser un factor causal en la génesis de la obesidad. Creemos que el planteamiento de futuros estudios relacionados principalmente con enfoques *in vitro* sobre adipocitos cultivados permitirá aclarar la dinámica y los mecanismos fisiológicos asociados con este proceso.

8 CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

El análisis de la asociación epidemiológica entre la obesidad y el polimorfismo Ala16Val-SOD2 demuestra una mayor prevalencia de portadores del genotipo VV en el grupo de individuos obesos.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La interacción entre el polimorfismo Ala16Val-SOD2 y la obesidad en patrones del comportamiento alimentario indica que el genotipo influye en la elección de alimentos ricos en algunos micronutrientes y macronutrientes, pero no en la ingesta calórica total, mostrando los individuos obesos VV y AV una menor ingesta de vitamina E y lípidos que los individuos obesos AA.

CONCLUSIÓN TERCERA

En pacientes no obesos con diferentes polimorfismos Ala16Val-SOD2, sólo la ingesta de proteínas fue mayor en los individuos AA, mientras que otros parámetros nutricionales fueron similares, por lo que no se sugiere que la influencia de este polimorfismo se ejerza a través de la regulación diferencial del apetito.

CONCLUSIÓN CUARTA

Transcurridas 72 horas de cultivo y después del tratamiento durante 6 horas en medios de cultivo tamponados con concentraciones conocidas de iones y glucosa, los linfocitos extraídos de individuos no obesos con los genotipos AA y VV presentaron un mayor consumo de glucosa que los AV.

CONCLUSIÓN QUINTA

Los linfocitos extraídos de individuos no obesos con el genotipo VV presentan concentraciones elevadas de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IFN γ y TNF- α en comparación con los linfocitos de los otros genotipos. Los linfocitos AA presentaron la concentración más baja de estas citoquinas.

CONCLUSIÓN SEXTA

Los linfocitos procedentes de individuos no obesos con el genotipo VV presentan las menores concentraciones de la citoquina anti-inflamatoria IL-10.

9 Anexos

ANEXO I -QUESTIONÁRIO IDOSOS GRAVATAÍ-		
ID - IDENTIFICAÇÃO: Data: ____/____/____	Nº cadastro: _____	
1. Nome: _____	2. Naturalidade ^(cidade) : _____	
3. Endereço: ^(completo) _____	4. Tel.: _____	
5. Estado civil: _____	6. Tempo moradia em Gravataí: [1] até 1 ano [2] 1-5 anos [3] 5+ anos	
7. Data de nascimento: ____/____/____	8. Idade: _____	9. Sexo: [0] Homem [1] Mulher
10. Etnia ^(origem) : _____	11. Está aposentado? [] sim [] não	
12. Atividade atual: _____	13. Atividade anterior: _____	

DS - DADOS SOCIOECONÔMICOS E CULTURAIS E COMPOSIÇÃO FAMILIAR:		
14. Escolaridade:		
[1] Alfabetizado	[2] Não alfabetizado	[3] Estudo doméstico
[4] 1º grau incompleto (primário)	[5] 2º grau incompleto (ginásio)	[6] Superior incompleto
[7] 1º grau completo (primário)	[8] 2º grau completo (ginásio)	[9] Superior completo
15. Moradia: [1] Própria [2] Alugada [3] Mora com outro(s)		
16. Renda (em salários mínimos):		
[1] Dependente (sem renda)	[2] até 2	[3] 2-4
[4] 4-6	[5] 6-10	[6] mais que 10
17. Número de filhos: _____	18. Número de filhos vivos: _____	
19. Com quem vive?		
[0] Cônjuge	[1] Parentes	
[2] Sozinho	[3] Outros	
20. Convivência com a família:		
[0] sim	[1] não	

CA – COMPORTAMENTO ALIMENTAR:		
21. Quantas vezes por semana você toma o café da manhã?		
[1] 1-2	[3] 5-6	[5] nunca
[2] 3-4	[4] todos os dias	
22. Em geral, quantas refeições você faz durante um dia?		
[1] 1-2	[3] 5 ou mais	
[2] 3-4		
23. Suas refeições são realizadas em horários REGULARES?		
[0] sim	[1] não	
24. Quantos copos de <u>ÁGUA</u> você costuma ingerir DIARIAMENTE (copo ~250mL) ^{(somente água)?}		
[1] até 3	[3] 7-8	
[2] 4-6	[4] mais que 8	

EV - ESTILO DE VIDA:

25. Quanto a atividade física, você pratica:

- [0] Atividade profissional/esportiva intensa [1] Atividade profissional/esportiva moderada
 [2] Atividade profissional/esportiva leve [3] Atividade profissional sedentária/esportiva moderada
 [4] Atividade profissional sedentária/pouca atividade esportiva [5] Inatividade física

26. Se pratica atividade física, que tipo? ^(principal) _____ (Ex.: caminhada, natação ...)

27. Quanto ao tabagismo, você:

- [0] nunca fumou [1] ex-fumante (há mais 1 ano) parou a qto tempo.....

Se fuma, a quanto tempo? N. cig/dia.....

- [2] menos de 10 cigarros/dia [3] fuma 10-20 cigarros/dia
 [4] fuma 21-30 cigarros/dia [5] fuma 31-40 cigarros/dia

RC – RISCOS CARDIOVASCULARES:

28. Por quantos anos você fumou pelo menos 1 cigarro/dia? _____ x 7,5 = _____

29. Algum médico já lhe disse que você tem angina ou teve ataque do coração? Se sim + 265 pontos = _____

30. Algum médico já lhe disse que você tem diabetes? Se sim + 150 pontos = _____

31. Você já teve dor no peito quando subiu lomba ou correu? Se sim + 150 pontos = _____

32. Algum dos seus pais morreu de problemas do coração (antes dos 60 anos)? Se sim + 80 pontos = _____

33. Se sim, qual o problema? _____

34. Média da pressão arterial sistólica (utilizar o item 42): mmHg x 4,5 = _____

35. Score: _____

36. Quanto à antecedência familiar de risco coronariano:

- [0] Ausente
 [1] Pai ou mãe com mais de 60 anos, com doença coronariana
 [2] Pai e mãe com mais de 60 anos, com doença coronariana
 [3] Pai ou mãe com menos de 60 anos, com doença coronariana
 [4] Pai e mãe com menos de 60 anos, com doença coronariana
 [5] Pai e mãe e irmão de ambos com doença coronariana

PL - PERFIL LABORATORIAL/DADOS ANTROPOMÉTRICOS:

37. Glicose: _____ (mg/dL) 38. Colesterol total: _____ (mg/dL)

39. Triglicerídeos: _____ (mg/dL) 40. HDL: _____ (mg/dl) 41. LDL: _____ (mg/dL)

42.1. PA Sistólica: _____ mmHg 42.2. PA diastólica: _____ mmHg

43.1. PA Sistólica: _____ mmHg 43.2. PA Diastólica: _____ mmHg

44. Impedância biolétrica: _____ % _____ Kg

45. Peso: _____ (Kg) 46. Altura: _____ (cm)

47. Cintura: _____ (cm) 48. Quadril: _____ (cm)

ME – MEDICAÇÃO:

48. Você toma algum remédio diariamente?

- [0] sim [1] não

(0) indicação médica (1) conta própria

49. Se sim, quais? _____

50. Quantos medicamentos por dia? [1] Nenhum [2] até 2 [3] 2-4 [4] 4-6 [5] mais que 6

AG – AVALIAÇÃO GLOBAL DE SAÚDE:

51. Como define sua saúde? [1] muito boa [2] boa [3] regular [4] ruim [5] muito ruim

52. Como define sua vida? [1] muito boa [2] boa [3] regular [4] ruim [5] muito ruim

53. Consultou com algum médico no último ano? [0] sim [1] não

⇒ Citar "limão, chave, avião" e pedir para o paciente repetir e memorizar.

54. Sente-se triste ou deprimido(a) com frequência? [0] sim [1] não

55. Como define sua visão? [1] muito boa [2] boa [3] regular [4] ruim [5] muito ruim

56. Como define sua audição? [1] muito boa [2] boa [3] regular [4] ruim [5] muito ruim

57. Pedir para repetir as 3 palavras (limão, chave, avião). Recordou: [1] três [2] duas [3] uma [4] nenhuma

Atividade de vida diária - AVD:

58. Consegue tomar banho sozinho? [0] sim [1] não

59. Consegue escolher as roupas e se vestir sem nenhuma assistência, exceto para calçar sapatos? [0] sim [1] não

60. Consegue deitar-se ou levantar-se de uma cama, ou sentar-se em uma cadeira sem ajuda? [0] sim [1] não

61. É capaz de ir ao banheiro, usá-lo, organizar as roupas, e retornar sem nenhum auxílio? [0] sim [1] não

62. É capaz de alimentar-se sem assistência? (exceto para cortar carne ou passar manteiga no pão) [0] sim [1] não

63. Score: _____ (0 = independente; <1 = dependente)

64. Possui autocontrole do intestino e/ou bexiga? [0] sim [1] não

*Nutritional Screening initiative - NSF:***Pontos**

65. É portador de alguma doença que limite a comida ingerida? [1] sim [2] não (2)

66. Tem comido menos quantidade ultimamente, falta de apetite? [1] sim [2] não (3)

67. Come poucas frutas, verduras e/ou produtos lácteos? [1] sim [2] não (2)

68. Bebe mais de três copos de cerveja, vinho ou licor por dia? [1] sim [2] não (2)

69. Tem problema bucal ou de dentição que dificulte a alimentação? [1] sim [2] não (2)

70. Possui condições financeiras para comprar alimentos? [1] sim [2] não (4)

71. Faz as refeições sozinho na maior parte das vezes? [1] sim [2] não (1)

72. Ingera 3 ou mais remédios sob prescrição médica ou não por dia? [1] sim [2] não (1)

73. Emagreceu ou engordou pelo menos 5 Kg nos últimos 6 meses? [1] sim [2] não (2)

74. Possui algum problema de saúde (físico) que lhe incapacite de fazer compras?(alimento) [1] sim [2] não (2)

79. Score: _____ (0 = risco baixo (até 3 pontos); 1 = risco moderado (4-6 pts); 2 = risco alto (>6 pts))

Historia Neoplasia

80. Voce já teve ou tem algum tipo de câncer? 1() sim 0 () não

Que tipo?..... Quando foi o diagnostico?.....fez tratamento?..... Tipo de tto?.....

81. Já fez mamografia? 1() sim 0 () não

82. Já fez biopsia de mama? 1() sim 0 () não

Avaliação de Osteoporose:

83. já teve algum tipo de fratura? 1() sim 0 () não quantas?.....

84. que tipo?..... há qto tempo?.....

85. Tem história familiar de fratura? 1() sim 0 () não

86. Que grau de parentesco com o familiar?.....

ANEXO II

**MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO
INFORMAÇÕES AO VOLUNTÁRIO
PROJETO GRAVATAÍ-RS**

Aditivo nº001"

O projeto de pesquisa "Projeto Gravataí-RS", tem como objetivo geral avaliar os fatores de risco à doenças associadas a idade, através de análises clínicas e bio-psico-sociais (exame físico, perfil lipídico, glicemia, fatores genéticos incluindo o gene da enzima sod2 e entrevista), pois o aparecimento de muitas doenças pode depender não somente dos genes, mas também do modo de vida que a pessoa possui. Esta pesquisa faz parte do Programa Genesis que realiza um estudo longitudinal no qual, daqui para frente, você será voluntário (a).

As análises serão feitas no Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular do IGG-PUCRS. Todos os resultados obtidos na avaliação clínica e bioquímica ficarão guardados no laboratório, podendo a qualquer momento ser consultados e/ou retirados da pesquisa caso haja desistência da sua participação como voluntário (a). Você tem a liberdade de abandonar a pesquisa, sem que isto leve a qualquer prejuízo posterior.

Os benefícios imediatos serão muitos, já que os resultados desta avaliação servem como uma revisão médica gratuita além de aquisição de conhecimentos sobre envelhecimento bem sucedido (prevenção). No caso de detecção de qualquer alteração na sua saúde, nós o(a) encaminharemos para atendimento médico apropriado, através dos órgãos de saúde ligados à Secretaria Municipal de Saúde de Gravataí-RS.

Os pesquisadores envolvidos no Projeto garantem a você o direito a qualquer pergunta e/ou esclarecimentos mais específicos dos procedimentos realizados e/ou interpretação dos resultados obtidos nos exames.

Esta pesquisa será de grande importância para a população gaúcha e brasileira já que a cidade de Gravataí.-RS apresenta um perfil de cidade metropolitana similar a outras cidades do RS propiciando o estabelecimento de programas de saúde que visem melhorar a qualidade de vida da população.

Após ter recebido todas as informações relacionadas ao estudo eu, _____ portador da CI _____ certifico que o Dr. _____ respondeu a todas as minhas perguntas sobre o estudo e minha condição, e eu, voluntariamente, aceito participar dele, pois reconheço que:

1º) Foi-me fornecida uma cópia das informações ao paciente, a qual eu li e compreendi por completo.

2º) Fui informado dos objetivos específicos e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos riscos ou desconforto previstos, tanto quanto os benefícios esperados.

3º) Está entendido que eu posso retirar-me do estudo a qualquer momento, e isto não afetará meus cuidados médicos ou de parentes meus no presente e no futuro.

4º) Entendi que ao participar do estudo responderei a um questionário adicional, serei examinado (a) clínica e laboratorialmente. O desconforto que poderei sentir é o da picada da agulha e a formação de um pequeno hematoma.

5º) Todas as informações a meu respeito serão confidenciais.

6º) Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

7º) Foi-me garantido que não terei gastos em participar do estudo.

8º) Foi-me dada a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou qualquer dúvida acerca dos riscos e benefícios da pesquisa e o meu tratamento. Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, poderei contatar com os Pesquisadores integrantes da equipe de pesquisa do Programa Genesis.

junto ao Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular pelo telefone 3203000 ramal 2660. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado(a) pela minha participação, poderei contatar com estes mesmos pesquisadores neste mesmo telefone .
Concordo que os meus dados clínicos obtidos neste estudo sejam documentados em trabalhos científicos e de divulgação do estudo e seus benefícios .
Declaro, ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

NomedoPaciente: _____

Assinatura do Paciente/Representante legal: _____

Data _____

Este formulário foi lido para _____ em __/__/__,

Porto Alegre- RS, por _____

Nome da testemunha _____

Assinatura da Testemunha _____

Data: _____

 Sendo este estudo longitudinal, cada vez for solicitada a minha participação em novas atividades de investigação, os pesquisadores responsáveis me informarão o tipo de trabalho a ser desenvolvido com um breve resumo que será assinado por mim e anexado a este Consentimento Informado.

10 Referencias

- ¹ Avogaro A, de Kreutzenberg SV. 2005. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta*, 360(9): 26. 2.
- ² Bayraktutan U. 2002. Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabetes Obes Metab*, 4: 224–238.
- ³ Kim S, Popkin BM. 2006. Commentary: understanding the epidemiology of overweight and obesity—a real global public health concern. *Int J Epidemiol*, 35: 60-67.
- ⁴ Shi Y, Vanhoutte PM. 2009 Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *J Diabetes. Sep*; 1(3):151-62.
- ⁵ Higdon JV, Frei B. 2003. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 365–367.
- ⁶ Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. 2007. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*, 9: 813–839.
- ⁷ Johnson P. 2002. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 133: 493–505
- ⁸ Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radic Biol Med*, 33: 337–349.
- ⁹ Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y. 1996. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 226: 561–565.
- ¹⁰ Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C. 2003. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*, 13: 145–157.

- ¹¹ Taufer M, Peres A, Andrade VM, Oliveira G, Sá, do Canto MEP, Santos AR, Bauer ME, IBM Cruz. 2005. Is the Val16Ala Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism Associated With the Ageing Process? *Journal of Gerontology:Biological Sciences*, 60(4):
- ¹² Slanger TE, Chang-Claude J, Wang-Gohrke S. 2006. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism, environmental modifiers, and risk of breast cancer in a German population. *Cancer Causes Control*, 17: 1025–1031.
- ¹³ Landi S, Gemignani F, Neri M, Barale R, Bonassi S, Bottari F, Canessa PA, Canzian F, Ceppi M, Filiberti R, Ivaldi GP, Mencoboni M, Scaruffi P, Tonini GP, Mutti L. 2007. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*, 120: 2739–2743.
- ¹⁴ Bica CG, Cruz IBM, da Silva LLM, Toscani NV, Zettler CG, Graudenz MS. 2007. Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females *J Bras Patol Med Lab*, 43(3): 219-225.
- ¹⁵ Bica C G, de Moura da Silva LL, Toscani N V, Cruz IBM, Sá G G, Silveira M; Zettler CG. 2009. SOD2 Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. *Pathology and Oncology Research*, 15: 19-24,
- ¹⁶ Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P. 2003. The signal sequence polymorphism of the SOD2 gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 168: 147–152.
- ¹⁷ Hiroi S, Harada H, Nishi H. 1999. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*, 261: 332–339.
- ¹⁸ Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF. 2005. Association among oxidized LDL levels, SOD2, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res*, 4: 691–703.
- ¹⁹ Fujimoto H, Taguchi JI, Imai Y. 2008. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J*, 649: 1–6.

-
- ²⁰ Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA. 1999. Manganese superoxide dismutase (SOD2) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res*, 59: 602–606.
- ²¹ Montagner GFF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MFF, Cruz IBM. 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different Manganese Superoxide Dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology in Vitro*, TIV2377,
- ²² Michalek RD, Rathmell JC. 2010. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunological Reviews*, 236: 190–202.
- ²³ Jones RG, Thompson CB. 2007. Reving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*, 27: 173-178.
- ²⁴ Bental M, Deutsch C. 1993. Metabolic changes in activated T cells: an NMR study of human peropheral blood lymphocytes. *Magn Reson Med*, 29: 317-326.
- ²⁵ Greenway F, Smith R. 2000. The future of obesity research. *Nutrition*, 16: 976-82.
- ²⁶ Marti A, Marcos A, Martinez J. 2001. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev*, 2: 131-40.
- ²⁷ Ford ES, Mokdad AH. 2008. Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11): S1-8.
- ²⁸ Dana Danaei G, Ding EL, Mozaffarian D, Taylor B, Rehm J, Murray CJ, Ezzati M. 2009. The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. *PLoS Med*, 6: e1000058.
- ²⁹ Misra A, Khurana L. 2008. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: S9–S30.
- ³⁰ Quetelet A. 1832. Recherches sur le poids de l’homme aux différents ages. *Nouveaux Memoires de l’Academie Royale des Sciences et Belles-Lettres de Bruxelles*, p.VII.
- ³¹ Chiu CJ, Wray LA, Beverly EA. 2010. Relationship of glucose regulation to changes in weight: a systemic review and guide to future research. *Metab Res Rev*, 26(5): 323-335.

- ³² Bray GA. 2007. The Metabolic Syndrome and Obesity, Humana Press Inc., a part of *Springer Science + Business Media* Totowa, New Jersey, USA.
- ³³ Short T. 1727. A discourse concerning the causes and effects of corpulency together with the method for its prevention and cure. London: J. Roberts.
- ³⁴ Flemyng M. 1760. A discourse on the nature, causes, and cure of corpulency. Illustrated by a remarkable case. Read before the *Royal Society* November 1757. London: L. Davis and C. Reymers.
- ³⁵ Banting W. 1863. Letter on corpulence, addressed to the public. London: Harrison and Sons.
- ³⁶ Atwater WO. 1895. Methods and Results of Investigations on the Chemistry and Economy of Food. Bulletin 21, *U.S. Department of Agriculture, Office of Experiment Stations*, Government Printing Office, Washington, D.C.,
- ³⁷ Cinti S. 1999. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73(1):9-15.
- ³⁸ Klaus S. Adipose tissue as a regulator of energy balance. 2004. *Curr Drug Targets*, 5:1-10.
- ³⁹ Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesityrelated insulin resistance. *J Clin Invest*, 112:1821-1830
- ⁴⁰ Robker RL, Collins RG, Beaudet AL, Mersmann HJ, Smith CW. 2004. Leukocyte migration in adipose tissue of mice null for ICAM-1 and Mac-1 adhesion receptors. *Obes Res*, 12: 936-40.
- ⁴¹ Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, J. L.Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Pénicaud L. 1999. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J*, 13: 305-12.
- ⁴² Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. 2004. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, 53: 1285-1292.
- ⁴³ Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112: 1796-808.

-
- 44 Klaus S. Adipose tissue as a regulator of energy balance. 2004. *Curr Drug Targets*, 5: 1-10.
- 45 Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. 2009. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. *Rev Bras Med Esporte*, 15(5).
- 46 Ronti T, Lupattelli G, Mannariano E. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an up date. *Clin Endocrinol*, 64: 355-65.
- 47 Trayhurn P, Wood IS. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of White adipose tissue. *Br J Nutr*, 92: 347-55.
- 48 Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T (1999) Molecular Mechanism of Metabolic Syndrome X: Contribution of Adipocytokines Adipocyte-derived Bioactive Substances. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 892: 146–154,
- 49 Misra A, Khurana L. 2008. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: S9–S30.
- 50 Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O’Rahilly S. 1997. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*, 16: 303–306.
- 51 Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. 1998. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*, 20: 113–114.
- 52 Bell CG, Walley AJ, Froguel P. 2005. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*, 6: 221–234.
- 53 Walley AJ, Asher JE, Froguel P. 2009. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Ver Genet*, 10: 431–442.
- 54 Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444: 860–867.
- 55 Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115: 1111–1119.
- 56 Purnell JQ, Kahn SE, Samuels MH, Brandon D, Loriaux DL, Brunzell JD. 2009. Enhanced cortisol production rates, free cortisol, and 11beta-HSD-1 expression correlate with visceral fat and insulin resistance in men: effect of weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E351–E357.

- ⁵⁷ Valsamakis G, Anwar A, Tomlinson JW, Shackleton CH, McTernan PG, Chetty R, Wood PJ, Banerjee AK, Holder G, Barnett AH, Stewart PM, Kumar S. 2004. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in lean and obese males with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 4755–4761.
- ⁵⁸ Seckl JR, Walker BR. 2001. Minireview: 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 142: 1371–1376.
- ⁵⁹ Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmolli D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. 1997. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid- inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:14924–14929.
- ⁶⁰ Morton NM, Holmes MC, Fievet C, Staels B, Tailleux A, Mullins JJ, Seckl JR. 2001. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem*, 276: 41293–41300.
- ⁵⁷ Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. 2001. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*, 294: 2166–2170.
- ⁶² Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Heintze U, Janke J, Luft FC, Sharma AM. 2004. Regulation of 11beta-HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss. *Obes Res*, 12: 9–17.
- ⁶³ Valsamakis G, Anwar A, Tomlinson JW, Shackleton CH, McTernan PG, Chetty R, Wood PJ, Banerjee AK, Holder G, Barnett AH, Stewart PM, Kumar S. 2004. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in lean and obese males with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 4755–4761.
- ⁶⁴ Schnackenberg CG. 2008. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors for metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs*, 9: 295–300.
- ⁶⁵ França, MLF, Arguello A M C, Barroso RL, Cercato C, Villares S. MF, Halpern A. 2003. Análise do cortisol urinário em uma população de obesos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo, 47:(4): S399.

-
- ⁶⁶ Pascualli R, Vicennati V, Cacciari M, Pagotto U. 2006. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1083:111-118.
- ⁶⁷ Timofeeva E, Richard D. 2001. Activation of the central nervous system in obese Zucker rats during food deprivation. *The Journal of Comparative Neurology*, Hoboken, 441(1): 71-89.
- ⁶⁸ Björntorp P. 1997. Endocrine abnormalities in obesity. *Diabetes Review*, 5: 52-68.
- ⁶⁹ Netto DC. Resposta Leucocitária de Jogadores de Futebol. Análise da fase preparatória à Fase de Competição. 2009. Dissertação de Mestrado, Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
- ⁷⁰ Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:3666-70.
- ⁷¹ Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, 316:552-4.
- ⁷² Kawakami M, Pekala PH, Lane MD, Cerami A. 1982. Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:912-6.
- ⁷³ Kawakami M, Cerami A. 1981. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Exp Med*, 154:631-9.
- ⁷⁴ Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53: 45-53.
- ⁷⁵ Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 17:331-67.
- ⁷⁶ Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259:87-91.
- ⁷⁷ Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis

- factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95: 2409–15.
- ⁷⁸ Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S. 1998. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*, 47:1384–91.
- ⁷⁹ Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*, 95:2111–9.
- ⁸⁰ Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. 1994. Tumor necrosis factor- α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:4854–8.
- ⁸¹ Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ. 1992. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*, 130:43–52.
- ⁸² Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. 1994. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest*, 94:1543–9.
- ⁸³ Einstein FH, Atzmon G, Yang XM, Ma XH, Rincon M, Rudin E, Muzumdar R, Barzilai N. 2005. Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. *Diabetes*, 54(3):672–8.
- ⁸⁴ Cao YL, Hu CZ, Meng X, Wang DF, Zhang J. 2008. Expression of TNF-alpha protein in omental and subcutaneous adipose tissue in obesity. *Diabetes Res Clin Pract*, 79(2):214–9.
- ⁸⁵ Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sápi Z, Öry I, Salamon F, Kovács M, Vargha P, Szekeres O, Speer G, Karádi I, Sikter M, Kaszás E, Dworak O, Gerö G, Cseh K. 2003. Expression of tumor necrosis factor (TNF)alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol*, 149(2):129–35.
- ⁸⁶ Rotter V, Nagaev I, Smith U. 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*, 278: 45777–45784.

-
- ⁸⁷ Sartipy P, Loskutoff DJ. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 7265–7270.
- ⁸⁸ Coppack SW. 2001. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 60: 349-56.
- ⁸⁹ Trayhurn P, Beattie JH. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*, 60:329- 39.
- ⁹⁰ Fröhbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol* 280:E827-47.
- ⁹¹ Purohit A, Ghilchick MW, Duncan L, Wang DY, Singh A, Walker MM, Reed MJ. 1995. Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:3052-8.
- ⁹² Bastard J-P, Jarde C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. 2000. Elevated levels of interleukin-6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:3338- 42.
- ⁹³ Vgontzas NA, Papanicolau DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. 1997. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbances and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:1313-6.
- ⁹⁴ Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects release interleukin-6: depot differences and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:847- 50.
- ⁹⁵ Dinarello CA. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27:519–550.
- ⁹⁶ Mantovani A, Garlanda C, Locati M, Rodriguez TV, Feo SG, Savino B, Vecchi A. 2007. Regulatory pathways in inflammation. *Autoimmunity Reviews*, 7(1):8-11.
- ⁹⁷ Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z. 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *The Journal of Clinical Investigation*. 103(7):1023-9.

- ⁹⁸ Gray PW, Goeddel DV 1982. Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, 298 (5877): 859–63.
- ⁹⁹ Schoenborn JR, Wilson CB. 2007. "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses". *Adv Immunol*, 96: 41–101.
- ¹⁰⁰ Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions". *J Leukoc Biol*, 75 (2): 163–89.
- ¹⁰¹ Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, Libby P. 2008. Interferon- γ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation. A Role for Adaptive Immunity in Obesity. *Circ Res*, 103:467-476.
- ¹⁰² Curfs JAHJ, Méis MGFJ, Hoogkamp-Korstanje AA. 1997. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. *Clinical Microbiol Rev*, 742-780.
- ¹⁰³ Nathan C, Sporn M. 1991. Cytokines in context. *J Cell Biol*, 113: 981.
- ¹⁰⁴ Thomson, A. 2003. The Cytokine Handbook, 4^a ed. *Academic Press*.
- ¹⁰⁵ de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 174(4):915-24.
- ¹⁰⁶ Bönig H, Körholz D, Pafferath B, Mauz-Körholz C, Burdach S. 1996. Interleukin 10 induced c-fos expression in human B cells by activation of divergent protein kinases. *Immunol Invest*, 25(1-2):115-28
- ¹⁰⁷ Gunnett CA, Heistad DD, Faraci FM. 2002. Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes: Role of superoxide. *Diabetes*, 51: 1931-1937.
- ¹⁰⁸ Esposito K, Giugliano D, Nappo F, Marfella L. 2004. Regression of carotid atherosclerosis by control of postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus: Campanian Postprandial Hyperglycemia Study Group. *Circulation*, 110: 214-219.

-
- ¹⁰⁹ Waters AK, Mast BT, Vella S, De La Eva R, O'Brien LM, Bailey S, Tam CS, Wong M, Baur LA. 2007. Structural equation modeling of sleep apnea, inflammation, and metabolic dysfunction in children. *J Sleep Res*, 16: 388-395.
- ¹¹⁰ Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19:683–765.
- ¹¹¹ Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 847–850.
- ¹¹² Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y. 1996. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med*, 2: 800–803.
- ¹¹³ Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112: 1796–1808.
- ¹¹⁴ Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112:1821–1830.
- ¹¹⁵ Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112: 1785-1788.
- ¹¹⁶ Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. 2003. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Res*, 11: 525-31.
- ¹¹⁷ Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. 1993. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem*, 268: 26055–26058.
- ¹¹⁸ Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259: 87–91.

- ¹¹⁹ Hotamisligil GS, Spiegelman BM. 1994. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity diabetes link. *Diabetes*, 43: 1271–1278.
- ¹²⁰ Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389: 610–614.
- ¹²¹ Chandra RK. 1981. Immune response in overnutrition. *Cancer Res*, 41:3795–3796.
- ¹²² Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SI, Henson DA, Butterworth DE, Fagoaga OR, Warren BJ, Rainwater MK. 1996. Immune response to obesity and moderate weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20:353–360.
- ¹²³ Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, Cohen MH, Bacon MC, Minkoff H. 2007. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism*, 56: 998–1004.
- ¹²⁴ Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 116: 1793–1801.
- ¹²⁵ Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. 2001. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*, 293: 1673–1677.
- ¹²⁶ Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. 2003. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*, 278: 9850–9855.
- ¹²⁷ Khazen W, M'Bika JP, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C. 2005. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett*, 579: 5631–5634.
- ¹²⁸ Kolonin MG, Saha PK, Chan L, Pasqualini R, Arap W. 2004. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat Med*, 10: 625–632.
- ¹²⁹ Ghanim H, Mohanty P, Deopurkar R, Sia CL, Korzeniewski K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, Dandona P. 2008. Acute modulation of toll-like receptors by insulin. *Diabetes Care*, 31: 1827–1831.
- ¹³⁰ Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonja TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, Freedman J, Gokce N. 2008. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity* (Silver Spring) 16: 932–937.

-
- ¹³¹ Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. 2006. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 346: 739–745.
- ¹³² Abe M, Matsuda M, Kobayashi H, Miyata Y, Nakayama Y, Komuro R, Fukuhara A, Shimomura I. 2008. Effects of statins on adipose tissue inflammation: their inhibitory effect on MyD88-independent IRF3 / IFNbeta pathway in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 871–877.
- ¹³³ Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, Rohner-Jeanrenaud F, Burger D, Dayer JM, Meier CA. 2003. Adipose tissue is a major source of interleukin 1 receptor antagonist. *Diabetes Journals Washington*, 52: 1104-1110.
- ¹³⁴ Piéroni L, Bastard JP, Piton A, Khalil L, Hainque B, Jardel C. 2003. Interpretation of circulating C-reactive protein levels in adults: body mass index and gender are a must. *Diabetes, Metabolism, Masson*, 29(2): 133-138.
- ¹³⁵ Hotamisligil GS. 2003. Inflammatory pathways and insulin action. *International Journal of Obesity*. Boston, 27(3): 53-55.
- ¹³⁶ Swanson LW, Mogenson GJ. 1981. Neural mechanisms for the functional coupling of autonomic, endocrine and somatomotor responses in adaptative behavior. *Brain Research Reviews* 3: 1-34
- ¹³⁷ Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine reviews*, Chevy Chase, 20: 68-100.
- ¹³⁸ Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425–432.
- ¹³⁹ Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269: 546-549.
- ¹⁴⁰ Flier JS. 1998. Lowered leptin slims immune response. *Nature Med*, 4: 1124-1125.
- ¹⁴¹ Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV. 1999. Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23: S22-28.

- ¹⁴² Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394: 897-901.
- ¹⁴³ Sandoval DA, Davis SN. 2003. Leptin: metabolic control and regulation. *J Diab Compl*, 17(2): 108-13.
- ¹⁴⁴ Sinha MK, Sturis J, Ohannesian J, Magosin S, Stephens T, Heiman ML, Polonsky KS, Caro JF. 1996. Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 228(3): 733
- ¹⁴⁵ Maurigeri D, Bonanno MR, Speciale S, Santangelo A, Lentini A, Russo MS, Calanna A, Malaguarnera M, Motta M, Testai' M, Panebianco P. 2002. The leptin, a new hormone of adipose tissue: clinical findings and perspectives in geriatric. *Arch Gerontol Geriatr*, 34(1): 47-54.
- ¹⁴⁶ Friedmann J M, Halaas JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(22): 763-70.
- ¹⁴⁷ Fantuzzi G. 2006. Leptin: nourishment for the immune system. *Eur J Immunol*, 36: 3101–3104.
- ¹⁴⁸ Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Joanna P. Ohannesian BSN, Cheryl C. Marco RD, Linda J. McKee MHS, Bauer TL, Caro JF. 1996. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334(5): 292-295.
- ¹⁴⁹ Ma Z, Gingerich RL, Santiago JV, Klein S, Smith CH, Landt M. 1996. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clinical Chemistry*, 42(6): 942-946.
- ¹⁵⁰ Pi-Sunyer FX. 1999. Obesity: a modern Day epidemic. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(1): 3-5.
- ¹⁵¹ Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. 2005. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307: 426–430.
- ¹⁵² Kos K, Harte AL, James S, Snead DR, O'Hare JP, McTernan PG, Kumar S. 2007. Secretion of neuropeptide Y in human adipose

tissue and its role in maintenance of adipose tissue mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293: E1335–E1340.

- ¹⁵³ Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X. 2008. Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor, *FASEB J*. 22: 2452–2464.
- ¹⁵⁴ Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z. 2007. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med*, 13: 803–811.
- ¹⁵⁵ Digby JE, Chen J, Tang JY, Lehnert H, Matthews RN, Randeva HS. 2006 Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol*, 191: 129–136.
- ¹⁵⁶ Kojima M, Hosoda H, Date Y. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656–660.
- ¹⁵⁷ Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. 2000. Purification and characterization of rat des-Gln¹⁴-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 275(29): 910–913.
- ¹⁵⁸ Rosicka M, Krsek M, Matoulek Z, Jarkovska Z, Marek J, Justova V, Lacinová Z. 2003. Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol Res*, 52(1): 61–66.
- ¹⁵⁹ Romero CEM, Zanesco A. 2006. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade *Rev. Nutr*, 19(1): Campinas, Brasil
- ¹⁶⁰ Salbe AD, Tschöp MH, DelParigi A, Venti CA, Tataranni PA. 2004. Negative relationship between fasting plasma ghrelin concentrations and *ad libitum* food intake. *J Clin Endocrinol Metabol*, 89(6): 2951–6.
- ¹⁶¹ Cummings DE, Schwartz MW. 2003. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med*, 54: 453–471.
- ¹⁶² Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. 2002. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87: 240–244.

- ¹⁶³ English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. 2002. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(6): 2984.
- ¹⁶⁴ Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. 2002. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New England Journal of medicine*, 346 (21): 1623-1630.
- ¹⁶⁵ Fernstrom JD. 1994. Dietary amino acids and brain function. *Journal of the American Dietetic Association*, 94(1): 71-77.
- ¹⁶⁶ Wurtman RJ, Wurtman, JJ. 1996. Brain serotonin, carbohydrate-craving, obesity and depression. *Advances in experimental medicine and Biology*, 398: 35-41.
- ¹⁶⁷ Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipocyte specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(1): 79-83.
- ¹⁶⁸ Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Nishikai K, Saruta T. 2002. Correlation of the adipocyte derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high density lipoprotein cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clinical Science*, London, 103(2): 137-142.
- ¹⁶⁹ Fasshauer, M. et.al. 2002. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(3): 1084-1089.
- ¹⁷⁰ Lledías F, Rangel P, Hansberg W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem*, 273(17): 10630-10637.
- ¹⁷¹ Cheeseman, KH, Slater, TF. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bull*, 49(3): 481-493.
- ¹⁷² Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. 1999. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutation Res*, 428: 17-22.
- ¹⁷³ Halliwell B, Gutteridge JMC. 2000. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Clarendon, Oxford. 805.

-
- ¹⁷⁴ Cabiscol E, Piulats E, Echaves P, Herrero E, Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275(35): 27393-27398.
- ¹⁷⁵ Beckman K, Ames N B. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 78(2): 547-581.
- ¹⁷⁶ Matés JM, Jiménez FMS. 1999. Role of reactive oxygen species in apoptosis implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell B*, 32(2): 157-170.
- ¹⁷⁷ K.R. Messner, J.A. Imlay. 1999. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 274(15): 10119-10128
- ¹⁷⁸ Keyer K, Imlay J. 1996. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol*, 177(23): 6782-6790.
- ¹⁷⁹ Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*, 201: 1203-1209.
- ¹⁸⁰ Van Lente F. 1993. Free radicals. *A Clin Chem*, 65(12): 374-377.
- ¹⁸¹ Babior BM. 1997. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res*, 30(2): 141-155.
- ¹⁸² Beckman S, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 1620-1624.
- ¹⁸³ Felipe Jr J & Percário S. 1991. Radicais livres em medicina intensiva. *Rev Bras Terap Intens*, 3(3): 66-72.
- ¹⁸⁴ Clarkson MP, Thompson HS. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, 72: 637-646.
- ¹⁸⁵ Chen S X, Schopfer P. 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *Eur J Biochem*, 260: 726-735.
- ¹⁸⁶ Storey KB. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res*, 29: 1715-1733.

- ¹⁸⁷ Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P (1997) Antioxidant enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem*, 43(4): 562-568.
- ¹⁸⁸ Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219: 1-14.
- ¹⁸⁹ Bird RP, Drapper HH, Valli VEO. 1982. Toxicological evaluation of malondialdehyde: a 12-month study of mice. *J Toxicol Env Health*, 10(6): 897-905
- ¹⁹⁰ Esterbauer H. 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr*, 57(5): 779-785.
- ¹⁹¹ Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defence. Review. *Eur J Biochem*, 215(2): 213-219.
- ¹⁹² Sies H, Stahl W. 1995. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, 62(6):1315-1321.
- ¹⁹³ Barnett YA, King CM. 1995. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutation Research Amsterdam*, 338:115-128.
- ¹⁹⁴ Antosiewicz J, Ziolkowski W, Kar S, Powolny AA, Singh SV. 2008. Role of reactive oxygen intermediates in cellular responses to dietary cancer chemopreventive agents. *Planta Med*, 74(13):1570-9.
- ¹⁹⁵ Jacob RA. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, New York, 15(5): 755-766.
- ¹⁹⁶ Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Rousset AM, Arnaud J, Richard MJ, Malvy D, Paul-Dauphin A, Briancon S, Favier A. 1998. Background and rationale behind the SU.VI. MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. *International Journal for Vitamins and Nutrition Research*, 68:(1)3-20.
- ¹⁹⁷ Gey KF. 1998. Vitamins E plus C and interacting nutrients required for optimal health. *Biofactors*, Oxford, 7: 113-174,.
- ¹⁹⁸ Halliwell B, Aeschbach R, Lörlinger J, Aruoma OI. 1995. The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7): 601-617.

-
- ¹⁹⁹ Odin AP. 1997. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation Research*, 386(1): 39-67.
- ²⁰⁰ Fridovich I. 1998. The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci*, 7: 2688–2690.
- ²⁰¹ Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 33(3): 337-49.
- ²⁰² Spevak W, Hartig A, Meindl P, Ruis H. 1986. Heme control region of the catalase T gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 203(1): 73-8.
- ²⁰³ Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. 2000. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 407 (6802): 390-5.
- ²⁰⁴ Holley AK, Dhar SK, Xu Y, St Clair DK. 2010. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids*. May 8. DOI 10.1007/s00726-010-0600-9.
- ²⁰⁵ Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 11(4): 376-81.
- ²⁰⁶ St. Clair D, Wan XS, Kuroda M, Vichitbandha S, Tsuchida E, Urano M. 1997. Suppression of tumor metastasis by manganese superoxide dismutase is associated with reduced tumorigenicity and elevated fibronectin. *Oncol Rep*, 4: 753-757.
- ²⁰⁷ Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, Descatoire V, Cazanave S, Pessayre D, Degouf F. 2005. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, 15: 311-9.
- ²⁰⁸ Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG. 1999. Manganese superoxide dismutase (SOD2) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Can Res*, 59: 602-6.

- ²⁰⁹ Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IB, Schetinger MR, Loro VL. 2010. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem*, 43(13-14): 1118-23.
- ²¹⁰ Bica CG, Cruz IBM, Silva LLM, Toscani NV, Zettler CG, Graudenz MS. 2007. Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females. *J Bras Patol Med Lab*, 43: 219-225.
- ²¹¹ Bica CG, de Moura da Silva LL, Toscani NV, Cruz IBM, Sá GP, Graudenz MS, Zettler CG. 2009. SOD2 Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. *Pathology and Oncology Research*, 15: 19-24.
- ²¹² Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G. 2005. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 60: 432-438.
- ²¹³ Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AR, Jobim PC, Müzell D, Cruz IBM. 2005. Association Among Oxidized LDL Levels, SOD2, Apolipoprotein and Polymorphisms And Cardiovascular Risk Factors In An South Brazilian Region Population. *Genetics and Molecular Research*, 4: 691-703.
- ²¹⁴ Duarte MMF, Duarte T, Santi A, Bagatini M, Cruz IBM, Schetinger MR, Loro V. 2010. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem*, (en prensa).
- ²¹⁵ Bica CG, de Moura da Silva LL, Toscani NN, Zettler CG, Gottlieb MG, Alexandre COP, Graudenz MS, Cruz IBM. 2010. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 196: 153-158.
- ²¹⁶ Montagner GFFS, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MMF, Cruz IBM. 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different Manganese Superoxide Dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology in Vitro*, TIV2377 (en prensa).
- ²¹⁷ Sorensen TI. 1995. The genetics of obesity, *Metabolism* 44: 4-6.
- ²¹⁸ Pritchard JK. 2001. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am. J. Hum. Genet*, 69: 124-137.

-
- ²¹⁹ Chung WK, Leibel RL. 2005. Molecular physiology of syndromic obesities in humans, *Trends Endocrinol. Metab*, 16: 267–272.
- ²²⁰ Stefan M, Nicholls RD. 2004. What have rare genetic syndromes taught us about the pathophysiology of the common forms of obesity?, *Curr. Diab. Rep.* 4: 143–150.
- ²²¹ World Health Organization. 1988. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity. *WHO Publications*, Geneva.
- ²²² Bjorntorp P. 1991. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care*, 14: 1132-1143.
- ²²³ Brandão AP, Brandão AA, Freitas EV, Magalhães MEC, Pozzan R. 2002. Hipertensão arterial no idoso. En: Freitas EV, Py L, Cançado FA, Flavio Aluizio J, Gorzoni ML (eds.) *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.249-62.
- ²²⁴ III Consenso Brasileiro de Hipertensão da Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Cardiologia e Sociedade brasileira de Nefrologia. *Rev Bras Cardiol*, 1(3): 92-133.
- ²²⁵ Tonks DB. 1972. Quality control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, *Diagnostic Reagent Division*, Scarborough, Canadá.
- ²²⁶ Giannini SD. 1998. Aterosclerose e dislipidemias. São Paulo: *BG Cultural*, 157.
- ²²⁷ Prado-Lima PS, Cruz IB, Schwanke CH, Netto CA, Licinio J. 2006. *Mol Psychiatry*, 11(10): 889-891.
- ²²⁸ Kabagambe EK, Baylin A, Allan DA, Siles X. 2001. Application of the method of triads to evaluate the performance of food frequency questionnaires and biomarkers as indicators of long-term dietary intake. *Am J Epidemiol*, 154: 1126–1135.
- ²²⁹ Hankin JH, Wilkens LR. 1994. Development and validation of dietary assessment methods for culturally diverse populations. *Am J Clin Nutr*, 59: 98S–200S.
- ²³⁰ Lopes AC, Caiaffa WT, Sichieri R, Mingoti AS, Lima-Costa MF. 2005. Nutrient consumption by adults and seniors in a population-based study: the Bambuí Project. *Cad Saude Publica*, 21: 1201–1209.

- ²³¹ Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO). UNICAMP. <http://www.unicamp.br/nepa/taco/> (Acceso en octubre de 2010).
- ²³² Hedekov CJ. 1968. Early Effects of Phytohaemagglutinin on Glucose Metabolism of Normal Human Lymphocytes. *Biochem J*, 110(2): 373-80.
- ²³³ Vassale C, Maffei S, Ndreu F, Mercuri A. 2009. Age-related oxidative stress modulation by smoking habit and obesity. *Clin Biochem*, 42(7-8): 739-41.
- ²³⁴ Mikhak B, David, Hunter DJ, Spiegelman D, Elizabeth AP, Wu K, Erdman JW Jr, Giovannucci E, 2008. Manganese superoxide dismutase (SOD2) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk, *Carcinogenesis*, 29(12): 2335-40.
- ²³⁵ Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A. 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*, 23: 381-390
- ²³⁶ Yim MB, Kang SO, Chock PB. 2000. Enzyme-like activity of glycated cross-linked proteins in free radical generation. *Ann N Y Acad Sci*, 899: 168-181.
- ²³⁷ Cai H, Griendling KK, Harrison DG. 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 24: 471-478.
- ²³⁸ Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. 1999. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J*, 13: 1231-8
- ²³⁹ Montano MA, Barrio Lera JP, Gottlieb MG, Schwanke CH, da Rocha MI, Manica-Cattani MF, dos Santos GF, da Cruz IB. 2009. Association between manganese superoxide dismutase (SOD2) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem*, 328: 33-40.
- ²⁴⁰ Stentz FB, Kitabchi AE. 2005. Hyperglycemia-induced activation of human T-lymphocytes with de novo emergence of insulin receptors and generation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 335(2):491-5
- ²⁴¹ Arslan N, Baris EB, Aydin A. 2010 Hormones and Cytokines in Childhood Obesity. *Indian Pediatrics* V 47:830-839.

-
- ²⁴² Arner P. 2003. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab*, 14: 137–145.
- ²⁴³ Rajala MW, Scherer PE. 2003. The adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 144: 3765–3773.
- ²⁴⁴ Trayhurn P, Wood IS. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, 92: 347–355.
- ²⁴⁵ Rotter V, Nagaev I, Smith U. 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3–L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*, 278: 45777–45784
- ²⁴⁶ Solini A, Muscelli E, Stignani M, Melchiorri L, Santini E, Rossi C, Astiarraga BD, Rizzo R, Baricordi OR. 2010. Soluble human leukocyte antigen-g expression and glucose tolerance in subjects with different degrees of adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(7): 3342-3346.
- ²⁴⁷ Bassols J, Botas P, Moreno-Navarrete JM, Delgado E, Ortega F, Ricart W, Fernandez-Real JM. 2010. Environmental and genetic factors influence the relationship between circulating IL-10 and obesity phenotypes. *Obesity* (Silver Spring), 18(3): 611-618.
- ²⁴⁸ O'Rourke RW, Kay T, Lyle EA, Traxler SA, Deveney CW, Jobe BA, Roberts CT Jr, Marks D, Rosenbaum JT. 2006. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin Exp Immunol*, 146(1): 39-46
- ²⁴⁹ Duffaut C, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Decaunes P, Maumus M, Chiotasso P, Sengenés C, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumié A. 2009. Interplay Between Human Adipocytes and T Lymphocytes in Obesity: CCL20 as an Adipochemokine and T Lymphocytes as Lipogenic Modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 1608-1614.
- ²⁵⁰ Rubinstein R, Genaro AM, A Motta, Cremaschi G, Wald MR. 2008. Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose. *Clin Exp Immunol*. November, 154(2): 235-246.
- ²⁵¹ Schreck R, Baeuerle PA. 1991. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol*, 1: 39–42.

- ²⁵² Whitacre CM, Cathcart MK. 1992. Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens. *Cell Immunol*, 144: 287–95.
- ²⁵³ Nakanishi S, Yamane K, Ohishi W, Nakashima R, Yoneda M, Nojima H, Watanabe H, Kohno N. 2008. Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *Diabetes Res Clin Pract*, 81(3):381-5.
- ²⁵⁴ Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*, 17: 189–212.
- ²⁵⁵ Hovnik T, Dolžan V, Bratina NU, Podkrajšek KT, Battelino T, 2010. Genetic Polymorphisms in Genes Encoding Antioxidant Enzymes Are Associated With Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 33: e147-e167.
- ²⁵⁶ Liu L, Zheng T, Wang N, Wang F, Li M, Jiang J, Zhao R, Li L, Zhao W, Zhu Q, Jia W. 2009. The manganese superoxide dismutase Val16Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem*, 322(1-2): 87-91.
- ²⁵⁷ Nakanishi S, Yamane K, Ohishi W, Nakashima R, Yoneda M, Nojima H, Watanabe H, Kohno N. 2008. Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *Diabetes Res Clin Pract*, 81(3): 381-5.
- ²⁵⁸ Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*, 17: 189–212.
- ²⁵⁹ Giacco F, Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 107(9): 1058-70.
- ²⁶⁰ Gautam N, Das S, Mahapatra SK, Chakraborty SP, Kundu PK, Somenath R. 2010. Age associated oxidative damage in lymphocytes. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4): 275–82.

-
-
- ²⁶¹ Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Ezsol Z, Tonutti L, Taboga C. 1998. Antioxidant defenses are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest*, 28: 329–33.
- ²⁶² Whitacre CM, Cathcart MK. 1992. Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens. *Cell Immunol*, 144: 287–95.