



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAMILA LANDUCCI BONIFÁCIO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM ADOLESCENTES COM
SÍNDROME METABÓLICA NO MUNICÍPIO DE LONDRINA –
PR**

KAMILA LANDUCCI BONIFÁCIO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM ADOLESCENTES COM
SÍNDROME METABÓLICA NO MUNICÍPIO DE LONDRINA –
PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa

Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle Venturini

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B715a Bonifácio, Kamila Landucci.

Avaliação de biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em adolescentes com síndrome metabólica no município de Londrina-PR / Kamila Landucci Bonifácio. – Londrina, 2014.

92 f. il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Coorientador: Danielle Venturini.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Síndrome metabólica – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Adolescentes – Teses. 4. Obesidade – Teses. I. Barbosa, Décio Sabbatini. II Venturini, Danielle. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616.43-008

KAMILA LANDUCCI BONIFÁCIO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM ADOLESCENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA NO MUNICÍPIO DE LONDRINA – PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rafael Deminice
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de outubro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e orientação prestada e pela brilhante contribuição intelectual no desenvolvimento deste estudo. Faltam palavras para que eu possa expressar toda a minha gratidão pelo seu apoio e, sobretudo, pela amizade, compreensão e confiança.

À professora Dra. Danielle Venturini, pela co-orientação, por toda ajuda, amizade e apoio.

À professora Maria Emília Favero, por tanta dedicação, disponibilidade e amizade.

Aos professores da banca, Dra. Tania Mazzuco e Rafael Deminice pelas contribuições e disponibilidade.

Ao professor Michael Maes cujos conhecimentos fundamentaram ainda mais as pesquisas.

Aos professores Alessandra Miyuki Okino, Jair Aparecido de Oliveira, Suzana Nixdorf e Edilson Serpeloni Cyrino, pelas valiosas contribuições, disponibilidade e colaboração, indispensáveis para consecução deste trabalho.

Aos amigos Carine Coneglian, Luciana Higachi, Chiara Bortolasci, Ana Paula Michelin, Andressa Keiko, Alissana Carmargo, Francis Brinholi, Vitor Obara, Karine Boll, Renata Martinez, Paulo Anizelli, Laura Semeão, Geise Broto, Crisieli Tomereli e Danilo Rodrigues pela ajuda nos experimentos e por estarem sempre presentes nos momentos de alegrias e nas dificuldades. Pela paciência, carinho, amizade e convívio tão agradável que tornou a jornada muito mais divertida.

Aos meus grandes parceiros Denise Duarte Santiago e Antonio Carlos Mariano pelo companheirismo e amizade.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional, pessoal e pela confiança em mim depositada.

À Sandra Lage, secretária de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL, pela assessoria técnico-científica.

Aos meus pais Denise Landucci Bonifácio e Juarez Federico Bonifácio, exemplos vivos de sabedoria e perseverança. Obrigada por me ensinarem os valores da vida.

Ao meu irmão Luiz Gustavo Bonifácio, que me ajudou por estar sempre ao meu lado, e principalmente pelo amor e dedicação que recebo.

Ao Ricardo Kruczeveski, que sempre esteve comigo nas horas mais difíceis, companheiro nesta trajetória, obrigada pela compreensão e carinho.

Aos amigos e a minha família obrigada pela paciência e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho ou estiveram ao meu lado nesta jornada.

*“ O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso,
existe em momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis
e pessoas incomparáveis.”*
Fernando Pessoa

BONIFÁCIO, Kamila Landucci. **Avaliação de biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em adolescentes com síndrome metabólica no município de Londrina-PR**. 2014. 92 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é uma doença complexa com custo socioeconômico alto e é considerada mundialmente como uma epidemia. É definida como um conjunto de fatores interligados que aumentam diretamente o risco de doenças coronarianas, doença cardiovascular aterosclerótica e o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Desse modo, as principais alterações observadas nessa síndrome são dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e obesidade abdominal. Alterações nos estados pró e antiinflamatório e aumento do estresse oxidativo (EO) também têm sido implicados na fisiopatologia da SM. O objetivo desse trabalho foi avaliar marcadores de EO e inflamatórios no sangue de adolescentes com SM em escolas públicas de Londrina. A população desse estudo consistiu de 47 adolescentes com a doença e esses foram classificados de acordo com Federação Internacional de Diabetes (IDF). O grupo controle consistiu de 94 indivíduos saudáveis e, para obter grupos homogêneos, parâmetros como idade e gênero foram controlados. Os marcadores bioquímicos e imunológicos avaliados foram ácido úrico, colesterol total, lipoproteínas de densidade baixa (LDL), lipoproteínas de densidade alta (HDL), triacilgliceróis, glicose e insulina. O EO foi avaliado pela determinação da capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), níveis de grupamentos tiol (SH-grupo), atividade da paraoxonase 1 (PON-1), dosagem dos níveis de malondialdeído (MDA), metabólitos do óxido nítrico (NOx), hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria (FOX-LOOH) e fator de necrose tumoral α (TNF α). Foram utilizados os critérios do *International Obesity Task Force* (IOTF) para dividirmos os participantes com IMC normal, sobrepeso e obesidade. Pacientes com SM apresentaram aumento significativo do MDA. Entretanto, a relação de TRAP/ácido úrico foi significativamente menor naqueles com SM do que naqueles sem a doença. Não houve diferenças significativas em nenhum dos outros biomarcadores. A relação TRAP/ácido úrico foi significativamente menor em indivíduos com obesidade e sobrepeso em relação aqueles com IMC normal, porém não houve diferença significativa entre os três grupos de estudo em outros biomarcadores. A análise da regressão logística mostrou que MDA e NOx foram associados com SM (fator de risco) e que o TRAP/ácido úrico foi inversamente associado (fator protetor) em indivíduos com SM. Além disso, a SM (utilizando o grupo sem SM como referência) foi significativamente associado com o MDA, SH e IMC. Entretanto, gênero, NOx e TRAP/ácido úrico foram associados nos pacientes com obesidade e nenhuma dessas variáveis foi associado com o sobrepeso. Estes resultados confirmam que adolescentes com SM e a obesidade têm um desequilíbrio redox, e apresentam um perfil diferente em relação aos biomarcadores de EO quando comparados ao controle. O MDA apresentou-se como o melhor biomarcador de estresse oxidativo em adolescentes com SM.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Adolescentes. Estresse oxidativo.

BONIFÁCIO, Kamila Landucci. **Evaluation of inflammatory and oxidative stress biomarkers in adolescents with metabolic syndrome in the city of Londrina-PR**, 2014. 92 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) - State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The metabolic syndrome (MetS) is a complex disease with high socioeconomic cost and is regarded worldwide as an epidemic. It is defined as a set of interrelated factors that directly increase the risk of coronary heart disease, atherosclerotic cardiovascular disease and diabetes mellitus type 2. Thus, the main changes observed in this syndrome include dyslipidemia, hypertension, insulin resistance and abdominal obesity. Changes in pro and anti-inflammatory and increased oxidative stress states have also been implicated in the pathophysiology of MetS. The aim of this study was to evaluate markers of oxidative stress and inflammation in the blood of adolescents with MetS in public schools in Londrina. The study population consisted of 47 adolescents with the disease and these were classified according to International Diabetes Federation (IDF). The control group consisted of 97 healthy subjects and, for homogeneous groups, parameters such as age and gender were controlled. Biochemical and immunological markers were evaluated: uric acid, total cholesterol, low density lipoproteins (LDL), high density lipoprotein (HDL), triglycerides, glucose and insulin. Oxidative stress was evaluated by determining the total radical-trapping antioxidant potential in plasma (TRAP), levels thiol groups (SH-group), paraoxonase 1 (PON-1) activity, dose levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide metabolites (NOx), lipid hydroperoxides by spectrophotometry (FOX-LOOH) and tumor necrosis factor α (TNF α). We also used the criteria of the International Obesity Task Force (IOTF) to divide participants with normal BMI, overweight and obesity. Patients with MetS had significantly increased MDA. However, the ratio of TRAP/uric acid was significantly lower in MetS patients than in those without the disease. There were no significant differences in any of the other biomarkers. The TRAP/uric acid ratio was significantly lower in individuals with obesity and overweight than those with normal BMI, but there was no significant difference among the three study groups in other biomarkers. The logistic regression analysis showed that MDA and NOx were associated with MetS (risk factor) and the TRAP/uric acid was inversely associated (protective factor) in individuals with MetS. Furthermore, MetS (no MetS as reference group) was significantly associated with MDA, SH and BMI. However gender, NOx and TRAP/uric acid ratio were associated in patients with obesity and none of these variables was associated with being overweight. These results confirm that adolescents with MetS and obesity have a redox imbalance, and present a different profile in relation to biomarkers of oxidative stress when compared to control. The MDA was presented as the best biomarker of oxidative stress in adolescents with MetS.

Keywords: Metabolic syndrome. Adolescents. Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABAP	Dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)
CA	Circunferência abdominal
CT	Colesterol total
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo-2
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FGA	Produtos finais avançados da glicação
FOX-LOOH	Hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria
FRAP	Poder antioxidante redutor de ferro
GLUT-4	<i>Glucose transporter type 4</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de densidade alta
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
IRS-1	Receptores de insulina 1
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LOOH	Hidroperóxido
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato
NCEP ATP III	<i>The National Cholesterol Education Program Expert Panel Adult Treatment Panel III</i>
NFκB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
O ⁻²	Ânion superóxido
OH•	Radical hidroxila

ONOO ⁻	Radical peroxinitrito
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCK	Proteína quinase C
PCR	Proteína C reativa
PON-1	Paraoxonase 1
PAI-1	Plasminogênio
QL	Quimiluminescência
RO ₂ [•]	Radical peroxila
SH-grupo	Grupamento tiol
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TG	Triacilgliceróis
TRAP	Capacidade antioxidante total plasmática
TNF α	Tumor de necrose tumoral alfa
VLDL	Proteína de muito baixa densidade
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	FISIOPATOLOGIA DA SM	15
1.2	ESTADO PRÓ-INFLAMATÓRIO	16
1.3	OBESIDADE	17
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO E SÍNDROME METABÓLICA	19
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MÉTODOS	25
3.1.	CASUÍSTICA	25
3.1.1	Delineamento	25
3.1.2	Cálculo do tamanho da amostra	25
3.1.3	Considerações Éticas	25
3.1.4	Amostras.....	26
3.1.5	Antropometria	27
3.1.6	Medidas de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca.....	27
3.1.7	Coleta de Sangue	27
3.1.8	Diagnóstico da Síndrome Metabólica.....	28
3.2	AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	28
3.2.1	Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP)	28
3.2.2	Determinação de Hidroperóxidos por Espectrofotometria (FOX-LOOH).....	29
3.2.3	Determinação de Malondialdeído (MDA).	29
3.2.4	Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx)	29
3.2.5	Determinação do Grupamento Tiol (SH-grupo)	30
3.2.6	Determinação da Atividade da Paraoxonase 1 (PON-1)	30
3.2.7	Determinação do Fator de Necrose Tumoral (TNF α)	30
3.2.8	Determinações Bioquímicas e Imunológicas	31
3.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO	33
4.1	OXIDATIVE AND ANTIOXIDANT BIOMARKERS OF THE METABOLIC SYNDROME AND OVERWEIGHT /OBESITY IN ADOLESCENT	33
5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICES	68
APÊNDICE 1-	Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos	69
APÊNDICE 2 -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	70
APÊNDICE 3 -	Carta de apresentação do Núcleo Regional de Educação de Londrina	72
APÊNDICE 4 -	Carta de apresentação do Núcleo Regional de Educação de Londrina às escolas participantes do projeto	73
	ANEXOS	74
ANEXO I -	Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)	75
ANEXO II-	Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria (FOX-LOOH).....	78
ANEXO III -	Determinação de malondialdeído (MDA)	80
ANEXO IV -	Determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx).....	84
ANEXO V -	Determinação do grupamento Tiol (SH-grupo)	88
ANEXOVI -	Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1).....	89

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é uma condição multifatorial que leva ao aumento no risco de diabetes, à aterosclerose acelerada e tem alcançado proporções epidêmicas na última década. A SM é caracterizada pela combinação de três ou mais fatores: obesidade abdominal, hipertensão, hiperglicemia e hiperlipemia (CARDONA et al., 2008; GRATAGLIANO et al., 2008). Além disso, outras comorbidades têm sido relatadas. Dentre elas podemos citar esteatose hepática, liberação de substâncias pró-inflamatórias pelos adipócitos, aumento da atividade dos fatores de coagulação, disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo (EO) (ROBERTS; SINDHU, 2009). Esta condição clínica foi descrita pela primeira vez em 1988 por Reaven, como o elo entre as complicações fisiometabólicas acarretadas pela obesidade e outras anomalias associadas com um risco aumentado de doença cardiovascular aterosclerótica (REAVEN, 1988).

As doenças cardiovasculares são a causa mais frequente de morbidade e mortalidade no Brasil (300 mil mortes/ano) e são responsáveis pela maior parcela de despesas hospitalares do Sistema Único de Saúde (OLIVEIRA et al., 2009).

O perfil de morbidade e mortalidade em diferentes populações vem sendo modificado acentuadamente nas últimas décadas, com o aumento da prevalência e incidência, sobretudo, de disfunções crônico-degenerativas. Essa situação, embora bastante evidenciada em adultos e idosos, tem atingido gradativamente a população mais jovem de forma progressiva (LAURENTI; BUCHALLA; PAULO, 2001).

Considerando que a existência de fatores de risco aumenta substancialmente a probabilidade de desenvolvimento dessas disfunções, pesquisadores têm investigado a origem desses fatores em jovens visto que uma série de doenças que se manifestam na idade adulta parece ser produto do estilo de vida adotado na infância e na adolescência (STRONG et al., 1999).

Três entidades internacionais, *World Health Organization* (WHO), *The National Cholesterol Education Program Expert Panel Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) e a *International Diabetes Federation* (IDF) definem a SM baseando-se em critérios diagnósticos praticamente iguais. Essas definições diferem entre si por determinarem alguns destes critérios como sendo essenciais para o diagnóstico.

A definição proposta pela WHO determina como requisito obrigatório a presença de alteração no metabolismo de glicose e mais dois outros componentes.

A definição do NCEP ATP III permite a classificação de SM pela presença de três componentes dos cinco propostos, sem exigência de nenhum componente em específico (NCEP ATP III, 2001).

Em 2007 a IDF estabeleceu critérios para classificar crianças com SM na faixa etária entre 10-16 anos embora estes critérios não sejam aplicáveis para menores de 10 anos. A IDF sugere que nesses indivíduos haja o acompanhamento da circunferência abdominal (CA) além de outros fatores de risco, tais como *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia, doença cardíaca, hipertensão e/ou obesidade, bem como histórico familiar de SM. A IDF determina a presença de três componentes, mas tem como fator fundamental a CA. Na análise dos critérios utilizados no diagnóstico de SM no adulto, criança e adolescentes, a obesidade visceral é melhor preditor para risco da doença cardiovascular e diabetes. Esse achado enfatiza a importância de obtermos informação da distribuição da gordura em particular a CA (DAMIANI et al., 2011; GARNETT; BAUR; COWELL, 2011; MINDELL et al., 2012).

Além dos parâmetros característicos da SM, os indivíduos com a doença também apresentam importante disfunção endotelial e aceleração da aterosclerose. Vários fatores têm sido associados ao seu desenvolvimento, como: i) adiposidade visceral e produção desequilibrada de citocinas pró e antiinflamatórias (adiponectina), pelo tecido adiposo, resultando em inflamação de baixo grau, ii) diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) resultando em disfunção endotelial, iii) hiperuricemia e iv) EO (DANDONA et al., 2005).

Atualmente, a IDF é a mais utilizada para adolescentes, sendo que a prevalência da SM pode variar de 1,1 a 44 % dependendo das características da população e da região (COSTA et al., 2012; VOILS; COOPER-DEHOFF, 2014). Um estudo realizado com a população americana, a prevalência da SM foi em 22% na população adulta, 42% em indivíduos entre 60 e 69 anos, o que sugere que a idade parece ter uma influência sobre o desenvolvimento de SM (SILVEIRA et al., 2013; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ et al., 2007). Marcovecchio e Chiarelli (2013) observaram que a SM tem sido relatada ser comum entre crianças e adolescentes obesos, onde a prevalência varia entre 26%–49,7%. Em contrapartida, a prevalência da SM é muito baixa entre os jovens de peso normal (3%–4%) (MARCOVECCHIO; CHIARELLI, 2013).

Portanto, a falta de padronização nos critérios de diagnóstico prejudica a comparação da prevalência encontrada em diferentes estudos e identificação da

verdadeira magnitude da SM (FULAZ; NETTO-OLIVEIRA, 2009). Cook et al. (2008), analisaram a prevalência da SM em 1826 adolescentes norte-americanos, e eles descobriram que dependendo da definição utilizada, a prevalência variou entre 2,0 e 9,4% em todos os adolescentes e variou entre 12,4 e 44,2% em adolescentes obesos (COOK et al., 2008).

LIU (2010) na China, mostrou em 1.844 crianças na faixa etária entre 7 a 14 anos em 6 escolas que a prevalência de SM em crianças obesas foi de 33,4%, enquanto naquelas com sobrepeso foi de 20,0% e em crianças com peso normal foi de 2,3% (LIU et al., 2010).

PARK *et al.* (2010) na Coreia, avaliaram 664 adolescentes na faixa etária de 12–19 anos, sendo a prevalência da SM de 2,5% e na população obesa 24,3%, obedecendo o critério da IDF (PARK et al., 2010).

O primeiro estudo realizado no Brasil foi em uma amostra da população de escolas públicas de Niterói, Rio de Janeiro. A prevalência de SM, com base na presença de pelo menos três anormalidades metabólicas, foi de 21,4% entre meninas com excesso de peso de 12 a 19 anos de idade e 0,1% naqueles classificados como peso normal. A presença da SM aumenta a mortalidade geral em 1,5 vezes e a mortalidade cardiovascular em 2,5 vezes (ALVAREZ et al., 2011).

No que se refere ao diagnóstico da SM em adolescentes, diferente do que ocorre na população adulta, não existe ainda um consenso sobre critérios e pontos de corte a ser utilizados. Apesar dessas limitações, diversos pesquisadores têm identificado importantes taxas de prevalência de SM em adolescentes, principalmente, em jovens com sobrepeso/obesidade (FERREIRA; OLIVEIRA; FRANÇA, 2007).

1.1 FISIOPATOLOGIA DA SM

Sabe-se que a mobilização de ácidos graxos livres não-esterificados a partir dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo está acelerada em indivíduos resistentes à insulina. Esses ácidos graxos estimulam o aumento da síntese hepática de glicose, de triacilgliceróis, da secreção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), de apolipoproteína B, de lipoproteína de baixa densidade (LDL), e a diminuição de lipoproteína de alta densidade (HDL) (BARZI et al., 2003). Quanto maior for a quantidade de ácido graxo livre a alcançar os hepatócitos, tanto mais

triacilgliceróis serão sintetizados e, liberados na corrente sanguínea, levando à hipertrigliceridemia. O excesso desse lipídeo será ligado à HDL, no fígado, resultando em uma lipoproteína rica em gordura. Como essa partícula possui alta afinidade pela lipase hepática, esta lipoproteína é rapidamente depurada do sistema circulatório, diminuindo a quantidade de HDL que participa do transporte reverso de colesterol, favorecendo a aterogênese (GUTIÉRREZ-SALMEÁN; CEBALLOS-REYES; RAMÍREZ-SÁNCHEZ, 2012). Além disso, os ácidos graxos livres não-esterificados reduzem a sensibilidade muscular à insulina, pela inibição da captação de glicose mediada por insulina, e aumentam a síntese hepática de fibrinogênio e de inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) que estão relacionados às doenças vasculares trombogênicas (BUCKLAND et al., 2011).

Relata-se que o tecido adiposo possui importante papel como secretor de uma variedade de substâncias bioativas correlacionadas à SM. Dentre essas, destacam-se a leptina, a resistina, o fator de necrose tumoral α (TNF α), a interleucina 6 (IL-6) e a angiotensina II, que induzem resistência à insulina (BUCKLAND et al., 2011).

O TNF α estimula a lipólise, promovendo a liberação de ácidos graxos livres para a circulação. O catabolismo dos ácidos graxos livres pela musculatura esquelética aumenta os níveis intracelulares de cadeias longas de acilCoA e diacilglicerol. Essas duas moléculas são potentes ativadores alostéricos da proteína quinase C (PKC), que, por sua vez, promove a fosforilação dos substratos de receptores de insulina 1 (IRS-1) em resíduos de aminoácidos como a treonina e serina, que prejudica a fosforilação funcional em resíduos de tirosina. Essa fosforilação inadequada dos IRS-1 impede a ativação do receptor de insulina, consequentemente interrompendo a cascata de sinalização descendente e, por isso, prejudicando a migração e a fusão dos transportadores de glicose tipo 4 (GLUT-4) com a membrana celular. Como resultado, ocorre resistência à insulina e hiperglicemia (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007).

1.2 ESTADO PRÓ-INFLAMATÓRIO

A SM é considerada um estado inflamatório sistêmico de baixo-grau que está relacionado especialmente à obesidade. O tecido adiposo tem sido considerado um órgão endócrino importante, sendo responsável pela secreção de várias moléculas

com atividades pró ou antiinflamatórias. O estado pró-inflamatório da obesidade e da SM em obesos está principalmente relacionado ao excesso de consumo alimentar, embora outros fatores possam estar implicados. O EO pode induzir o processo inflamatório ativando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. A resistência à insulina favorece esta situação, uma vez que a insulina, apresenta importante atividade antiinflamatória e antioxidante. Ela inibe a transcrição de vários fatores pró-inflamatórios como o fator nuclear κ B (NF κ B), suprime as concentrações plasmáticas da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e inibe a geração de espécies reativas de oxigênio. O estado pró-inflamatório induz a resistência à insulina que, por sua vez, promove mais inflamação (DANDONA et al., 2005).

Vários estudos transversais relacionando a proteína C reativa (PCR) e os fatores da SM sugerem que a inflamação está diretamente associada à resistência à insulina, ao índice de massa corpórea (IMC), aos níveis de colesterol total, triacilgliceróis, glicose e ácido úrico, e inversamente correlacionado com os níveis de HDL colesterol (FRÖHLICH et al., 2000; VISSER et al., 1999). A obesidade central, avaliada pela CA e a hipertensão arterial são os principais fatores determinantes da inflamação presentes nesta síndrome (FLOREZ et al., 2006; SANTOS et al., 2005).

Embora muitas evidências deixem claro o aumento do processo inflamatório na SM, vários estudos têm demonstrado que nesta situação ocorre também diminuição da proteção à inflamação, representada pela diminuição nos níveis séricos de adiponectina. De acordo com Kougias et al. (2005), sob condições normais, o gene da adiponectina é expresso quase que exclusivamente no tecido adiposo. Vários mecanismos regulam a sua expressão, como a insulina e fator de crescimento 1 semelhante à insulina que estimulam a expressão de adiponectina, enquanto TNF α exerce efeito oposto (KOUGIAS et al., 2005).

1.3 OBESIDADE

A obesidade é uma enfermidade crônica multifatorial. A obesidade e sobrepeso vem aumentando de maneira alarmante nas últimas décadas no mundo (DAMIANI et al., 2011; FONSECA et al., 2010). Fatores genéticos e ambientais (como estilo de vida, sedentarismo e dieta hipercalórica) são os fatores principais envolvidos na epidemia da obesidade nos adultos e adolescentes. De forma semelhante aos adultos, os fatores de riscos cardiovasculares como obesidade,

hipertensão arterial, dislipidemia e sedentarismo, quando presentes na faixa etária jovem, levariam (na vida adulta) à complicações metabólicas como diabetes, hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares (LLOYD; LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2012; OLIVEIRA et al., 2004).

Na América do Sul, o processo de transição nutricional das últimas décadas apresenta a coexistência paradoxal da obesidade do adulto e da desnutrição na infância. Este fato sustenta a hipótese de Barker de risco aumentado da doença crônica entre as pessoas que foram expostas à desnutrição no início da vida (BARKER, 2001; LITHELL et al., 1996).

Hoffman *et al.* (2000) sugeriram que a desnutrição crônica nos primeiros anos de vida está associada a uma capacidade menor de oxidação de gorduras no período pós-prandial. Isso explicaria a tendência à obesidade em adultos que foram submetidos a agravos nutricionais no início da vida e que são expostos posteriormente a uma dieta mais rica em gordura, conforme é observado na juventude atual (HOFMANN; AMMENDOLA; SCHLOSSMANN, 2000). Esse fato pode ser particularmente relevante se os adolescentes possuem hábitos sedentários (SCHNEIDER, 2000).

Além disso, os adolescentes que tiveram um retardo de crescimento intrauterino e permanecem com este atraso ao nascer tendem a possuir mais peso durante o estirão de crescimento (JAQUET et al., 1999). Dessa forma, sugere-se que a maturação inicial, que responde a fatores genéticos e ambientais, inclusive ao alto nível de nutrição, possa ser um indicador de risco para o desenvolvimento de obesidade.

Nos Estados Unidos, a taxa de prevalência de sobrepeso aumentou de 30% para 34% e de obesidade de 14,8% para 17,4% de 2000 para 2004, entre adolescentes (OGDEN et al., 2006). Essa tendência de aumento ao longo dos anos também tem sido constatada em adolescentes brasileiros (CINTRA et al., 2007; WANG; MONTEIRO; POPKIN, 2002). De uma forma geral, na maioria dos países do mundo, o excesso de peso tem atingido pelo menos 20% dos adolescentes (CAMPOS; LEITE; ALMEIDA, 2007; CINTRA et al., 2007; MALIK; BAKIR, 2006; WANG; MONTEIRO; POPKIN, 2002).

Campo e Almeida (2007) avaliaram a prevalência de sobrepeso e obesidade em adolescentes em escolas em Fortaleza, encontrando prevalência total de sobrepeso e obesidade de 19,08%, enquanto nas escolas privadas foi de 23,96%

(CAMPOS; LEITE; ALMEIDA, 2007). Silva *et al.* (2011) mostraram que a prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes de uma escola de rede privada em Recife foi de 20% nas crianças e 35% nos adolescentes (SILVA *et al.*, 2011). Fonseca *et al.* (2010), avaliaram no Rio de Janeiro, 391 estudantes entre 12 a 17 anos de idade e encontraram a prevalência de sobrepeso em 23,9% no gênero masculino e 7,2% no gênero feminino (FONSECA *et al.*, 2010). Devido ao aumento da prevalência da obesidade em adolescentes e sua associação com co-morbidades, a utilização de uma avaliação antropométrica para identificar aqueles que têm risco de sobrepeso/obesidade e consequentemente estabelecer medidas preventivas de mudanças de estilo de vida (BUTTE; NGUYEN, 2010; CHEN *et al.*, 2012; DE MORAES *et al.*, 2011).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E SÍNDROME METABÓLICA

Para Hutchenson e Rocic (2012) em um estado patológico, como a SM, o aumento da capacidade oxidante associada com a diminuição da capacidade antioxidante, cria um ambiente que propicia o estresse oxidativo (EO). O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNS) durante o EO possui efeitos tóxicos sobre as células e tecidos através do aumento da oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas. Como por exemplo, os ácidos graxos livres podem estimular, de forma independente ou em conjunto com a hiperglicemia, a produção de EROS e ERNS podendo infligir danos macromoleculares, desempenhando um papel-chave na patogênese do diabetes sendo então associada a eventos cardiovasculares com uma alta taxa de mortalidade (HUTCHESON; ROCIC, 2012).

Alguns estudos têm relacionado o EO com a obesidade e com os níveis de glicose e hiperinsulinemia, e tem demonstrado ser o elo para o desenvolvimento da resistência periférica à ação da insulina em pacientes obesos (ABDILLA *et al.*, 2007; CERIELLO; MOTZ, 2004; LEE, 2001; MENON *et al.*, 2004; URAKAWA *et al.*, 2003). A obesidade está associada ao aumento do EO e este pode desencadear o desenvolvimento da resistência à insulina (URAKAWA *et al.*, 2003). Portanto, o EO está associado à elevações do IMC (OHMORI *et al.*, 2005), relação cintura-quadril e aos níveis de triacilgliceróis (LEE, 2001).

Em termos gerais, o EO é definido como o desequilíbrio entre a produção excessiva de radicais livres e a depleção de antioxidantes (MATHUR; DEVARAJ; JIALAL, 2002).

Um radical livre é qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Estas moléculas são eletricamente carregadas que procuram e capturam elétrons de outras substâncias para se neutralizar. Embora o ataque inicial torne o radical livre neutralizado, outro radical livre é formado no processo, resultando em uma reação em cadeia. Subsequentemente, até que os radicais livres sejam desativados, milhares de reações de radicais livres podem ocorrer dentro de apenas alguns segundos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006).

Uma variedade de processos enzimáticos e não enzimáticos podem gerar radicais livres em mamíferos. Algumas das mais importantes fontes são: a cadeia respiratória mitocondrial, as oxidases da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a xantina oxidase, a lipoxigenase, a óxido nítrico sintase e a mieloperoxidase (SUGAMURA; KEANEY JR, 2011).

As EROs mais relevantes e deletérias que são originadas nos sistemas biológicos incluem o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (HO^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último, juntamente com o radical ácido hipocloroso e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) não são radicais livres, mas estão envolvidos nas reações de radicais livres e assim contribuem para o EO (CIRCU; AW, 2010; RIZZO et al., 2009).

As ERNs são derivadas do processo biológico de auto oxidação do NO para formar o anidrido nitroso e da reação do NO com o ânion superóxido para formar $ONOO^{\cdot}$ (DEDON; TANNENBAUM, 2004).

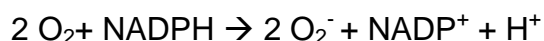
Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre a geração de EROs e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O mecanismo de ação dos antioxidantes inclui desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das EROs, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres até o aumento da geração de antioxidantes endógenos (BELLÓ, 2002). Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos e conforme a ação sobre as EROs/ERNs, podem ser denominados de “*scavenger*”, quando estes agem transformando estas espécies radicalares em outras menos reativas ou “*quencher*”

quando há a neutralização completa através da absorção da energia de excitação (SIES et al., 1983). O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo do O^{2-} e H_2O_2 . No sistema enzimático, destaca-se a enzima superóxido dismutase (SOD). Esta é o maior sistema de defesa da célula vascular e catalisa a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (ACHARYA et al., 1991).

Outros antioxidantes, obtidos através da dieta, são vitamina A, vitamina C, vitamina E e carotenóides. Além disso, várias moléculas são sintetizadas dentro do organismo e possuem atividades antioxidantes, como a glutatona (DUTHIE; CROZIER, 2000; RAMAKRISHNA; JAILKHANI, 2007).

Se o sistema antioxidante não inativar as EROs/ERNs, elas podem reagir com macromoléculas e iniciar o processo de lipoperoxidação, causar dano ao DNA ou induzir modificações em proteínas e ácidos nucleicos (ROBERTS; SINDHU, 2009).

A NADPH oxidase está associada à membrana plasmática e é encontrada em uma variedade de células de origem mesodérmica, entre elas os fagócitos estritos e linfócitos B. Nestes últimos, tem função de catalisador da produção de superóxido pela redução do oxigênio, usando o NADPH como doador de elétron (BARBIOR, 1999), conforme vemos na reação abaixo:



O ânion superóxido é o precursor de outras EROs/ERNs, como peróxido de hidrogênio (apesar de ser uma molécula estável, na presença de metais pode vir a se tornar uma espécie radicalar), radical hidroxila e oxigênio singlete. Esses oxidantes são utilizados pelos fagócitos para destruir microrganismos invasores (WILHELM et al., 2005).

A NADPH encontra-se inativa nas células em repouso, pelo fato dos seus componentes estarem localizados em locais distintos da célula. A presença de um agente estranho (estímulo) leva à ativação da enzima e ao consumo de oxigênio para produção de superóxido, processo conhecido como *burst* respiratório. Além de envolvido diretamente na fagocitose, as EROs também exercem um papel importante na modulação da resposta inflamatória, através da indução da produção de citocinas, gerando retroalimentação (*feedback*) e atraindo mais neutrófilos para o local de infecção (QUINN; GAUSS, 2004). Esses compostos são essenciais na defesa, porém em grande quantidade, podem ser prejudiciais, desencadeando

inflamação, peroxidação lipídica e dano tecidual (CHANG-HUI; YEN-JU; YIN-CHOU, 2004; WADDELL et al., 1994).

A produção excessiva de radicais livres e o dano oxidativo parece explicar, pelo menos em parte, a perpetuação da resistência a insulina, a alteração na produção de energia, a disfunção endotelial e o aparecimento de complicações vasculares nessa condição. Observações clínicas e experimentais indicam o EO como um importante mecanismo na hipertensão, diabetes e obesidade associadas à SM e às suas complicações (ECKEL et al., 2005; MONCADA; HIGGS, 2006).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como a hiperglicemia modula as reações que levam às lesões em células, tecidos e órgãos. Eles incluem a formação de produtos finais avançados da glicação (FGAs) (BAYNES; THORPE, 1999, 2000; BROWNLEE, 2001; STERN et al., 2002), o EO (BAYNES; THORPE, 1999, 2000; MONNIER, 2001), o aumento da atividade da PCK (ISHII; KOYA; KING, 1998), as atividades do fator de crescimento 1 ou citocinas inflamatórias alteradas (IL-1 e IL-6) (PENNATHUR; HEINECKE, 2007; SHARMA; ZIYADEH, 1997) e disfunção mitocondrial (BROWNLEE, 2001; NISHIKAWA et al., 2000; PENNATHUR; HEINECKE, 2007).

A hiperglicemia provoca danos nos tecidos por meio de vários mecanismos, incluindo aumento do fluxo de glicose e outros açúcares, através da via poliol, aumento da FGA intracelular, um aumento da expressão do receptor para os produtos FGA e dos seus ligandos de ativação, a ativação de isoformas da PCK e em relação à atividade da via das hexosaminas (TIWARI et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que o aumento pós-prandial em triacilgliceróis induz EO no endotélio, que promove processos pró-inflamatórios e prejudicam as funções endoteliais (CERIELLO et al., 2002; MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; NAPPO et al., 2002).

Outro fator ligado a SM é a hipertensão. O equilíbrio antioxidante/oxidante está bem estabelecido como um importante regulador fisiológico da pressão arterial e, recentemente, seu papel na patogênese da hipertensão foi consubstanciado (TADDEI et al., 1998).

Mais recentemente, as evidências sugerem que a administração de antioxidante melhora a hipertensão, aumenta a dilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo, diminui a rigidez arterial, e altera os marcadores de EO, incluindo diminuição dos hidroperóxidos de lípidos no plasma (como hidroperóxidos e

Malondialdeído-MDA) e aumenta o poder antioxidante redutor de ferro (PLANTINGA et al., 2007). Também tem sido relatado que esses indivíduos apresentam redução da atividade da SOD, entretanto, sujeitos hipertensos com outros componentes da SM mostram evidências de EO elevado e defesas antioxidantes comprometidas (ABDILLA et al., 2007; ROBERTS; SINDHU, 2009).

O impacto clínico e o significado econômico das comorbidades futuras advindas desta condição patológica conferem à SM o *status* de um grande problema de saúde pública. Estima-se que em longo prazo, haverá enorme apelo médico e sócio-econômico para se identificar mecanismos e marcadores para esta síndrome a fim de auxiliar no combate à progressão da atual epidemia (FILHO; MARIOSA; FERREIRA, 2006).

Em função do exposto, percebe-se a importância do processo inflamatório e do desequilíbrio redox na SM, sobrepeso e obesidade. Como há poucos artigos na literatura mundial estudando a SM e EO em adolescentes e a exploração desse tema praticamente inexistente em nosso país, o objetivo do presente estudo foi delinear os biomarcadores de EO desses pacientes e examinar se a SM e sobrepeso/obesidade têm um perfil oxidativo ou antioxidante diferente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar biomarcadores inflamatórios, pró-oxidantes e antioxidantes em adolescentes com SM em uma amostra representativa do município de Londrina/PR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar através dos critérios estabelecidos indivíduos com SM;
- Estratificar os adolescentes por IMC, normal, sobrepeso e obesidade;
- Associar a SM, sobrepeso, obesidade com os marcadores de EO e metabólicos;
- Avaliar o potencial antioxidante total plasmático (TRAP) e determinação dos níveis de grupamentos tiol (SH-grupo) em adolescentes com SM e sem SM;
- Dosear os níveis de malondialdeído (MDA), metabólitos do óxido nítrico (NOx), e hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria (FOX-LOOH) em ambos os grupos;
- Analisar a atividade antioxidante da enzima paraoxonase 1 (PON-1);
- Quantificar níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) nestes adolescentes.
- Analisar os parâmetros bioquímicos e imunológicos, como ácido úrico, colesterol total, lipoproteínas de densidade baixa (LDL), lipoproteínas de densidade alta (HDL), triacilgliceróis, glicose e insulina.
- Associar os parâmetros de estresse oxidativo e laboratoriais com a obesidade e a SM.

3 MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Delineamento

Primeiramente foi feito um estudo transversal envolvendo adolescentes entre 11 e 17 anos de escolas públicas da cidade de Londrina. Após análises bioquímicas, medição da CA e pressão arterial, foram identificados adolescentes com SM e comparados a um grupo controle.

3.1.2 Cálculo do tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se uma equação para estimativa de parâmetros populacionais, na qual se inseriu uma prevalência de SM registrada nos estudos de 4,0% (FULAZ; NETTO-OLIVEIRA, 2009), precisão de 2%, significância de 5%, efeito de delineamento de 2,0 (por utilizar amostras por conglomerado: as turmas) e acréscimo de 20% considerando futuras perdas/recusas. O cálculo apontou um número total de 886 adolescentes (número amostral mínimo de 710 jovens, sem considerar os 20% para possíveis perdas). De acordo com os critérios da IDF, foram identificados 47 adolescentes com SM e estes foram pareados com 94 indivíduos sem a doença, de acordo com idade e gênero na proporção de 1 caso para 2 controles. Utilizados os critérios da *International Obesity Task Force* (IOTF) (COLE et al., 2000) para separar os participantes por IMC, identificamos 62 adolescentes com IMC normal, 44 com sobrepeso e 35 com obesidade, ou seja, os valores de IMC foram ajustados para idade e gênero. Os dados colhidos dos demais participantes deste trabalho não foram incluídos nesta dissertação.

3.1.3 Considerações Éticas

Este projeto foi avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), considerando a Resolução do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde – 196/96; a Resolução CEPE

nº 63/2003 sobre a criação e regulamentação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL (CEP/UEL); as Resoluções CEPE nº 86 e 87/2003 que insere o Comitê de Ética em Pesquisa da UEL (CEP/UEL) como instância de tramitação de projetos de pesquisa encaminhados por meio das Resoluções CEPE nºs 2.802/95 e 171/97.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, com parecer nº 238/2010 (Apêndice 1).

Todos os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e informados, em detalhes, sobre o estudo a ser desenvolvido. Logo após tomarem ciência do projeto, o termo de consentimento livre e esclarecido foi entregue para que os adolescentes levarem para conhecimento e assinatura dos pais ou responsáveis (Apêndice 2).

3.1.4 Amostras

Para selecionar os participantes utilizou-se um processo de amostragem em dois estágios. Inicialmente, todas as escolas foram listadas e agrupadas de acordo com sua localização geográfica (norte, sul, leste, oeste, centro e anel periférico) e duas ou três escolas foram selecionadas aleatoriamente em cada uma dessas regiões. Dentro destas escolas, todas as turmas do período da manhã que abrangeram a variação de idade proposta (11 a 17 anos: 5ª série do ensino fundamental ao 3º ano do ensino médio) foram elencadas e algumas foram selecionadas aleatoriamente para participar do estudo. Nas turmas selecionadas, todos os alunos matriculados foram convidados a participar.

No processo de seleção dos participantes foram adotados os seguintes critérios de inclusão: a) declarar bom estado de saúde (não fazer o uso frequente de medicamentos, ou estar em tratamento de alguma doença); b) apresentar idade entre 11 e 17 anos de idade; c) estar regularmente matriculado nas escolas selecionadas para o estudo; d) retornar com o termo de consentimento livre e esclarecido devidamente assinado por seus pais ou responsáveis. Foram excluídos aqueles que estavam em uso de medicamentos freqüentes ou vitaminas, não estar matriculado regularmente nas escolas, e a não assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável.

3.1.5 Antropometria

Medidas antropométricas de massa corporal e estatura foram realizadas de todos os participantes de acordo com procedimentos padronizados descritos na literatura (GORDON; CHUMLEA; ROCHE, 1988). A partir dessas medidas, o IMC foi calculado. A altura foi obtida através de um estadiômetro. Também foi obtida a medida da circunferência de cintura mediante a utilização de uma fita métrica de silicone seguindo as padronizações descritas na literatura (KATZMARZYK et al., 2004). Todas as medidas foram efetuadas com os jovens vestindo roupas leves (camisetas e shorts/bermudas), bem como descalços.

3.1.6 Medidas de Pressão arterial e Freqüência Cardíaca

Para a medida da frequência cardíaca, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foi utilizado o aparelho digital da marca *OMRON* modelo HEM-742, validado para adolescentes por Christofaro et al (2009) (CHRISTOFARO et al., 2009).

Empregando-se as tabelas normativas sugeridas pelo *National High Blood Pressure Education Program* (THE FOURTH TASK FORCE, 2004), os adolescentes com valores de PAS e/ou PAD acima do percentil 95 foram classificados como hipertensos, ao passo que aqueles que se encontraram entre os percentis 90 a 95, ou com valores de PA $\geq 120/80$ mmHg, foram designados como pré-hipertensos. Os demais adolescentes foram considerados normotensos.

3.1.7 Coleta de Sangue

Coletas de sangue foram realizadas em sala adaptada para este fim, em cada uma das escolas investigadas, para a determinação de triacilgliceróis (TG), colesterol total (CT), lipoproteínas de densidade baixa (LDL-C) e de densidade alta (HDL-C), glicose, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Para tanto, um técnico de laboratório de Análises Clínicas coletou amostras de 14 mL de sangue venoso na prega do cotovelo, respeitando jejum de 12 horas e as coletas foram realizadas no período matutino. As amostras foram depositada em 02 tubos a vácuo, um com gel separador sem anticoagulante, centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm

em centrífuga (EVLAB[®], Londrina, PR, Brasil) e alíquotas de soro foram armazenadas em freezer a -70°C (Kendro[®], Asheville, NC, EUA) até o momento de uso.

3.1.8 Diagnóstico da Síndrome Metabólica

Não há consenso sobre a definição de SM em adolescentes; no entanto, a maioria dos pesquisadores concorda que a definição pediátrica exige os mesmos fatores de risco que os adultos, mas os pontos de corte adequados dos fatores de risco para as crianças continuam a ser determinados. Em nosso estudo, os adolescentes com SM foram diagnosticados de acordo com IDF (ZIMMET et al., 2007), cujos critérios são a presença de três ou mais dos seguintes componentes: obesidade abdominal (percentil CA \geq 90th em relação à idade e gênero), glicose \geq 100mg/ dL, HDL \leq 40mg/ dL, TG \geq 110mg/dL, e hipertensão arterial (PAS ou PAD $>$ percentil 95 para idade e gênero).

3.2 AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.2.1 Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP)

O TRAP foi avaliado por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método descrito por Repetto *et al.* (1996) (REPETTO et al., 1996) (Anexo I). A metodologia é baseada na geração de radicais peroxila (RO_2^*), por decomposição térmica, a uma velocidade controlada, do azo iniciador dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (ABAP). Sabe-se que o ABAP gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, permitindo assim a detecção de antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no soro ou plasma (YOKOZAWA et al., 2000). Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca Victor X-3, Perkin Elmer[®], (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de 30°C. Os resultados foram expressos em μ M Trolox.

3.2.2 Determinação de Hidroperóxidos por Espectrofotometria (FOX-LOOH)

Os hidroperóxidos (LOOH) foram determinados através da oxidação ferrosa do alaranjado de xilenol (FOX) utilizando a técnica descrita Jiang *et al.* (1992) (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992) (Anexo II). Esse método é baseado na oxidação de íons ferrosos para íons férricos sob condições ácidas que reagem com o corante indicador FOX produzindo um complexo colorido. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic® modelo Helios- α , (Waltham, MA, EUA), em comprimento de onda de 560 nm. A concentração de FOX foi expressa em mM.

3.2.3 Determinação de Malondialdeído (MDA)

A quantificação de MDA foi realizada conforme a técnica descrita por Bastos *et al.* (2012) (BASTOS *et al.*, 2012) (Anexo III) que consiste na medida dos níveis de MDA através da complexação com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), utilizando para estimação do MDA a cromatografia líquida de alta performance (CLAE).

Para a realização da análise do aduto TBA-MDA-TBA foi utilizado um sistema de CLAE Alliance e2695, Waters® (Barueri, SP, Brasil) com uma coluna Eclipse XDB-C18 4,6mm x 250mm 5 μ m, Agilent® (Santa Clara, CA, EUA). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 532 nm. Para análise dos dados foi utilizada curva de calibração preparada com soluções de MDA em diferentes concentrações, comparando medidas de área de pico das amostras com concentrações conhecidas da curva padrão. As concentrações de MDA foram expressas em μ mol de MDA/mg de proteínas.

3.2.4 Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx)

A determinação da concentração de subprodutos do NOx foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez, García-Benayas, Arenas (1998) (NAVARRO-GONZÁLVEZ; GARCÍA-BENAYAS; ARENAS, 1998) (Anexo IV). O óxido nítrico é um gás muito instável e rapidamente se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos, que podem ser detectados no soro. O método de detecção baseia-

se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NO_x foi feita em leitora de microplacas Asys Expert Plus, Biochrom[®] (Holliston, MA, EUA), sendo as leituras feitas em 540 nm. A concentração de óxido nítrico foi expressa em μM .

3.2.5 Determinação do Grupamento Tiol (SH-grupo)

O grupamento tiol de proteínas foi avaliado no plasma por espectrofotometria descrito previamente por Hu (1994)(HU, 1994) (Anexo V). O método de análise é baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com o grupo sulfidril de proteínas. A leitura da reação foi feita em um espectrofotômetro marca Thermo Spectronic[®], modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína.

3.2.6 Determinação da Atividade da Paraoxonase 1 (PON-1)

A atividade total da PON-1 foi determinada pela formação de hidrólise do fenil-acetato (fenol), baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvink, Furlong (2008) (RICHTER; JARVIK; FURLONG, 2008) (Anexo VI). A taxa de hidrólise de fenil-acetato, foi determinada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer[®], modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 270 nm, medidos durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a 25°. A atividade foi expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar do fenil-acetato que equivale a $1,31\text{mMol}/\text{Lcm}^{-1}$.

3.2.7 Determinação do Fator de Necrose Tumoral (TNF α)

O TNF α foi quantificado por Elisa (Kit Human TNF alpha ELISA Ready-Set-Go). A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer[®], modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

3.2.8 Determinações Bioquímicas e Imunológicas

As análises bioquímicas e imunológicas foram mensuradas por metodologias automatizadas. As análises bioquímicas utilizadas foram feitas no aparelho Dimension[®], modelo RxL (Deerfield, IL, EUA). A análise imunológica foi realizada no aparelho Architect i2000SR, Abbott, IL, EUA).

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de tabelas de contingência (teste- χ^2) e teste exato de Fisher foram utilizados para avaliar as associações entre os dados sócio-demográficos, clínicos e grupos de diagnóstico. Foram avaliadas as diferenças de sócio-demográficas, clínicas, metabólicas e os biomarcadores de EO (EROs/ERNs) entre grupos utilizando análises de variância (ANOVAs), seguido pelo teste de Tukey a examinar múltiplas comparações entre os valores médios do grupo quando a variância total foi significativa. A análise de regressão logística binária automática com os pacientes com SM como variável dependente (e sem SM como grupo de referência) e os biomarcadores do EO como variáveis explicativas foi utilizado para delinear as variáveis importantes que estão associados com SM. A análise de regressão logística multinomial foi utilizada para examinar os preditores significativos de grupos divididos de acordo com o IMC em indivíduos com sobrepeso e obesidade no grupo com IMC normal, como grupo de referência. Empregou-se modelo linear geral uni e multivariada para examinar as relações entre os biomarcadores do EO, por um lado, e os marcadores metabólicos, obesidade central, SM, sobrepeso e obesidade, por outro. Análise fatorial exploratória (componente principal) foi utilizada para interpretar as associações entre os biomarcadores do EO, grupos de diagnóstico (os SM ou obesidade ou sobrepeso) e dados metabólicos. Foi utilizada uma rotação varimax dos componentes principais subtraídos para interpretar o conjunto de dados. A normalidade da distribuição foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnovoffit. O teste de Levene foi utilizado para testar a homogeneidade da variância. Usamos as transformação logarítmica neperiana no caso de variáveis que não tiveram distribuição normal ou quando havia uma heterogeneidade da variância entre os grupos de estudo (ANOVAs).

Todos os testes foram bi-caudal e um valor de p de 0,05 foi usado para significância estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo: Submetido para Metabolism Clinical and Experimental

4.1 OXIDATIVE AND ANTIOXIDANT BIOMARKERS OF THE METABOLIC SYNDROME AND OVERWEIGHT /OBESITY IN ADOLESCENTS

Kamila L. Bonifácio¹, Michael Maes², Carine C. Farias¹, Chiara C. Bortolasci¹, Danilo R. Pereira³, Edilson S. Cyrino³, Suzana L. Nixdorf⁴, Danielle Venturini⁵, Décio S. Barbosa^{5*}.

¹Laboratory of Graduation Research, State University of Londrina, University Hospital, Londrina, Paraná, Brazil

²School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia .

³Metabolism, Nutrition, and Exercise Research Group, Sport and Physical Education Center, State University of Londrina

⁴Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

⁵Department of Clinical Analysis and Toxicological, State University of Londrina,

E-mail:

kamilalondrina@hotmail.com;dr.michaelmaes@htmail.com;

carine_coneglian@yahoo.com.br;chiarabortolasci@gmail.com;

danielorpsilva@gmail.com; danielle.venturini@bol.com.br; sabatini@uel.br.

*Corresponding author at: Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil. Tel.; (55) (43) 3371245.

E-mail address: sabatini@uel.br (D.S.Barbosa).

ABSTRACT

Background and Aims: The metabolic syndrome (MetS) is a common and complex disorder that consists of various abnormalities, including dyslipidemia, obesity, hypertension and hyperglycemia, and is also accompanied by increased reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species associated with a decrease in antioxidant defenses creating an environment that promotes oxidative and nitrosative stress (O&NS). The aim of this study was to investigate the alterations in the oxidant/antioxidant status in adolescents with metabolic syndrome (MetS), overweight and obesity. **Methods:** Blood specimens were collected from study participants aged 11–17 (n=886) recruited from public schools located in the city of Londrina, Paraná, Brazil. After considering inclusion and exclusion criteria, all adolescents who met with the MetS criteria (n=47) were included in the study and they were matched to 94 subjects without the MetS (ratio 1:2). We also used the International Obesity Task Force (IOTF) criteria to divide the subjects into those with a normal BMI, overweight/ obesity and measured for oxidative stress biomarkers: nitric oxide metabolites (NOx), lipid hydroperoxides (FOX-LOOH), malondialdehyde (MDA), total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), paraoxonase (PON 1) activity thiol group (SH-group), tumor necrosis factor- α , and metabolic variables. **Results:** Individuals with MetS had a trend higher NOx levels, and significantly higher levels of uric acid, MDA and lowered TRAP/uric acid as compared to individuals without MetS. There were no significant differences in any of the other biomarkers. The group divided in normal BMI, overweight and obesity showed that TRAP/uric acid ratio significantly lower in subjects with obesity and overweight than in those with a normal BMI, however no had significant difference between the three studied groups in other biomarkers. Logistic regression showed that MDA and NOx were directly associated and TRAP/uric acid was inversely associated with MetS. Moreover MetS (no MetS as reference group) was associated with BMI, MDA and SH-groups. Parameter estimate analyses showed that gender, NOx and TRAP/uric acid were associated with obesity and none of these variables was associated with overweight. **Conclusion:** These results confirm that adolescents with MetS have a redox imbalance, MetS and obesity adolescents have a different O&NS profile and suggest that MetS increased biomarkers of oxidative stress, in particular, MDA.

Keywords: Metabolic Syndrome, Adolescents, Oxidative Stress

INTRODUCTION

Childhood metabolic syndrome (MetS) promotes the development of premature atherosclerosis, increases cardiovascular disease risk early in life and increases the risk for the MetS in adulthood¹. Key characteristics of the MetS are central obesity, insulin resistance and dyslipidemia as evidenced by increased levels of insulin, glucose and triglycerides, but lowered levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol^{2,3}. There is also evidence that in adults the MetS is accompanied with other metabolic biomarkers, including increased levels of uric acid and pro-inflammatory cytokines⁴⁻⁶. Increased levels of uric acid may play a role in the pathophysiology of the MetS for example by inhibiting endothelial functions⁷. Central obesity is accompanied by a chronic mild inflammatory state mediated by an increased production of pro-inflammatory by immune cells and adipocytes, including tumor necrosis factor alpha (TNF α). This pro-inflammatory response is regarded to function as a homeostatic process that attenuates excess fat accumulation. Indeed, an increase in body weight and concomitant lipid storage are anabolic processes, while pro-inflammatory cytokines stimulate catabolism and lipolysis⁸. However, adipocyte dysfunction and the consequent peripheral insulin resistance and the chronic inflammatory state drive cardiovascular risk in children, adolescents and adults with the MetS. Moreover, the clustering of these cardiovascular risk factors in children (e.g. insulin resistance, lipid partitioning and pro-inflammatory cytokine profile) together with genetic factors (e.g. ethnicity and a family history of type 2 diabetes) is associated with increased morbidity in childhood and predicts the presence of adverse outcomes we in adulthood⁹.

The MetS is also accompanied by increased reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species associated with a decrease in antioxidant defenses creating an environment that promotes oxidative and nitrosative stress (O&NS). These processes may result in toxic effects on cells and tissues by increasing the oxidation of carbohydrates, lipids, proteins and DNA, and nitrosylation of proteins^{10,11}. There is a strong association between the MetS and obesity and O&NS and antioxidant biomarkers, including oxidized low-density lipoprotein, glutathione, glutathione peroxidase, GSH-reductase, GSH-transferase activity and 8-isoprostane¹².

In adults, obesity is associated with low systemic antioxidant defenses and enhanced lipid peroxidation, as indicated by increased levels of malondialdehyde

(MDA) associated with indices of adiposity¹³. There is also evidence that the adult MetS is accompanied by lowered plasma concentrations or activity of paraoxonase / arylesterase 1 which bound to plasma HDL determines part of the antioxidant capacity of this lipoprotein¹⁴.

However, only few studies focused on ROS, RNS and O&NS in children or adolescents with the MetS or obesity compared with the great number of such studies in adults. Nevertheless, associations between oxidative stress markers and obesity-related disorders children have been reported¹⁵. Recently, it has been shown that obese children with anthropometric parameters indicative of abdominal obesity exhibit an increase in several oxidative stress markers, e.g., 8-isoprostane F2a, advanced oxidation protein products, carbonyl groups, nitrosative stress, leptin, IL-6 and IL-10^{3,15}. Some studies also found reduced total antioxidant capacity and decreased antioxidant vitamin levels (α -tocopherol and β -carotene) multimetabolic syndrome in childhood obesity^{5,16,17}. All in all, it has remained elusive which O&NS or antioxidant biomarkers are specific to the MetS or obesity and whether there are differences in O&NS profiles between the MetS and obesity in adolescents.

Therefore, the aim of the present study is to delineate O&NS and antioxidant biomarkers of the MetS and obesity/overweight in adolescents and to examine whether the MetS and obesity/overweight have a different oxidative or antioxidant profile. We expected to find increased inflammatory and O&NS biomarkers (nitric oxide metabolites-NOx, MDA, TNF α , lipid hydroperoxides-FOX-LOOH) and lower levels of antioxidants (paraoxonase 1- PON-1 activity, thiol groups- SH-groups, and total radical-trapping antioxidant parameter- TRAP) in the MetS or obesity based on previous literature.

2 SUBJECTS AND METHODS

2.1 Subjects

This is cross-sectional study which recruited both male and female adolescents of all ethnicities between 11 and 17 year old. They were recruited from public schools located in the city of Londrina, Paraná, Brazil. The primary sample size, i.e. 886 adolescents, was calculated using an equation, which estimates population parameters based on the prevalence of the MetS, i.e. 4.0%¹⁸. All

participants (n=886) underwent a physical examination, anthropometric measurements and a structured interview, which collected data on medical history. Exclusion criteria for the subjects were: clinical or laboratory signs of medical disease, being under treatment for any disease, use of illicit drugs, and not being regularly enrolled in schools. The parents and the adolescents gave their signed informed consent to participate in the study, according to the protocol (n°238/2010) which was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the State University of Londrina. After considering inclusion and exclusion criteria, all adolescents who met with the MetS criteria (n=47) were included in the study and they were matched to 94 subjects without the MetS (ratio 1:2). The other adolescents were excluded from this study sample.

2.2 Anthropometric Measurements

Anthropometric measurements of body weight and height were measured in all participants. Using standardized methods¹⁹, we measured body weight using a digital scale with an accuracy of 0.1 kg, and body height using a portable wooden stadiometer with an accuracy of 0.1 cm. Consequently, body mass index (BMI) was calculated as the ratio of body weight (in meter)² on body weight in kg. Waist circumference (WC) was measured at the level of the umbilicus. Hip circumference was measured over light clothing at the widest girth of the hip using an unstretched tape meter, without any pressure to body surface. Systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) were assessed using the digital OMRON Model HEM-742, validated for adolescents by Christofaro et al²⁰. Two measurements were obtained on the right arm with a time interval of at least two minutes between the two measurements. The final blood pressure value was determined as the arithmetic mean of those two measurements.

2.3 Definitions MetS, overweight and obesity

There is no consensus definition of the MetS in children or adolescents. However, the majority of researchers agree that the pediatric definition requires the same risk factors as in adult MetS but that the most appropriate risk factor cut-off values remain to be determined¹⁹. In our study, the MetS was diagnosed according to

the International Diabetes Federation (IDF) consensus²¹. The criteria are: presence of three or more of the following components: abdominal adiposity (WC \geq 90th percentile with regard to age and gender), impaired glucose metabolism (fasting glucose \geq 100 mg/dL), high-density lipoprotein cholesterol \leq 40 mg/dL, triglycerides \geq 110 mg/dL, and hypertension (systolic or diastolic blood pressure $>$ 95th percentile for age and gender). We used the International Obesity Task Force (IOTF)²² criteria to divide the subjects into those with a normal BMI, overweight and obesity, that is BMI cut off values are adjusted for age and gender.

2.4 Laboratory measurements

Fasting blood was collected from the antecubital vein between 8 a.m. and 10.00. a.m. Uric acid, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), triglycerides, glucose, insulin were determined by automated methods using Dimension[®]RxL, (Deerfield, IL, USA) and i2000SR Architect (Abbott, IL, USA). The inter-assay coefficients of variability for all analytes were less than 10%.

2.5 Biomarkers of Oxidative stress and inflammatory

2.5.1 Nitric oxide metabolites (NOx)

The nitric oxide (NO) is a biologically active messenger molecule synthesized from L-arginine by a group of NO synthases (NOS). NO has a wide range of physiological and pathophysiological actions, such as inflammation, vasodilation, and metabolism. Because NO is highly labile, measurement of the relatively stable metabolites, nitrate and nitrite (NOx), is employed as an index of NO production and as a marker of NOS enzyme activity²³. NO levels were assessed indirectly by determining the plasma nitrite concentration using an adaptation of the technique described Navarro-González et al²⁴. This method is based on the reduction of the nitrate present in the sample to nitrite by oxidation-reduction reactions mediated by the system cadmium-copper reagent. Thereafter, Griess reagent was added to induce diazotization, forming a colored complex and subsequent detection at 540

nm. The quantification of NO_x was made in a microplate reader Asys Expert Plus, Biochrom[®] (Holliston, MA, USA). The nitric oxide concentration was expressed in μM .

2.5.2 Lipid hydroperoxides – spectrophotometric assay (FOX-LOOH)

Hydroperoxides (LOOH) were determined using the ferrous oxidation xylenol orange (FOX) using the technique described by Jiang et al²⁵. The reading was performed at 560 nm in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, USA). The concentration was expressed in mM.

2.5.3 Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)

TRAP was evaluated according to the method described by Repetto et al²⁶ in microplate reader Victor X-3, Perkin Elmer[®] (Waltham, MA, USA). Experimental conditions were: running time of 25 minutes, response range from 300 to 620 nm and a temperature of 30°C. This method detects hydro and/or liposoluble antioxidants present in serum. The results were expressed in μM trolox.

2.5.4 Thiol groups (SH-group)

Thiol groups from proteins were evaluated by the method described by Hu²⁷ and is based on the reaction of 5,5-dithiobis-2 nitrobenzoic acid (DTNB) with sulfhydryl groups. Determination was conducted in a spectrophotometer Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, USA) at 412 nm. Results are expressed as $\mu\text{M}/\text{mg}$ of plasmatic protein.

2.5.5 Paraoxonase 1 (PON 1) activity

Total plasmatic activity of PON1 was determined by the method described by Richter et al.²⁸ The rate of hydrolysis of phenyl acetate was determined in a microplate reader EnSpire, Perkin Elmer[®] (Waltham, MA, USA) at 270 nm. And the temperature maintained at 25°C. Measures were recorded for 4 minutes each 15 seconds. The activity was expressed in U/mL based on the phenyl acetate molar extinction coefficient of $1.31 \text{ mMol/L cm}^{-1}$.

2.5.6 Malondialdehyde (MDA) assay

MDA was quantified according to the technique described by Bastos et al.²⁹ which measures the levels of MDA by complexation with two molecules of thiobarbituric acid (TBA) using MDA estimation through high performance liquid chromatography (HPLC Alliance e2695, Waters[®], Barueri, SP, Brasil). Experimental conditions included the use of a column Eclipse XDB-C18, Agilent[®] (Santa Clara, CA, USA) mobile phase consisting of 65% phosphate buffer (50 nM pH 7.0) and 35% HPLC grade methanol; flow rate of 1.0 mL/minute; temperature of 30°C; wavelength of 532 nm. MDA concentration in the samples was quantified based on a calibration curve and are expressed in μmol of MDA/mg proteins.

2.5.7 Determination of TNF α

TNF α was quantified by ELISA (Human TNF alpha ELISA Ready-Set-Go). Reading there action was performed at 450 nm in a microplate reader, PerkinElmer[®] model EnSpire (Waltham, MA, USA).

2.6 Statistical Analysis

Analyses of contingency Tables (χ^2 -test) and Fisher's exact probability test were employed to examine associations between socio-demographic and clinical data and diagnostic groups. We assessed the differences in socio-demographic, clinical, metabolic and IO&NS biomarker data between groups using analyses of variance (ANOVAs) followed by the Tukey test to examine multiple comparisons among group mean values when the overall ANOVA was significant. Automatic stepwise binary logistic regression analysis with the MetS as dependent variable (and no MetS as reference group) and the IO&NS biomarkers as explanatory variables was used to delineate the significant explanatory variables that are associated with the MetS. Multinomial logistic regression analysis was used to examine the significant predictors of groups divided according to the BMI into individuals with overweight obesity and the group with a normal BMI as reference group. We employed univariate and multivariate general linear model (GLM) analyses to examine the relationships between the IO&NS biomarkers, on the one

hand and the metabolic and central obesity markers and the MetS, overweight and obesity, on the other. Exploratory factor (principal component – PC) analysis was employed to interpret the associations between the IO&NS biomarkers and diagnostic groups (the MetS or obesity or overweight) and metabolic data. We used a varimax rotation of the subtracted principal components to interpret the data set. Normality of distribution was checked by means of the Kolmogorov–Smirnov goodness of-fit test. The Levene test was used to test for homogeneity of variance. We used logarithmic (Ln) transformations in case variables were not normally distributed (GLM analyses) or when there was a heterogeneity of variance between study groups (ANOVAs). All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance.

3. RESULTS

3.1 Characteristics of the MetS.

Table 1 shows the socio-demographic and clinical data of the subjects with and without the MetS. There were no significant differences in age, gender or tobacco use disorder (TUD) between subjects with and without the MetS. Body weight, BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, glucose, insulin and triglyceride levels were significantly higher in individuals with the MetS as compared with those without. HDL-C levels were significantly lower in those with the MetS than in those without. There were no significant differences in total cholesterol or LDL-C between both groups.

Table 2 shows the inflammatory and O&NS biomarkers in both diagnostic groups. There was a trend towards significantly higher NOx levels in subjects with the MetS. Subjects with the MetS showed significantly higher uric acid and MDA levels as compared to those without the MetS. The TRAP / uric acid level was significantly lower in those with the MetS than in those without. There were no significant differences in any of the other biomarkers.

Table 3 shows the outcome of an automatic stepwise binary logistic regression analysis with the MetS as dependent variable (no MetS as reference

group) and the biomarkers as explanatory variables (a first analysis without uric acid). We detected that three variables were significantly associated with the MetS ($\chi^2=24.89$, $df=3$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.252). The overall percentage of correctly classified subjects was 75.8% (sensitivity=47.6% and specificity=90.2%). MDA and NOx were significantly associated with the MetS, whereas TRAP / uric acid was inversely associated with the MetS. Forced entry of age (Wald=0.00, $df=1$, $p=0.924$), gender (Wald=0.73, $df=1$, $p=0.392$) and TUD (Wald=0.17, $df=1$, $p=0.683$) showed that those factors were not associated with the MetS and that they did not change the significance levels of the three explanatory biomarkers. When entering uric acid as additional explanatory variable we found that 78.2% of the cases were correctly classified (sensitivity=52.4% and specificity=91.5%, $X^2=27.24$, $df=3$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.273) using MDA (Wald=10.79, $df=1$, $p=0.001$), uric acid (Wald=8.50, $df=1$, $p=0.004$) and NOx (Wald=4.19, $df=1$, $p=0.041$) as explanatory variables.

3.2 Characteristics of overweight and obesity

Table 4 shows that there was a highly significant association between groups divided according to body mass index (BMI) into subjects with a normal BMI, overweight and obesity (Cole et al., 2000) and the MetS ($\chi^2=33.30$, $df=2$, $p<0.001$). Comparisons of the column properties adjusted for all pair wise comparisons (two-sided at $p=0.05$) within a row of each innermost sub-table using the Bonferroni correction shows that all pairs were significantly different from each other.

1

Table 5 shows the characteristics of subjects with overweight and obesity versus those with a normal BMI. Although ANOVA showed a marginally significant difference in age between the groups, Tukey test did not reveal any differences between the three study samples. There were no significant differences in gender between the three study groups. Fisher's exact probability test showed no significant difference in TUD prevalence between those with a normal BMI and those with overweight or obesity ($p=0.213$). Body weight, BMI, and waist circumference were significantly different between the three categories. Systolic and diastolic blood pressure were significantly higher in subjects with obesity than in those with overweight or a normal BMI. Insulin and triglyceride levels were significantly higher in subjects with overweight and obesity than in those with a normal BMI. Total

cholesterol was not significantly different between the study groups. HDL-C was significantly lower in those with overweight and obesity than in those with a normal BMI. LDL is significantly higher in subjects with obesity and overweight than in those with normal BMI. The TRAP / uric acid ratio was significantly lower in subjects with obesity and overweight than in those with a normal BMI. There were no significant differences between the three study groups in glucose, total cholesterol, NOx, FOX, TNF α , PON-1 activity, SH groups and MDA levels.

Polynomial logistic regression analysis with obesity and overweight as the dependent variables (the group with the normal BMI as reference group) and the IO&NS biomarkers, age and gender as explanatory variables showed that three variables were significantly associated with the IOTF classification ($\chi^2=38.22$, $df=16$, $p=0.001$, Nagelkerke=0.30), i.e. gender ($\chi^2=10.38$, $df=2$, $p=0.006$), NOx ($\chi^2=6.76$, $df=2$, $p=0.034$) and the TRAP/uric acid ratio ($\chi^2=13.27$, $df=2$, $p=0.001$). Parameter estimate analyses showed that none of these variables was associated with overweight and that the three variables were significantly associated with obesity, i.e. gender (Wald=6.71, $df=1$, $p=0.010$), NOx (Wald=5.05, $df=1$, $p=0.025$) and the TRAP/uric acid ratio (Wald=9.87, $df=1$, $p=0.002$). Including uric acid in the same analysis showed that three variables were significantly associated with the IOTF categories ($\chi^2=39.76$, $df=6$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.31), i.e. gender ($\chi^2=8.24$, $df=2$, $p=0.016$), age ($\chi^2=12.24$, $df=2$, $p<0.001$) and the uric acid ($\chi^2=28.90$, $df=2$, $p<0.001$). Parameter estimate analyses showed that uric acid was significantly associated with overweight (Wald=6.78, $df=1$, $p=0.009$) and obesity (Wald=20.82, $df=1$, $p<0.001$).

3.3 Intercorrelations between IO&NS biomarkers and metabolic variables

Because Table 4 shows that the MetS and the IOTF classification are strongly associated it is difficult to conclude from Tables 2 and 5 which IO&NS variables are associated with the MetS or the IOTF classification. In order to explore these associations we have carried out additional multivariate analyses. An automatic logistic regression analysis with the MetS as dependent variable and age, gender, BMI, IOTF classification and the IO&NS biomarkers as explanatory variables showed that 83.1% of the cases were correctly classified (sensitivity=69.0% and specificity=90.2%, $X^2=57.96$, $df=3$, $p<0.001$, Nagelkerke=0.517) using MDA (Wald=10.33, $df=1$, $p=0.001$), SH-groups (Wald=4.99, $df=1$, $p=0.025$) and BMI

(Wald=28.46, df=1, $p<0.001$) as explanatory variables. Multivariate GLM analysis with all IO&NS biomarkers as dependent variables and the MetS, the IOTF classification, age and gender as explanatory fixed factors showed that the MetS ($F=2.80$, $df=8/111$, $p=0.007$) and IOTF classification ($F=1.86$, $df=16/224$, $p=0.026$), had significant effects on the IO&NS biomarkers, i.e. the MetS was significantly associated with higher MDA ($t=3.31$, $p=0.001$) and SH-groups ($t=2.03$, $p=0.044$), while uric acid was associated with the normal ($t=-4.03$, $p<0.001$) and overweight ($t=-2.38$, $p=0.019$) IOTF groups.

In order to examine the factor structure of the data set we performed a factor analyses on the IO&NS biomarkers and the MetS and IOTF classification.

Table 6 Shows that first varimax-rotated PC explained 17.7% of the variance and loaded highly on the MetS, the IOTF groups and NOx, while the second varimax-rotated PC explained 16.8% of the variance and loaded highly on the MetS, TRAP (negatively), SH-groups and MDA.

In order to delineate which metabolic markers predict the IO&NS biomarkers, we have performed a multivariate GLM analysis with the IO&NS biomarkers as dependent variable and the metabolic markers (i.e. body weight, waist circumference, systolic blood pressure, glucose, HDL-C, LDL-C, triglycerides and insulin) as explanatory variables. We found that only glucose ($F=4.27$, $df=7/117$, $p<0.001$) and HDL-C ($F=2.30$, $df=7/117$, $p=0.031$) had significant effects on the IO&NS biomarkers. Tests of between-subjects effects showed significant associations between glucose and SH-groups ($F=20.82$, $p<0.001$) and MDA ($F=8.18$, $p=0.005$), while HDL-C is associated with PON-1 activity ($F=9.38$, $p=0.003$).

4. DISCUSSION

The major findings of this study are that a) the MetS in adolescents is characterized by increased oxidative biomarkers and lowered antioxidant defenses, as expected, but also by increased SH-groups; b) increased MDA and SH-groups are specific oxidative biomarkers of the MetS, while uric acid is specifically associated with obesity; and c) increased NOx and lowered TRAP levels are associated with the MetS and overweight/obesity. Moreover, by using three biomarkers, i.e. NOx, TRAP and SH-groups or NOx, MDA and uric acid, we were able to predict the MetS with an accuracy of 75-78% correctly classified individuals.

Our findings extend those of previous studies showing a significant impaired oxidant / antioxidant status in adolescents with the MetS or overweight / obesity. In our study the most important and specific biomarker of the MetS was MDA. MDA is an end product of lipid peroxidation and is the result of a prolonged state of oxidative stress. MDA levels are frequently assessed with the assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). However, this spectrophotometric assay lacks specificity because other aldehydes besides MDA react with thiobarbituric acid. In our study we used a more sensitive and specific assay of MDA, i.e. high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis with fluorescent detection³⁰. In Middle Eastern countries, and in European and American obese and overweight men and women, lipid peroxidation increases significantly with increasing BMI. Elevated MDA also occurs in obese adolescents and children between 8 and 18 years old³¹. Obese children show MDA levels that are twice as high as those in non obese children^{31,32}. Interestingly, in children with hypertension treatment with antihypertensives for one year significantly reduced TBARS levels in association with reductions in BMI³³. All in all, our results show that plasma lipid peroxidation as measured with MDA is the most important O&NS biomarker of the MetS in adolescents, showing that enhanced MDA production occurs at juvenile ages and thus may play a role in the development of lipid peroxidation-related disorder, including cardio-vascular disorder.

Another characteristic of the MetS, albeit less significant than MDA, is the increase in SH-groups. These findings are not in agreement with our a priori hypothesis and with previous findings on lowered SH-groups in adult MetS³⁴. Thus, Ziobro et al³⁴ found significantly lowered thiol groups in erythrocyte membranes and GSH in erythrocytes of adult subjects with the MetS. These differences may be explained by differences in study samples (adult versus adolescents) or methods to assay the SH groups (erythrocytes versus proteins). It is possible that the increase of the SH-groups in the MetS in our adolescents may be explained by dysfunctions in the folate-dependent methionine cycle in subjects with the MetS, including increased homocysteine levels³⁵.

Disorders of this cycle are found in human and animal conditions associated with increased cardiovascular risk. These metabolic abnormalities result in high levels of homocysteine, a molecule belonging to the group of thiols (SH-groups). Differently from glutathione and cysteine, which exert protective effects against ROS, homocysteine is considered to be a “bad thiol” because of its association with a

variety of chronic disease conditions. Three mechanisms have been proposed, namely, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and activation of pro-inflammatory factors³⁶.

In our study, we found a significant association between the MetS and increased NOx levels. Codoner-Franch et al³ in a study of obese children, reported an increase in plasma nitrite, nitrate, and nitrotyrosine levels associated with markers of oxidative stress, and plasma nitrate levels were correlated with TNF α levels. However, Gruber et. al³⁷ found a decrease in NOx in obese juveniles compared to normal weight juveniles. NO is biosynthesized in several cell types, although vascular endothelium is the major source of total NO synthesis. The measurement of serum NOx levels estimates basal NO generation by endothelial cells. Therefore, it may be speculated that increased serum NOx in the MetS may be due to endothelial NOS (eNOS) inhibition and inducible NOS (iNOS) overexpression¹. In most cell types, including adipocytes, iNOS is induced by inflammatory signals when hypoxia favors cell necrosis, which is a process that recruits macrophages and other phagocytic cells, and which creates a milieu favoring the perpetuation of inflammation within the adipose tissue³⁸. Moreover, when superoxide anion and NO are produced simultaneously in close proximity, a reaction leads to the formation of peroxynitrite and, subsequently, to hydroxyl radicals, amplifying the oxidative process on biomolecules³⁹. All in all, our findings suggest that enhanced plasmatic NO production occurs at the earliest stages of obesity, associated with an increase in the expression of adipocytokines that promote inflammation, and can be related to metabolic risk^{1,3}.

In the present study, we found that UA levels were significantly associated with obesity and the MetS, and that after considering the effects of both the MetS and IOFT categories, increased uric acid was significantly associated with obesity rather than with the MetS or overweight. Our findings extend these of previous authors showing that serum uric acid levels are increased in subjects with obesity, dyslipidemia, hypertension and impaired glucose tolerance, and are associated with the MetS and cardiovascular disease^{40,41}. Most importantly, in a longitudinal study, Wang et al⁴⁰ found that serum uric acid levels were significantly correlated with future increases in waist circumference, systolic blood pressure, and triglyceride and HDL-C plasma levels and thus with an increased risk to develop the MetS. Our results

suggest that increased levels of uric acid are associated with obesity and consequently also with the MetS in adolescents.

The interpretation of our TRAP findings is more difficult as uric acid (which is strongly related to obesity and the BMI) is responsible for ~60% of plasma TRAP and thus the increased uric acid levels in obesity strongly contribute to TRAP levels. In addition, TRAP status may be overestimated in subjects with hyperuricemia, although in our study no subjects with hyperuricemia were included⁶. Thus, when TRAP values were normalized to uric acid or when the results were controlled for BMI we found that lowered TRAP concentrations were associated with the MetS and obesity. These findings are in agreement with those of Molnár et al⁵ who showed that TRAP was decreased in the multimetabolic syndrome group in spite of the slightly elevated concentration of uric acid.

In the present study we found no significant association between lowered PON1 status and the MetS or overweight / obesity. As with the SH groups, our PON1 findings are not in agreement with our a priori hypothesis and the existing literature on the association between lowered PON1 activity and the MetS in adults. Moreover, lowered plasma PON1 activity is associated with an increased risk for insulin resistance and cardiovascular disorders¹⁴.

Our unexpected results may point towards differences between the adult and adolescent MetS. It is possible that disorders in specific oxidative stress biomarkers or antioxidants are secondary to other processes and therefore only appear later during the course or development of the MetS. For example, in obese subjects, the lowered PON activity in HDL particles could be due to the presence of circulating inhibitors such as lipid peroxidation products⁴². Nevertheless, we found that PON1 was significantly and positively correlated with HDL-cholesterol concentrations. Indeed, PON1 is an HDL-associated enzyme, which plays a significant role in inhibiting the oxidation of HDL and LDL particles thereby contributing to most of the antioxidant activity that has been attributed to HDL cholesterol and protecting against the development of atherosclerosis¹⁶. Previously, it was found that in obese adults PON1 activity is diminished and additionally correlated with lowered levels of HDL cholesterol. In a juvenile population, decreased PON1 activity is potentially relevant for the development of atherosclerosis and this may occur independently from effects on HDL cholesterol⁴³.

Lastly, we could not detect significant associations between plasma TNF α levels and the MetS, overweight or obesity. Some studies reported elevated circulating TNF α concentrations in obese children^{44,45}, whereas other studies did not⁴⁶. This may be explained by findings that in obese humans and animals TNF α expression is increased in adipocytes or adipose tissues, whereas circulating plasma TNF α is often not detectable. Indeed, TNF α acts in adipocytes primarily in an autocrine-paracrine fashion via its transmembrane form⁴⁷.

Our results suggest that O&NS may play a role in the pathophysiology of overweight and obesity, the consequences of the MetS and the pathogenesis of the MetS. In this respect, we found positive associations between increased glucose levels and two oxidative stress biomarkers, i.e. MDA and SH-groups. These findings may be explained by directional effects between glucose metabolism and O&NS pathways. Firstly, hyperglycemia is known to generate tissue damage in association with increased ROS and oxidative stress, carbonyl stress, altered cytokine production⁴⁸, activation of the polyol pathway, protein kinase C isoforms and the hexosamine pathway, increased production of advanced glycosylation end products (AGEs), and increased expression of the AGE receptor⁴⁹. Secondly, hyperinsulinemia and/or insulin resistance together with hypertriglyceridemia increase lipid peroxidation⁵. Thus, increased ROS production in the mitochondria from free fatty acid oxidation and inactivation of anti-atherosclerosis enzymes by ROS are associated with insulin resistance leading to cardiomyopathy and atherosclerosis in type 2 diabetes⁴⁹. Thirdly, studies show that excessive and long-term exposure to ROS reduces insulin sensitivity and impairs glucose and lipid metabolism⁵⁰.

Therefore, it may be suggested that in the adolescent MetS increased biomarkers of oxidative stress (in particular MDA), elevated uric acid, dyslipidemia and insulin resistance are interrelated phenomena that play a role in the development, maintenance and consequences of the MetS. Some experiments show that serum MDA levels significantly correlate with serum levels of advanced glycation and glycooxidation in diabetic children⁵⁰, causing cross links between single molecules of proteins and oxidation of LDL particles and leading to early occurrence of atherosclerotic changes⁵¹. Previous studies⁵² showed that the earliest signs of cardiovascular heart disease, such as coronary artery fatty streaks, are already

present in childhood and rapidly increase during adolescence, particularly in those with elevated BMI.

In conclusion, this study demonstrated that adolescents with the MetS have a redox imbalance, characterized by increased plasma lipid oxidation and increased SH-group formation, while obesity is characterized by increased uric acid levels. Increased NOx and decreased TRAP levels are associated with obesity and the MetS. This indicates that the MetS and obesity have a different O&NS profile.

Therefore, it may be suggested that in the adolescent MetS increased biomarkers of oxidative stress (in particular MDA), elevated uric acid, dyslipidemia and insulin resistance are interrelated phenomena that play a role in the development, maintenance and consequences of the MetS.

REFERENCES

1. Ghasemi, A., Zahediasl, S. & Azizi, F. Nitric oxide and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. *Eur. J. Epidemiol.* **25**, 45–53 (2010).
2. Faienza, M. F. *et al.* Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Horm. Res. Pædiatrics* **78**, 158–64 (2012).
3. Codoñer-Franch, P. *et al.* Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* **215**, 475–80 (2011).
4. DeBoer, M. D., Dong, L. & Gurka, M. J. Racial/ethnic and sex differences in the relationship between uric acid and metabolic syndrome in adolescents: an analysis of National Health and Nutrition Survey 1999-2006. *Metabolism.* **61**, 554–61 (2012).
5. Molnár, D., Decsi, T. & Koletzko, B. Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **28**, 1197–202 (2004).
6. Venturini, D. *et al.* Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* . **20**, 2361–6 (2012).
7. Nakagawa, T. *et al.* A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F625–31 (2006).
8. Aballay, L. R., Eynard, A. R., Díaz, M. D. P., Navarro, A. & Muñoz, S. E. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr. Rev.* **71**, 168–79 (2013).
9. Weiss, R. Childhood metabolic syndrome: must we define it to deal with it? *Diabetes Care.* **34 Suppl 2**, S171–6 (2011).
10. Demircan, N. *et al.* The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Med. Sci. Monit.* **14**, 97–101 (2008).
11. Hutcheson, R. & Rocic, P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 1-13 (2012).
12. Hopps, E., Noto, D., Caimi, G. & Aversa, M. R. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20**, 72–7 (2010).
13. Vincent, H. K., Innes, K. E. & Vincent, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes. Obes. Metab.* **9**, 813–39 (2007).
14. Bortolaschi, C. C. *et al.* Lowered plasma paraoxonase (PON)1 activity is a trait marker of major depression and PON1 Q192R gene polymorphism-smoking interactions differentially predict the odds of major depression and bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* **159**, 23–30 (2014).
15. Codoñer-Franch, P. *et al.* Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int. J. Pediatr. Obes.* **5**, 56–63 (2010).

16. Zaki, M. E., El-Bassyouni, H., Kamal, S., El-Gammal, M. & Youness, E. Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dyslipidemia in obese adolescents. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **18**, 340–4 (2014).
17. Zimmermann, M. B. & Aeberli, I. Dietary determinants of subclinical inflammation, dyslipidemia and components of the metabolic syndrome in overweight children: a review. *Int. J. Obes.* **32 Suppl 6**, S11–8 (2008).
18. De Moraes, A. C. F. et al. Prevalence of abdominal obesity in adolescents: a systematic review. *Obes Rev.* **12**, 69–77 (2011).
19. Gordon, C. C., Chumlea, W. C. & Roche, A. F. in *Lohman T.G Roche, AF Martorell, R* (Roche, A. & Martorell, R.) 3–8 (Champaign: Human Kinetics Books, 1988).
20. Christofaro, D. G. D. et al. Evaluation of the Omron MX3 Plus monitor for blood pressure measurement in adolescents. *Eur. J. Pediatr.* **168**, 1349–54 (2009).
21. Zimmet, P. et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr. Diabetes.* **8**, 299–306 (2007).
22. Cole, T. J., Bellizzi, M. C., Flegal, K. M. & Dietz, W. H. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* **320**, 1–6 (2000).
23. Choi, J. W. Enhanced nitric oxide production is closely associated with serum lipid concentrations in adolescents. *Clin. Chim. Acta.* **347**, 151–6 (2004).
24. Navarro-González, J. a, García-Benayas, C. & Arenas, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* **44**, 679–81 (1998).
25. Jiang, Z. Y., Hunt, J. V & Wolff, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202**, 384–9 (1992).
26. Repetto, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta.* **255**, 107–17 (1996).
27. Hu, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* **233**, 380–385 (1994).
28. Richter, R. J., Jarvik, G. P. & Furlong, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **1**, 147–52 (2008).
29. Bastos, A. S. et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal. Biochem.* **423**, 141–6 (2012).
30. Lee, R., Margaritis, M., Channon, K. M. & Antoniades, C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr. Med. Chem.* **19**, 2504–20 (2012).
31. Haszon, I. et al. Platelet aggregation, blood viscosity and serum lipids in hypertensive and obese children. *Eur. J. Pediatr.* **162**, 385–90 (2003).

32. Mohn, A. *et al.* Increased oxidative stress in prepubertal severely obese children: effect of a dietary restriction-weight loss program. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 2653–8 (2005).
33. Sladowska-Kozłowska, J. *et al.* Oxidative stress in hypertensive children before and after 1 year of antihypertensive therapy. *Pediatr. Nephrol.* **27**, 1943–51 (2012).
34. Ziobro, a, Duchnowicz, P., Mulik, a, Koter-Michalak, M. & Broncel, M. Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic syndrome. *Mol. Cell. Biochem.* **378**, 267–73 (2013).
35. Hajer, G. R., van der Graaf, Y., Olijhoek, J. K., Verhaar, M. C. & Visseren, F. L. J. Levels of homocysteine are increased in metabolic syndrome patients but are not associated with an increased cardiovascular risk, in contrast to patients without the metabolic syndrome. *Heart.* **93**, 216–20 (2007).
36. Grattagliano, I., Palmieri, V. O., Portincasa, P., Moschetta, A. & Palasciano, G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 491–504 (2008).
37. Gruber, H.-J. *et al.* Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int. J. Obes.* **32**, 826–31 (2008).
38. Ye, J. Adipose Tissue Vascularization: Its Role in Chronic Inflammation. *Curr Diab Rep.* **11**, 203–210 (2011).
39. Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., Arilla-Codoñer, A. & Alonso-Iglesias, E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl. Res.* **158**, 369–84 (2011).
40. Wang, J.-Y. *et al.* Predictive value of serum uric acid levels for the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents. *J. Pediatr.* **161**, 753–56 (2012).
41. Mangge, H. *et al.* Uric acid best predicts metabolically unhealthy obesity with increased cardiovascular risk in youth and adults. *Obesity.* **21**, E71–7 (2013).
42. Aviram, M. *et al.* Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin. Invest.* **101**, 1581–90 (1998).
43. Krzystek-Korpacka, M. *et al.* Paraoxonase (PON)-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress. *Adv. Clin. Exp. Med.* **22**, 229–36 (2013).
44. Moon, Y.-S., Kim, D.-H. & Song, D.-K. Serum tumor necrosis factor- α levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism.* **53**, 863–867 (2004).
45. Reinehr, T., Stoffel-Wagner, B., Roth, C. L. & Andler, W. High-sensitive C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, and cardiovascular risk factors before and after weight loss in obese children. *Metabolism.* **54**, 1155–61 (2005).
46. Gupta, A., Ten, S. & Anhalt, H. Serum levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor 2 are linked to insulin resistance and glucose intolerance in children. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **18**, 75–82 (2005).

47. Aeberli, I. *et al.* Dietary intakes of fat and antioxidant vitamins are predictors of subclinical inflammation in overweight Swiss children. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 748–55 (2006).
48. Pennathur, S. & Heinecke, J. W. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 955–69 (2007).
49. Tiwari, B. K., Pandey, K. B., Abidi, A. B. & Rizvi, S. I. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J. Biomarkers.* **2013**, (2013).
50. Jakus, V., Bauerova, K., Michalkova, D. & Carsky, J. Values of markers of early and advanced glycation and lipoxidation in serum proteins of children with diabetes mellitus. *Bratisl Lek List.* **101**, 484–489 (2000).
51. Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–61 (2004).
52. Steinberger, J. *et al.* Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Pshysical Activity, and Metabolism. *Circulation.* **119**, 628–47 (2009).

Table 1. Clinical, socio-demographic and biochemical data of subjects with and without the metabolic syndrome (MetS) according to the IDF.

Variables	No MetS (n=94)	MetS (n=47)	F	Df	p-values
Age years	13.02(±1.53)	13.04(±1.71)	0.006	1/139	0.940
Gender M/F	53 / 41	27 / 20	0.01	1	0.904
TUD no / yes	88 / 6	42 / 5	0.79	1	0.374
Body weight kg	54.73(±11.23)	68.63(±17.08)	33.47	1/139	<0.001
BMI kg/m ²	22.03(±3.59)	26.97(±4.80)	46.98	1/139	<0.001
WC cm	71.52(±7.41)	82.56(±9.89)	55.25	1/139	<0.001
SBP mm Hg	112.49(±11.08)	124.38(±10.08)	38.29	1/139	<0.001
DBP mm Hg	64.54(±6.99)	70.65(±7.29)	23.24	1/139	<0.001
Glucose mg/dl	89.47(±4.97)	94.43(±7.30)	22.55	1/139	<0.001
Insulin* µU/ml	7.04(±4.52)	14.90(±9.31)	50.41	1/130	<0.001
Total cholesterol mg/dl	162.76(±31.86)	165.55(±29.54)	0.25	1/139	0.615
HDL-C mg/dl	49.19(±11.23)	34.15(±5.71)	74.43	1/139	<0.001
LDL-C mg/dl	100.26(±29.58)	105.03(±30.04)	0.807	1/139	0.371
Triglycerides* mg/dl	66.53(±29.07)	131.87(±114.32)	43.77	1/139	<0.001

All results are shown as mean (±SD). All results of ANOVAs.*These variables are processed in Ln transformation. TUD: tobacco use disorder; BMI: body mass index; WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol.

Table 2. Measurements of inflammatory and oxidative stress biomarkers in subjects with and without the metabolic syndrome (MetS)

Biomarkers	No MetS	MetS	F	Df	p-values
NOx $\mu\text{M/L}$	4.13(\pm 1.57)	4.75(\pm 2.15)	3.73	1/139	0.06
FOX mM/L	0.75(\pm 0.22)	0.77(\pm 0.22)	0.15	1/139	0.69
TRAP uMTrolox	867.46(\pm 118.13)	899.47(\pm 131.70)	2.19	1/139	0.15
Uric acid mg/dl	4.66(\pm 1.15)	5.48(\pm 1.32)	12.75	1/122	0.001
TRAP/Uric acid	193.92(\pm 40.03)	171.21(\pm 33.40)	9.95	1/122	0.002
TNFα* pg/ml	17.41(\pm 27.87)	24.52(\pm 67.49)	0.58	1/139	0.45
PON-1 U/ml	206.70(\pm 52.11)	205.32(\pm 45.50)	0.02	1/139	0.88
SH-group uM/mg PT	41.97(\pm 6.19)	43.92(\pm 7.37)	2.71	1/137	0.10
MDA uM/mg PT	99.50(\pm 19.07)	109.61(\pm 19.48)	8.61	1/137	0.004

All results are shown as mean (\pm SD). All results of ANOVAs.*This variable is processed in Ln transformation. NOx: nitric oxide metabolites. FOX-LOOH: lipid hydroperoxides. TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter. TNF α : Tumor necrosis factor α ; PON 1: Paraoxonase 1 activity; SH-group: thiol groups. MDA: malondialdehyde.

Table 3. Results of binary logistic regression analysis with the metabolic syndrome as dependent variable (controls as reference group) and the inflammatory and oxidative stress biomarkers as explanatory variables.

Explanatory Variables	B	S.E	Wald	DF	P	Odds ratio	Lower CI 95%	Upper CI 95%
NOx	0.269	0.118	4.78	1	0.029	1.295	1.027	1.633
TRAP/Uric acid	-0.017	0.007	6.75	1	0.009	0.983	0.970	0.996
MDA	0.034	0.011	9.213	1	0.002	1.035	1.012	1.058

NOx: nitric oxide metabolites; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; MDA: malondialdehyde; CI: confidence intervals.

Table 4. Association between the metabolic syndrome (MetS) and the International Obesity Task Force classification into subjects with a normal body mass index, overweight and obesity.

Groups	Normal BMI ^A	Overweigh ^B	Obesity ^C
No MetS	55 ^{B,C}	28	11
MetS	7	16 ^{A,C}	24 ^{A,B}

For each significant pair, the key of the category with the smaller column proportion appears under the category with the larger column proportion.

Table 5. Clinical, socio-demographic, biochemical, inflammatory and oxidative and nitrosative stress data of subjects divided according to the International Obesity task Force classification into subjects with a normal body mass index, overweight and obesity.

Variables	Normal BMI (n=62) ^A	Overweight (n=44) ^B	Obesity (n=35) ^C	F	DF	p
Age years	13.4 (±1.6)	12.7 (±1.5)	12.8 (±1.5)	3.21	2/138	0.043
Gender M/F	37 / 25	27 / 17	16 / 19	2.33	2	0.311
TUD no / yes	55 / 7	42 / 2	33 / 2	-	-	-
Body weight kg	51.0 (±11.5) ^{B,C}	59.3 (±8.9) ^{A,C}	74.2 (±15.1) ^{A,B}	43.33	2/138	<0.001
BMI kg/m ²	19.7 (±2.2) ^{B,C}	24.1 (±1.4) ^{A,C}	30.1 (±2.8) ^{A,B}	254.95	2/138	<0.001
WC cm	67.6 (±5.3) ^{B,C}	76.5 (±5.1) ^{A,C}	87.0 (±7.7) ^{A,B}	120.10	2/138	<0.001
SBPmm Hg	113.7 (±11.7) ^C	115.8 (±11.3) ^C	122.2 (±12.1) ^{A,B}	5.95	2/138	0.003
DBPmm Hg	64.9 (±7.8) ^C	66.0 (±7.5) ^C	70.1 (±6.4) ^{A,B}	5.59	2/138	0.005
Glucose mg/dl	90.5 (±6.1)	92.2 (±6.4)	90.8 (±6.4)	0.41#	2/134	0.663
Insulin* μU/ml	7.3 (±6.7) ^{B,C}	9.6 (±5.1) ^A	13.6 (±9.4) ^A	11.79#	2/125	<0.001
Total –Cholesterol mg/dl	159.3 (±29.0)	161.0 (±27.0)	174.8 (±36.9)	3.13#	2/134	0.057
HDL-C mg/dl	50.1 (±12.7) ^{B,C}	41.6 (±9.4) ^A	36.9 (±8.3) ^A	19.42#	2/134	<0.001
LDL-C mg/dl	96.3 (±26.9) ^C	98.7 (±25.9) ^C	115.6 (±35.0) ^{A,B}	5.35#	2/134	0.008
Triglycerides*mg/dl	64.2 (±30.5) ^{B,C}	103.5 (±114.2) ^A	119.9 (±61.7) ^A	12.26#	2/134	<0.001
NOx*μM/L	4.2 (±1.5)	4.2 (±1.9)	4.8 (±2.1)	2.11#	2/134	0.125
FOX mM/L	0.74 (±0.23)	0.79 (±0.21)	0.74 (±0.20)	1.16#	2/134	0.317
TRAP uM Trolox	867.1 (±124.5) ^C	852.1 (±113.3) ^C	930.3(±120.9) ^{A,B}	7.36#	2/134	0.001
Uric acid mg/dl	4.5 (±1.1) ^{B,C}	5.0 (±1.2) ^A	5.5 (±1.3) ^A	16.63#	2/117	<0.001
TRAP/Uric acid	199.6(±41.3) ^{B,C}	177.9 (±34.5) ^A	173.0 (±34.0) ^A	9.69#	2/117	<0.001
TNFα* pg/ml	17.37 (±27.97)	14.09 (±30.47)	52.39 (±117.00)	0.51#	2/134	0.601
PON-1 U/MI	204.37 (±52.38)	204.47 (±46.27)	224.44 (±37.54)	0.78#	2/134	0.461
SH uM/mgPT	42.43 (±6.72)	44.86 (±5.47)	38.02 (±6.86)	0.61#	2/132	0.544
MDA uM/mg PT	102.35 (±20.68)	106.73 (±19.55)	96.70 (±10.03)	2.18#	2/132	0.117

All results are shown as means (±SD). All results of ANOVAs, except #: results of ANCOVAs with gender as second factor and age as covariate.*These variables are processed in Ln transformation. A, B and C in a row indicate that the mean values are statistically significant different at p<0.05 (Tukey's test) from the means of the categories labelled as A, B or C. BMI: body mass index; WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HDL-C: high-density lipoprotein; LDL-C: low-density lipoprotein; NOx: nitric oxide metabolites; FOX-LOOH: lipid hydroperoxides; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; TNFα: Tumor necrosis factor alpha; PON 1: Paraoxonase 1 activity; SH: thiol group; MDA: malondialdehyde.

Table 6. Results of factor analysis performed on the inflammatory, oxidative and nitrosative stress biomarkers, the metabolic syndrome (MetS) and the International Obesity Task Force classification into those with a normal BMI, overweight and obesity.

Variables	PC1	PC2
MetS	0.719^A	0.430^A
IOTF classification	0.730^B	0.243
NOx	0.564^C	-0.246
FOX	-0.173	0.390
TRAP	0.325	-0.697^C
PON1	0.053	-0.007
SH	0.085	0.426^D
MDA	0.123	0.617^E
LnTNF	-0.246	0.091
Explained variance	17.7%	16.8%

Shown are loadings on the varimax-rotated component analysis.

Significant loadings (>0.35) are shown in bold. PC1- Letter C is associated with the A and B.

PC2- Letters C, D and E is more associated with A than with B.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que adolescentes com SM têm um desequilíbrio redox, caracterizado pelo aumento da oxidação lipídica no plasma e aumento na formação de grupamentos SH.

Enquanto a obesidade é caracterizada pelo aumento dos níveis de ácido úrico. Aumento de NOx e diminuição dos níveis de TRAP estão associados à obesidade e SM. Isso indica que tanto SM como obesidade têm um perfil oxidativo e nitrosativo diferente. Portanto, pode-se sugerir que nos adolescentes com SM o aumento de biomarcadores de estresse oxidativo (em particular MDA), ácido úrico, dislipidemia e resistência à insulina são fenômenos inter-relacionados que desempenham um papel no desenvolvimento, manutenção e comorbidades da SM.

REFERÊNCIAS

- ABDILLA, N. et al. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 68–75, jan. 2007.
- ACHARYA, J. et al. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **European Journal of Haematology**, v. 47, n. 4, p. 287–291, 1991.
- ALVAREZ, M. M. et al. Prevalence of metabolic syndrome and of its specific components among adolescents from Niterói City, Rio de Janeiro State, Brazil. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 55, n. 2, p. 167–170, 2011.
- BARBIOR, B. M. NADPH Oxidase: An Update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464–1476, 1999.
- BARKER, D. J. P. Fetal and infant origins of adult disease. **Monatsschrift fur Kinderheilkunde**, 2001.
- BARZI, F. et al. Mediterranean diet and all-causes mortality after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 604–11, abr. 2003.
- BASTOS, A. S. et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Analytical Biochemistry**, v. 423, n. 1, p. 141–146, 1 abr. 2012.
- BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 1999.
- BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Glycooxidation and Lipoxidation in Atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 12, p. 1708–1716, 2000.
- BELLÓ, A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelo Radicais Livres. In: N. P. MARRONI ET AL. (Ed.). **Estresse Oxidativo e Antioxidante**. Porto Alegre: Editora Ulbra, 2002. p. 15–19.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813–820, 2001.
- BUCKLAND, G. et al. Adherence to the Mediterranean diet reduces mortality in the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). **The British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 10, p. 1581–1591, nov. 2011.
- BUTTE, N. F.; NGUYEN, T. T. Is obesity an emerging problem in Brazilian children and adolescents? **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 2, p. 91–92, 31 mar. 2010.
- CAMPOS, L. E A.; LEITE, Á. J. M.; ALMEIDA, P. C. DE. Prevalência de sobrepeso e obesidade em adolescentes escolares do município de Prevalence of overweight

and obesity among adolescent students in the city of. **Revista Brasileira Saúde Matern. Infant**, v. 7, n. 2, p. 183–190, 2007.

CARDONA, F. et al. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 38, n. 7, p. 51051–5, jul. 2008.

CERIELLO, A. et al. Evidence for an Independent and Cumulative Effect of Postprandial Hypertriglyceridemia and Hyperglycemia on Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress Generation: Effects of Short- and Long-Term Simvastatin Treatment. **Circulation**, v. 106, n. 10, p. 1211–1218, 19 ago. 2002.

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 5, p. 816–823, maio 2004.

CHANG-HUI, L.; YEN-JU, H.; YIN-CHOU, L. Celecoxib simulates respiratory burst through pertussis toxin-sensitive G-protein, a possible signal for β 2-integrin expression on human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 484, n. 1, p. 29–39, jan. 2004.

CHEN, F. et al. Association between childhood obesity and metabolic syndrome: evidence from a large sample of Chinese children and adolescents. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e47380, jan. 2012.

CHRISTOFARO, D. G. D. et al. Evaluation of the Omron MX3 Plus monitor for blood pressure measurement in adolescents. **European Journal of Pediatrics**, v. 168, n. 11, p. 1349–1354, nov. 2009.

CINTRA, I. D. P. et al. Evolution of body mass index in two historical series of adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. 157–162, 2007.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.

COLE, T. J. et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide : international survey. **BMJ**, v. 320, p. 1–6, 2000.

COOK, S. et al. Metabolic syndrome rates in United States adolescents, from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. **The Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 2, p. 165–170, fev. 2008.

COSTA, R. F. et al. Metabolic syndrome in obese adolescents: a comparison of three different diagnostic criteria. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 4, p. 303–309, jul. 2012.

DAMIANI, D. et al. Síndrome metabólica em crianças e adolescentes: dúvidas na terminologia, mas não nos riscos cardiometabólicos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 8, p. 576–582, 2011.

DANDONA, P. et al. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. **Circulation**, v. 111, n. 11, p. 1448–1454, 22 mar. 2005.

DE MORAES, A. C. F. et al. Prevalence of abdominal obesity in adolescents: a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 2, p. 69–77, mar. 2011.

DEDON, P. C.; TANNENBAUM, S. R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, n. 1, p. 12–22, mar. 2004.

DUTHIE, G.; CROZIER, A. Plant-derived phenolic antioxidants. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 3, n. 6, p. 447–451, nov. 2000.

ECKEL, R. H. et al. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, n. 1, p. 1415–1428, 16 jan. 2005.

Executive Summary of the Third Report (NCEP) Expert Panel on Detection , Evaluation , and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v. 285, n. 19, p. 2486–2497, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, C. E. R.; FRANÇA, N. M. Metabolic syndrome and risk factors for cardiovascular disease in obese children: the relationship with insulin resistance (HOMA-IR). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 1, p. 21–26, 1 fev. 2007.

FILHO, F. F. R.; MARIOSIA, L. S.; FERREIRA, S. R. G. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 230–238, 2006.

FLOREZ, H. et al. C-reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 71, n. 1, p. 92–100, jan. 2006.

FONSECA, F. L. et al. Overweight and Cardiovascular Risk among Young Adults Followed- up for 17 Years : The Rio de Janeiro Study , Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 2, p. 193–201, 2010.

FRÖHLICH, M. et al. Association Between C-Reactive Protein and Features of the Metabolic Syndrome. **Diabetes Care**, v. 23, n. 12, p. 1835–1839, 2000.

FULAZ, C. S.; NETTO-OLIVEIRA, E. R. Prevalência de síndrome metabólica em adolescentes : uma revisão sistemática Prevalence of metabolic. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 6, p. 1195–1202, 2009.

GARNETT, S. P.; BAUR, L. A.; COWELL, C. T. The prevalence of increased central adiposity in Australian school children 1985 to 2007. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 11, p. 887–896, nov. 2011.

GORDON, C. C.; CHUMLEA, W. C.; ROCHE, A. F. Stature, recumbent length, and weigh. In: ROCHE, A.; MARTORELL, R. (Eds.). **Lohman T.G Roche, AF Martorell, R. Lohman TG ed.** Champaign: Human Kinetics Books, 1988. p. 3–8.

GRATTAGLIANO, I. et al. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 491–504, ago. 2008.

GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G.; CEBALLOS-REYES, G.; RAMÍREZ-SÁNCHEZ, I. Obesity and metabolic syndrome: Future therapeutics based on novel molecular pathways. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 24, n. 4, p. 204–211, jul. 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Biosciences Oxford, 2007. v. 246, p. 851.

HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1671–1676, 2000.

HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 380–385, 1994.

HUTCHESON, R.; ROCIC, P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1–13, jan. 2012.

ISHII, H.; KOYA, D.; KING, G. L. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. **J Mol Med**, v. 76, p. 21–31, 1998.

JAQUET, D. et al. Intrauterine Growth Retardation Predisposes to Insulin Resistance But Not to Hyperandrogenism in Young Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 11, p. 3945–3949, 1999.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1 maio 1992.

KALIORA, A. C.; DEDOISSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 1, p. 1–17, jul. 2006.

KATZMARZYK, P. T. et al. Body mass index, waist circumference, and clustering of cardiovascular disease risk Factors in a Biracial Sample of Children and Adolescents. **Pediatrics**, v. 114, n. 2, p. 198–205, 2004.

KOUGIAS, P. et al. Effects of Adipocyte-Derived Cytokines on Endothelial Functions : Implication of Vascular Disease. **Journal of Surgical Research**, v. 126, n. 1, p. 121–129, 2005.

LAURENTI, R.; BUCHALLA, C. M.; PAULO, S. Os Mitos a Respeito das Doenças Cardiovasculares. **Arq Bras Cardiol.**, v. 76, n. 2, p. 99–104, 2001.

LEE, K. Oxidative stress markers in Korean subjects with insulin resistance syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 54, n. Suppl. 2, p. S29–33, 2001.

LITHELL, H. et al. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. **BMJ**, v. 312, p. 406–410, 1996.

LIU, W. et al. Prevalence and association between obesity and metabolic syndrome among Chinese elementary school children: a school-based survey. **BMC Public Health**, v. 10, n. 1, p. 780, jan. 2010.

LLOYD, L. J.; LANGLEY-EVANS, S. C.; MCMULLEN, S. Childhood obesity and risk of the adult metabolic syndrome: a systematic review. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 1, p. 1–11, jan. 2012.

MALIK, M.; BAKIR, A. Prevalence of overweight and obesity among children in the United Arab Emirates. **Obesity**, v. 8, n. 1, p. 15–20, 2006.

MARCOVECCHIO, M. L.; CHIARELLI, F. Metabolic syndrome in youth: chimera or useful concept? **Current Diabetes Reports**, v. 13, n. 1, p. 56–62, mar. 2013.

MATHUR, S.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Accelerated atherosclerosis, dyslipidemia, and oxidative stress in end-stage renal disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 11, n. 2, p. 141–147, mar. 2002.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. e330–341, set. 2013.

MENON, V. et al. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. **Diabetic Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1346–1352, dez. 2004.

MINDELL, J. S. et al. Changes in waist circumference among adolescents in England from 1977-1987 to 2005-2007. **Public Health**, v. 126, n. 8, p. 695–701, ago. 2012.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S193–201, jan. 2006.

MONNIER, V. M. Transition metals redox: reviving an old plot for diabetic vascular disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 7, p. 799–801, abr. 2001.

NAPPO, F. et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 7, p. 1145–1150, 3 abr. 2002.

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood pressure in Children and adolescents. **Pediatrics**, v. 114, p. 555–576, 2004.

NAVARRO-GONZÁLVIZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–81, mar. 1998.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 787–790, 13 abr. 2000.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of Overweight and Obesity in the United States , 1999-2004. **JAMA**, v. 295, n. 13, p. 1999–2004, 2006.

OHMORI, K. et al. The relationship between body mass index and a plasma lipid peroxidation biomarker in an older, healthy Asian community. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 1, p. 80–84, jan. 2005.

OLIVEIRA, C. L. et al. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Rev. Nutr**, v. 17, n. 2, p. 237–245, 2004.

OLIVEIRA, R. M. S. et al. Influence of Prior Nutritional Status on the Development of the Metabolic Syndrome in Adults. **Arq Bras Cardiol**, v. 92, n. 2, p. 101–106, 2009.

PARK, J. et al. Prevalence of metabolic syndrome and obesity in adolescents aged 12 to 19 years: comparison between the United States and Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 1, p. 75–82, jan. 2010.

PENNATHUR, S.; HEINECKE, J. W. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 955–969, jul. 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, F. et al. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 10, p. 1199–1208, out. 2007.

PLANTINGA, Y. et al. Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. **American Journal of Hypertension**, v. 20, n. 4, p. 392–397, abr. 2007.

QUINN, M. T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 760–781, 2004.

RAMAKRISHNA, V.; JAILKHANI, R. Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. **Diagnostic Pathology**, v. 2, p. 1596–1602, jan. 2007.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595–1607, dez. 1988.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–117, nov. 1996.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circulation. Cardiovascular Genetics**, v. 1, n. 2, p. 147–152, dez. 2008.

RIZZO, M. et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Translational Research**, v. 153, n. 5, p. 217–223, maio 2009.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, n. 21-22, p. 705–712, maio 2009.

SANTOS, A.C. et al. Central obesity as a major determinant of increased high-sensitivity C-reactive protein in metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 12, p. 1452–1456, dez. 2005.

SCHNEIDER, D. International trends in adolescent nutrition. **Social Science & Medicine**, v. 51, n. 6, p. 955–967, set. 2000.

SHARMA, K.; ZIYADEH, F. N. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 17, n. 2, p. 80–92, 1997.

SIES, H. et al. Cellular redox changes and response to drugs and toxic agents. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 3, n. 4, p. 200–208, 1983.

SILVA, D. A. S. et al. Epidemiology of abdominal obesity among adolescents from a Brazilian State Capital. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 1, p. 78–84, jan. 2011.

SILVEIRA, L. S. et al. Metabolic Syndrome : Criteria for Diagnosing in Children and Adolescents. **Endocrinology & Metabolic Syndrome**, v. 2, n. 3, p. 1–6, 2013.

STERN, D. M. et al. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 1, p. 1–15, fev. 2002.

STRONG, J. P. et al. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults. **JAMA**, v. 281, n. 8, p. 727–735, 1999.

SUGAMURA, K.; KEANEY JR, J. F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 5, p. 978–992, 2011.

TADDEI, S. et al. Vitamin C Improves Endothelium-Dependent Vasodilation by Restoring Nitric Oxide Activity in Essential Hypertension. **Circulation**, v. 97, n. 22, p. 2222–2229, jun. 1998.

TIWARI, B. K. et al. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **Journal of Biomarkers**, p. 1–8, 2013.

URAKAWA, H. et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 10, p. 4673–4676, out. 2003.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. et al. Prevalence of metabolic syndrome in a rural area of Brazil. **São Paulo Med J.**, v. 125, n. 3, p. 155–162, maio 2007.

VISSER, M. et al. Elevated C-Reactive Protein Levels in Overweight and Obese Adults. **JAMA**, v. 282, n. 22, p. 2131–2135, 1999.

VOILS, S. A; COOPER-DEHOFF, R. M. Association between high sensitivity C-reactive protein and metabolic syndrome in subjects completing the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2009-10. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 8, n. 2, p. 88–90, 2014.

WADDELL, T. K. et al. Potentiation of the Oxidative Burst of Human Neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 28, p. 18485–18491, 1994.

WANG, Y.; LOBSTEIN, T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. **International Journal of Pediatric Obesity**, v. 1, n. 1, p. 11–25, jan. 2006.

WANG, Y.; MONTEIRO, C.; POPKIN, B. M. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. **Am J Clin Nutri**, v. 75, p. 971–977, 2002.

WILHELM, J. et al. Erythrocyte membranes inhibit respiratory burst and protein nitration during phagocytosis by macrophages. **Physiological Research**, v. 54, n. 5, p. 533–539, jan. 2005.

YOKOZAWA, T. et al. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 5068–5073, out. 2000.

ZIMMET, P. et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. **Pediatric Diabetes**, v. 8, n. 5, p. 299–306, out. 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 268

Parecer de Aprovação nº 238/2010 CAAE nº 0220.0.268.000-10 Folha de Rosto nº 374031 Processo nº 29216/2010	Londrina, 21 de março de 2011.
PESQUISADOR(A): Edilson Serpeloni Cyrino CEFE – Departamento de Educação Física	
Prezado(a) Senhor(a): O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina” (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto: <p align="center">“Prevalência de Síndrome Metabólica e Fatores de Risco Cardiovascular em Adolescente de Londrina/PR”</p>	
Situação do Projeto: APROVADO Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center">Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	

APÊNDICE 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**Título da pesquisa:****“PREVALÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA E FATORES DE RISCO
CARDIOVASCULAR EM ADOLESCENTES DE LONDRINA/PR”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar da pesquisa **“Prevalência de síndrome metabólica e fatores de risco em adolescentes de Londrina/PR”**, a ser realizada no município de Londrina/PR. Os objetivos desta pesquisa são identificar a presença de alguns problemas de saúde como a obesidade, pressão alta, colesterol e glicemia elevados, em adolescentes de 11 a 17 anos, bem como, identificar alguns fatores de risco para esses problemas de saúde.

Todas as avaliações serão realizadas no ambiente escolar com a permissão/supervisão da direção. Além disso, após conversa com a direção da escola, asseguramos que os jovens participantes não serão prejudicados no que se refere à frequência nas aulas.

A assinatura deste termo permitirá que o jovem sob sua responsabilidade participe das seguintes atividades: (1) Preenchimento de questionários sobre prática de atividades físicas, hábitos alimentares, fumo e nível socioeconômico; (2) Medidas de peso, altura, altura sentado, circunferência de cintura, pressão arterial e frequência cardíaca em repouso; (3) Avaliação da quantidade de gordura corporal pelo método de espessuras de dobras cutâneas; (4) Coleta de sangue em jejum de 12 h feita por um técnico capacitado, vinculado ao **Hospital Universitário de Londrina (HU)** para estudo do metabolismo (as coletas serão na escola). As dosagens serão realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário e o sangue coletado e não utilizado será descartado pelo hospital; (5) Um teste de corrida na quadra da escola. Tudo será supervisionado por professores universitários da Universidade Estadual de Londrina participantes do estudo.

Gostaríamos de esclarecer que a participação é **totalmente voluntária**. O participante pode **recusar-se a participar/desistir a qualquer momento sem sofrer prejuízo algum**. As informações serão utilizadas somente para fins de pesquisa e todos os documentos e amostras utilizados serão identificados por um

código numérico sem identificação nominal para preservar a identidade do participante. Lembramos que **não será cobrada nenhuma taxa por estas avaliações**. Da mesma forma, não será paga quantia alguma aos participantes.

Ao final do estudo, comprometemo-nos a retornar com os resultados de todas as avaliações, que serão entregues aos participantes e responsáveis. Os benefícios esperados são a **detecção precoce de fatores de risco como obesidade, padrões inadequados de alimentação, pressão arterial elevada, alterações no perfil lipídico, predisposição ao diabetes, dentre outros**. Apesar de considerados mínimos, os possíveis riscos são: desconfortos na coleta sanguínea e cansaço durante o teste físico.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode entrar em contato com o Laboratório de Metabolismo, Nutrição e Exercício, localizado no Centro de Educação Física e Esporte, da Universidade Estadual de Londrina, pelo telefone (43) 3371-4772 / 9139-4509.

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura do aluno: _____

_____ (nome por extenso do pai, mãe ou responsável pelo sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura _____ dos _____ pais _____ e/ou responsável: _____

Data: _____

APÊNDICE3: Carta de autorização do Núcleo Regional de Educação de Londrina.**A U T O R I Z A Ç Ã O**

Após análise pela Equipe de Ensino deste Núcleo Regional de Educação do projeto de pesquisa "Prevalência de Síndrome Metabólica e Fatores de Risco Cardiovascular em Adolescentes de 11 a 17 anos de Londrina - PR" e considerando:

- que o estudo envolverá aproximadamente 900 adolescentes devidamente matriculados nas escolas públicas da zona urbana da cidade, que serão submetidos a avaliações antropométricas, de composição corporal, aptidão cardiorrespiratória, pressão arterial de repouso, nível habitual de atividade física e informações sobre o uso de tabaco e hábitos alimentares, maturação biológica, valores glicêmicos de jejum, perfil lipídico e das lipoproteínas plasmáticas;

- que há compromisso de que as avaliações somente serão realizadas mediante a apresentação de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelo avaliado e por seu responsável, onde constará os objetivos do trabalho, avaliações envolvidas, vantagens da participação, bem como os direitos e deveres do participante,

vimos autorizar que o projeto seja apresentado às Escolas da Rede Estadual de Ensino de Londrina, as quais deverão apreciá-lo à luz de seu Projeto Político-Pedagógico e dos interesses da sua Comunidade Escolar.

Londrina, 03 de março de 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Luzia Maria de Jesus Alves'.

Luzia Maria de Jesus Alves
Assistente - NRE Londrina

APÊNDICE 4: Carta de apresentação do Núcleo Regional de Educação de Londrina às escolas participantes do projeto.



Of. CHEFIA/NRE n.º36/2011



Londrina, 03 de março de 2011.

Senhora Diretora
Senhor Diretor

Informamos que é de nosso conhecimento o Trabalho proposto pelos profissionais da área de Educação Física da UEL, intitulado: **PREVALÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM ESCOLARES DE 11 A 17 ANOS DE LONDRINA - PR**".

Considerando que a pesquisa prevê a aplicação de estratégias e instrumentos bem específicos, dentre os quais, a coleta de amostra sanguínea, se houver interesse desse Estabelecimento de Ensino na participação, acreditamos ser imprescindível a anuência das famílias.

Neste sentido, ao tempo em que ratificamos a importância do estudo (inclusive com retorno de informações preciosas para os alunos/família sobre as condições de saúde dos avaliados) - recomendamos que o trabalho seja acompanhado, na medida do possível, também pelo professor de Educação Física e Coordenação Pedagógica.

Para quaisquer outras informações, mantemo-nos à disposição.

Atenciosamente

Luzia Maria de Jesus Alves
Assistente do NRE - Londrina

ANEXOS

ANEXO I - Capacidade antioxidante total do plasmática (TRAP)

Reagentes

1. ABAP 200mM (Sigma-Aldrich[®], EUA)
Preparo no dia de uso
Pesar 216,96mg de ABAP e dissolver em 4mL H₂O destilada
Agitar no vórtex
Proteger com papel alumínio
2. Luminol (Sigma-Aldrich[®], EUA)
Pesar 3,98mg de Luminol e dissolver em 10mL H₂O destilada
Agitar em vórtex
Forma corpo de fundo
Proteger com papel alumínio
Conservar em geladeira
3. Luminol - Solução de trabalho
Preparar no dia do uso
A partir da Solução Mãe, agitar o tubo e pipetar 400µL LUMINOL – SOL. MÃE e diluir com 3600µL de H₂O destilada
Proteger com alumínio
Agitar em vórtex
4. TROLOX - Solução mãe (20µM) (Sigma-Aldrich[®], EUA)
Pesar 5mg e dissolver em 10mL Tampão Glicina pH=8,6
Proteger com papel alumínio
Agitar em vórtex
Conservar em geladeira
5. TROLOX - Solução de trabalho
Preparo no dia de uso
Agitar e pipetar 8µL TROLOX SOL. MÃE e diluir com 1592µL de Tampão Glicina pH = 8,6

Agitar em vórtex

6. Tampão glicina (Synth[®], Brasil)

Pesar 3,75g de glicina dissolver com + 400mL H₂O destilada em bquer de vidro

Acertar pH em 8,6 com KOH 1M

Transferir o tampão para balão volumétrico de 500mL e completar o volume

Transferir o tampão para frasco de vidro identificado e conservar em geladeira.

Procedimento

- ✓ Antes de iniciar as reações com soro, fazer as curvas ABAP e com TROLOX

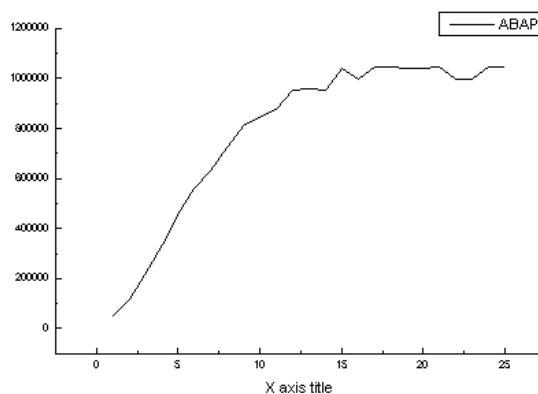
Curva ABAP

Tampão Glicina _____ 171µL

Luminol _____ 9,5µL

ABAP _____ 9,5µL

Homogeneizar bem.



Curva Trolox (fazer pelo menos em triplicata)

Tampão Glicina _____ 171µL

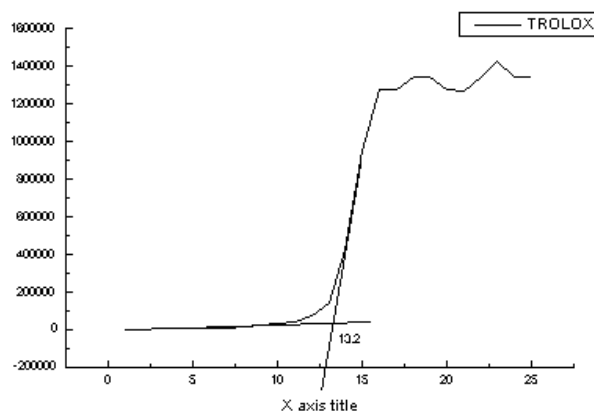
Luminol _____ 9,5µL

Trolox _____ 9,5µL

ABAP _____ 9,5µL

Tempo da curva Trolox entre 12 e 14 min

Homogeneizar bem.



Reação com Soro (fazer em triplicata)

Tampão Glicina _____ 171µL

Luminol _____ 9,5µL

Soro diluído 1 :20 com H₂O__ 5uL

ABAP _____ 9,5µL

Homogeneizar bem.

Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca Victor X-3, Perkin Elmer®, (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de 30 °C. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm). O cálculo do valor de TRAP foi realizado seguindo a equação:

$$\text{TRAP}(\mu\text{M Trolox}) = D_4 \times \tau_{\text{amostra}} / \tau_{\text{Trolox}}$$

Onde D_4 é o fator de diluição da amostra (780), τ_{amostra} , é o tempo de indução da amostra e τ_{Trolox} , é o tempo de indução provocada pela adição de 1µM Trolox. Os resultados foram expressos em µM Trolox.

ANEXO II - Determinação de hidroperóxidos por espectrofotometria (FOX-LOOH)

Reagentes

1. H₂SO₄ 250mM (Merck[®], Germany)

Em um balão de 10mL colocar um pouco de água (em torno de 2mL). Adicionar 245µL de H₂SO₄ e completar o resto do balão com de água.

2. Padrão: 1,1,3,3 tetraethoxypropane (TEP) 4mM (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Em um balão de 50mL colocar um pouco de água (em torno de 20mL). Adicionar 48µL de TEP e completar o resto do balão com de água.

3. Reagente de FOX

Em um frasco que comporte 100mL adicionar os reagentes na seguinte ordem: primeiro colocaremos 90mL metanol (Vetec[®], Brasil) puro e adicionaremos em seguida 10mL de H₂SO₄ 250mM (preparado conforme item acima). Após esta fase colocaremos o 88mg BHT (Vetec[®], Brasil) seguido de 7,6mg de xylenol orange (Acros[®], Bélgica). Para terminar o reagente adicionamos 9,8mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado (Synth[®], Brasil). O reagente deve ser armazenado em geladeira e ao abrigo da luz. O reagente só pode ser utilizado por até 2 dias.

Curva de calibração

REAGENTES	BRANCO	P1	P2	P3	P4	P5
Concentração (mM)	-	4,0	2,0	1,0	0,500	0,250
H ₂ O deionizada (µL)	-	-	100	100	100	100
Padrão TEP (µL)	-	-	100	100	100	100
Reagente de FOX (µL)	900	900	900	900	900	900

Procedimento - amostra

REAGENTES	BRANCO	AMOSTRA
Amostra (μL) (triplicata)	-	100
Reagente de FOX (μL)	900	900

A reação da curva foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos e a reação da amostra também foi incubada durante esse mesmo período e depois centrifugada durante 10 minutos a 3000rpm e em seguida feita a leitura em espectrofotômetro Helios α , Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, EUA), em comprimento de onda de 560 nm. A concentração de FOX foi expressa em mM.

Cálculo do fator:

Fator= $\frac{\text{concentração do padrão}}{\text{leitura do espectrofotômetro}}$

Obs.: Fator +/- 6 (para a validação)

Cálculo da concentração da amostra:

Concentração= fator x leitura da amostra

ANEXOIII - Determinação de malondialdeído (MDA)

Reagentes

Para todas as soluções usar água Milli-Q.

1. BHT 0,2%(Vetec[®], Brasil)

Pesar 0,1g de BHT e diluir em 50mL de etanol (Synth[®], Brasil). Armazenar em um tubo falcon a temperatura ambiente

2. TCA 7,2% (Synth[®], Brasil) + KI 1% (sol. Água) (Merck[®], Germany)

Pesar 1g de KI e 7,2g de TCA e diluir em 100mL de água. Armazenar ao abrigo da luz e na geladeira.

3. TBA 0,6% (sol. Água) (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Pesar 0,6g de TBA e diluir em 100mL de água. Esquentar para dissolução!!! 60°C + peixinho no agitador.

4. NaOH 10N (Nuclear[®], Brasil)

Pesar 1,2g de NaOH e diluir em 3mL de Água MiliQ - validade de 1 semana. Armazenar na geladeira.

5. H₂SO₄ 1% (Merck[®], Germany)

2ml Ác. Conc. + 198mL de ÁguaMiliQ

6. Tampão fosfato (Fase móvel)

Pesar 5,3g de KH₂PO₄ (Nuclear[®], Brasil) e 10,62 de K₂HPO₄ (Êxodo científica[®], Brasil), dissolver em 2L de Água Milli-Q.

Acertar o pH = 7,0.

Filtrar o tampão.

Colocar no ultrassom por 10 min. Armazenar em geladeira.

7. Preparo da Fase Móvel

Tampão fosfato 50nM pH 7,0 (65%) + metanol grau HPLC (35%) (Panreac[®], Espanha)

Preparo da Curva de Calibração

Solução padrão de MDA (Acros[®], Bélgica)

Diluir 22 μ L de MDA em 10mL de H₂SO₄ 1% em um balão de 10 mL.

Deixar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas.

Após, armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

Solução de MDA diluída (300x)

Em um eppendorf, diluir 5 μ L da solução diluída de MDA em 1495 μ L de H₂SO₄ 1%.

Armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

Leitura da solução diluída em espectrofotômetro

Fazer a leitura da solução diluída em 245 nm com cubeta de quartzo. Usar H₂SO₄ 1% como branco.

A D.O. da solução deve estar entre 0,6-0,7

(Variação aceitável de um dia para outro \rightarrow 15%)

Utilizar a D.O. obtida para calcular a concentração real de MDA na solução:

$$C = A / \xi \quad (\text{sendo } C = [\text{MDA}], A = \text{absorbância e } \xi = 13700)$$

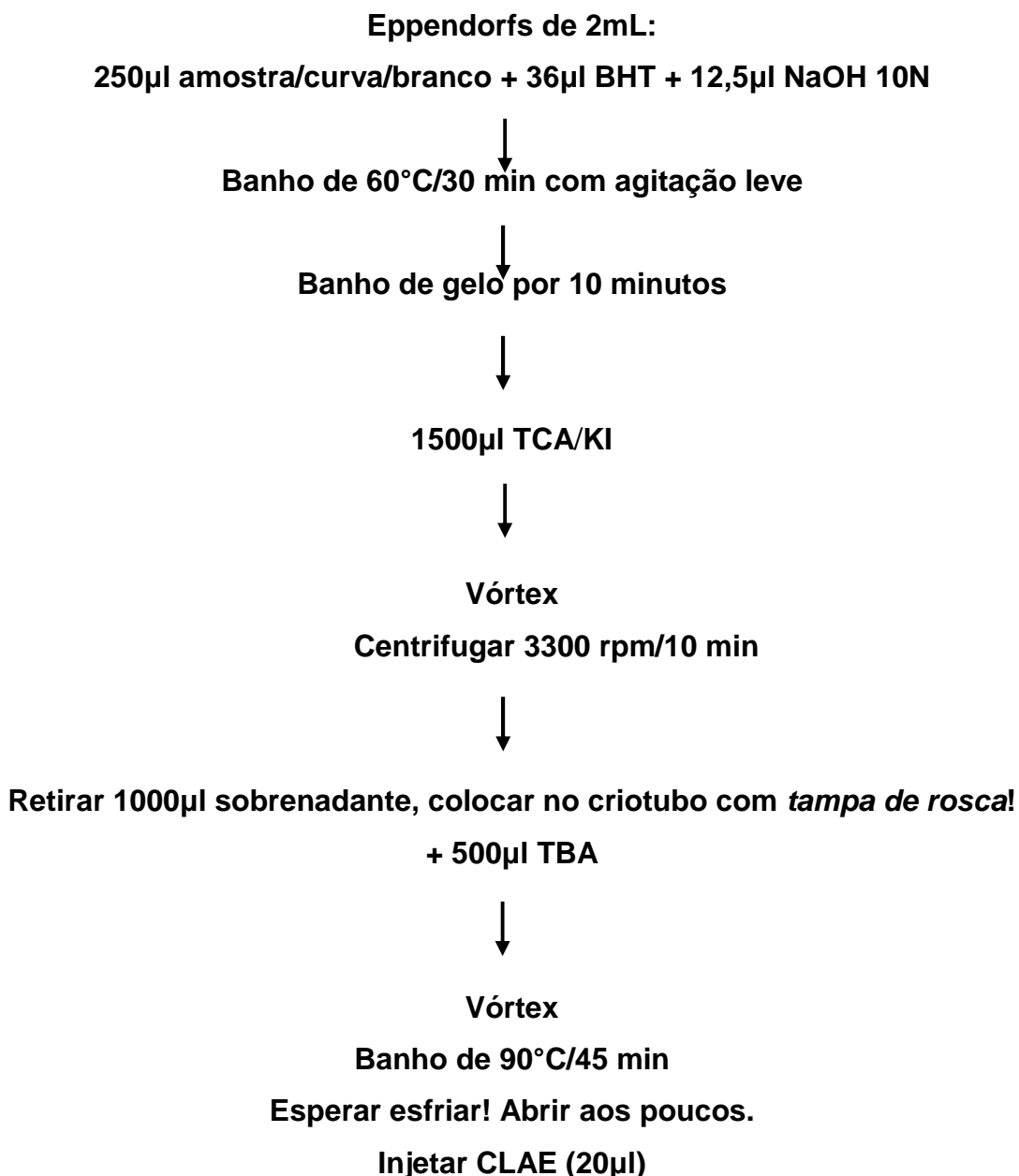
Obtida a concentração real da solução diluída de MDA, calcular as diluições necessárias para obter as concentrações de 0,05; 0,25; 0,50; 1,00; 1,5; 2,00. Manter o volume final de 250 μ L.

Os pontos da curva de calibração devem ser preparados a partir da solução diluída de MDA e devem ser diluídos em um pool de plasma de 6 indivíduos saudáveis. Fazer um branco contendo 250 μ L de pool de plasma. Seguir os passos para o preparo de amostras também para a curva de calibração e para o branco.

Preparo das Amostras/Curva de Calibração

Para não ocorrer interferência devido à presença de fibrina, é preciso centrifugar as amostras antes de qualquer etapa! (10000 rpm/5 min).

As amostras podem ser preparadas no dia anterior à injeção no CLAE (armazenar em geladeira).



Para a realização das análises do aduto TBA-MDA-TBA é utilizado um sistema de CLAE Alliance e2695, Waters® (Barueri, SP, Brasil) com uma coluna Eclipse XDB-C18 4,6mm x 250mm 5µm, Agilent® (Santa Clara, CA, EUA) e uma fase móvel

composta por 65% tampão fosfato (50nM pH 7,0) e 35% metanol grau HPLC, com a taxa de fluxo de 1,0 mL de fase móvel por minuto, mantendo a coluna em uma temperatura constante de 30°C. A leitura é realizada com um comprimento de onda fixado em 532 nm.

Para análise dos dados é utilizada a curva de calibração preparada com a solução de MDA em suas diferentes concentrações traçando medidas de área de pico a 532 nm contra a concentração. A concentração de MDA nas amostras é quantificado com base na curva de calibração e expressas em μmol de MDA/mg de proteínas.

ANEXO IV - Determinação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx)

Reagentes

1. Sulfato de Zinco 75mmol/L (CAAL[®], Brasil)

2,156g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 2,156g de Sulfato de Zinco, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

2. Hidróxido de Sódio 55mmol/L (Nuclear[®], Brasil)

220mg _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 220mg de Hidróxido de Sódio, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

3. Tampão Glicina (45g/L, pH 9,7) (Synth[®], Brasil)

4,5g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 4,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

4. Tampão Glicina (15g/L, pH 9,7) (Synth[®], Brasil)

1,5g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 1,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL. Acertar o pH em 9,7 utilizando hidróxido de sódio.

Armazenar em geladeira.

5. Sulfato de cobre 5mmol/L (Synth[®], Brasil) em Tampão Glicina (15g/L, pH 9,7)

62,42mg _____ 50mL de tampão Glicina-NaOH

Pesar 62,42mg de Sulfato de cobre, adicionar em balão volumétrico de 50mL, dissolver com um pouco de tampão glicina 15g/L e completar o volume para 50mL. Preparado no dia de uso.

6. Ácido Sulfúrico 100mmol/L (Merck[®], Germany)

1,4mL H₂SO₄ _____ 250mL H₂O destilada

Adicionar um pouco de água destilada em um balão volumétrico de 250mL, pipetar 1,4mL de Ácido sulfúrico e completar o volume para 250mL.

Preparar o reagente em capela.

Armazenar em temperatura ambiente.

7. Sol. Estoque Padrão NaNO₂ 100mM (Synth[®], Brasil)

69,00mg _____ 10mL H₂O destilada

Pesar 69mg de NaNO₂ e adicionar em um tubo de vidro. Adicionar 10 mL de água destilada. Tampar tudo com parafilm e verter para dissolver.

Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

8. Reagente 1 – Sulfanilamida (Acros[®], Bélgica)

2,0g Sulfanilamida _____ 100mL de Ácido Fosfórico 5%

Pesar 2g de Sulfanilamida, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de ácido fosfórico 5% e completar o volume para 100mL. Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

9. Reagente 2-N-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NEDD)

(Sigma Aldrich[®], EUA)

200mg NEDD _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 200mg de NEDD, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

Desproteção

Adicionar em eppendorf, em triplicata, 60µL de amostra + 60µL de 75mmol/L ZnSO₄;
Agitar 30sec no vórtex;

Centrifugar por 2min a 10000rpm a temperatura ambiente;
Após centrifugar, adicionar 70 μ L de 55mmol/L NaOH;
Agitar 30sec no vórtex (não precisa quebrar o sedimento)
Centrifugar por 5min a 10000rpm a temperatura ambiente;
Transferir 150 μ L do sobrenadante para tubo de ensaio de vidro pequeno (sobrenadante não deve estar turvo);
Adicionar 50 μ L de tampão glicina (45g/L, pH 9,7).

Ativação dos grânulos de cádmio (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Para esta técnica utiliza-se 3 grânulos pequenos.

Grânulos ficam estocados em H₂SO₄ 100mmol/L

Em capela, lavar os grânulos que serão utilizados com H₂O destilada 3 vezes (com auxílio de um béquer e uma peneira)

Colocar a solução de CuSO₄ 5mmol/L em um pote e adicionar os grânulos previamente lavados. São então deixados em contato por 5min.

Os grânulos ativados devem então ser usados dentro de 10min.

Retirar os grânulos da solução e adicionar a quantidade necessária em cada vial.

Após o uso, os grânulos são lavados e estocados em 100mmol/L de H₂SO₄.

Os grânulos que ficarem pretos mesmo após serem lavados com H₂SO₄ devem ser descartados.

Redução do nitrato a nitrito

3 grânulos são adicionados ao tubo de ensaio contendo a amostra e o tampão glicina.

Procurar utilizar os grânulos com tamanhos próximos!

Deixar em agitação contínua por 10min em agitador tipo Kline;

Transferir 100 μ L de cada amostra para a microplaca para a determinação de nitritos.

Curva de calibração (triplicata)

Fazer a diluição dos padrões na própria microplaca antes de adicionar qualquer reagente.

1. Preparar a Solução de Uso NaNO₂ 125 μ mol/L (P5): Em um balão volumétrico de 100mL dissolver 125 μ L de Solução Estoque Padrão NaNO₂ 100mM
2. Adicionar 100 μ L de água destilada nos poços A1, A2, A3 (brancos)

3. Adicionar 100µL Solução de Uso NaNO₂ 125µmol/L no poço B1, B2, B3 (primeiro ponto)
4. Adicionar 100µL de água destilada nos poços C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2, E3, F1, F2, F3
5. Adicionar 100µL Solução de Uso NaNO₂ 125µmol/L no poço C1 e homogeneizar com a própria pipeta.
6. Transferir 100µL da solução C1 para o poço D1 e homogeneizar com a própria pipeta.
7. Transferir 100µL da solução D1 para o poço E1 e homogeneizar com a própria pipeta.
8. Transferir 100µL da solução E1 para o poço F1 e homogeneizar com a própria pipeta.
9. Retirar 100µL do poço F1 e descartar.
10. Repetir o mesmo procedimento (a partir do passo 5) para as outras duas curvas de calibração (Coluna 2 e 3)

Quantificação do teor de nitritos

Após a adição das amostras e da diluição seriada do padrão na microplaca, adiciona-se 50 µL do Reagente 1 e 50 µL do Reagente 2 a cada poço. Incubar por 10min a temperatura ambiente. A leitura é realizada em uma leitora de microplacas Asys Expert Plus, Biochrom[®] (Holliston, MA, EUA), 540nm.

Importante: Toda solução que entrou em contato com o cádmio deve ser descartada como resíduo tóxico (armazenar em potes de plástico para descarte adequado)

Cálculo do fator:

$$\text{Fator} = \frac{\text{concentração do padrão}}{\text{leitura do espectrofotômetro}}$$

Obs.: Fator +/-70 (para validação)

Cálculo da concentração da amostra:

Concentração= fator x leitura da amostra

ANEXO V - Determinação do grupamento Tiol (SH-grupo)

Reagentes

1. Tampão Tris base 0,25M (Sigma-Aldrich[®], EUA) e EDTA 20mM (Synth[®]), Brasil- pH 8.2

Pesar 3,028g Tris base, 0,7445g EDTA e diluir em 100mL H₂O (qsp). Ajustar o pH para 8.2.

2. DTNB 10mM

Pesar 39,635mg DTNB (Sigma-Aldrich[®], EUA) e diluir em 10mL de metanol (Vetec[®], Brasil) (qsp).

Armazenar na geladeira ao abrigo da Luz. Pode ser utilizado até por 2 semana.

Procedimento

Reagentes	Branco	Amostra
Tampão Tris-EDTA (μL)	1000	1000
Plasma (μL)	-	50

Agitar e realizar leitura em espectrofotômetro em 412 nm (leitura A1)

Em seguida, adicionar

Reagentes	Branco com DTNB	Amostra
DTNB 10mM (μL)	20	20

Esperar 15 minutos a temperatura ambiente. Ler em 412 nm (leitura A2).

Realizar também uma leitura do branco só com DTNB 10mM.

Cálculo:

Concentração de SH total (mM) = (A2 - A1 - B com DTNB) x 1,57mM

Corrigir essa concentração pela quantidade de proteínas totais no plasma. O resultado é expresso em μM/mg de proteína.

ANEXO VI - Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON-1)

Preparo da Solução de Estoque de Tampão TRIS-HCl 1M

($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl = 157,64$)

Pesar 39,41g e diluir em 250mL de H_2O (utilizar balão volumétrico)

CUIDADO: reação exotérmica!

Ajustar o pH para 8,0 (antes de acertar o menisco) e armazenar em geladeira

Corrigir pH todos os dias antes do uso – para o uso, o pH poderá variar entre 8,0 e 8,5

Preparo da Solução de Estoque de $CaCl_2$ 1M

($CaCl_2 \cdot 2H_2O = 147,02$)

Pesar 7,35g e diluir em 50mL de H_2O (utilizar balão volumétrico)

CUIDADO: reação exotérmica!

Filtrar a solução em papel de filtro após o preparo e armazenar em geladeira.

Preparo do Tampão A – Preparar no dia do uso

20mM TRIS-HCl (pH=8,0) e 1mM $CaCl_2$

Tampão para a *diluição das amostras* e preparo do *Substrato de CMPA* (cloro-metil-fenil-acetato)

Para 100mL de H_2O : 2mL Solução Estoque de TRIS-HCl pH8,0

100 μ L Solução Estoque de $CaCl_2$

Preparo do Tampão B – Preparar no dia do uso

9,0mM TRIS-HCl (pH=8,0) e 0,9mM $CaCl_2$

Tampão para o preparo do Substrato de *PA-No Salt* (fenil-acetato sem a adição de sal)

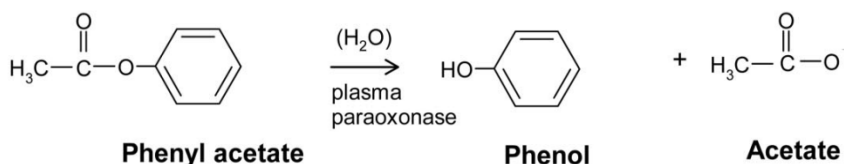
Para 50mL de H_2O : 450 μ L Solução Estoque de TRIS-HCl pH8,0

45 μ L Solução Estoque de $CaCl_2$

Preparo das amostras:

Antes de diluir as amostras, os tubos/ criotubos de armazenamento deverão ser centrifugados a 10000 RPM, por 5min e refrigerados a 10°C.

Reação 1 – Atividade AREase sem adição de sal



Leitura avalia a formação do produto de hidrólise do fenil-acetato (fenol) durante 4 minutos

Diluir a amostra 1:80 – 5µL da amostra e 395µL do Tampão A

Utilizar tubos de vidro

As amostras, após serem diluídas, deverão ser processadas em até 30min.

Preparo do Substrato de PA-No Salt: C₈H₇O₂ - PM: 136,15; Conc. final: 3,26mM
10mL do Tampão B + 5µL do Reagente PA (fenil-acetato)

Esta solução de substrato deve ser preparada em Tubo tipo *Falcon*, ao abrigo de luz, NO MOMENTO DO USO e **não** deverá ser utilizada após **2 horas** de seu preparo.

Agitar vigorosamente por 30 segundos!

PROCEDIMENTO:

Adicionar 20µL da amostra diluída 1:80 nos poços em que ocorrerão a reação. Ao fim, adicionar 200µL da solução do Substrato de PA-No Salt e proceder a leitura.

Parâmetros de leitura – Utilizar modelo pré-definido no leitor de microplacas *EnSpire*[®]: Protocolo “AREase”

Leitura cinética a 25°C – 16 leituras, em 270nm, com intervalo de 15 segundos entre as leituras; o tempo total da reação é de 4min.

Após as leituras cinéticas, serão realizadas mais duas leituras (em 900nm e 977nm) para a correção do *path length* (caminho ótico);

ver cálculos de correção ao final.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados das 16 leituras em todas as reações deverão ser corrigidos da mesma forma;

A primeira etapa é a correção por *base line correction*; esta correção deverá ser feita para realizar a comparação da atividade da cinética enzimática;

As amostras cujas replicatas variarem mais de 10% ou que apresentarem um valor de r^2 inferior a 0,99 deverão ser reprocessadas;

Somente a primeira porção linear da curva deverá ser utilizada na análise final;

A análise deverá ser feita em mDO, e o valor das médias das leituras deverá ser utilizado na fórmula de cálculo de atividade (expresso em U/mL).

FÓRMULA

$$Atv = \frac{mDO \times Vol. \text{total da reação (mL)} \times \text{Fator de diluição}}{\varepsilon \times \text{Volume de amostra } (\mu\text{L})}$$

Onde:

$\varepsilon \rightarrow$ Coeficiente de extinção molar

Para o produto de hidrólise do CMPA (4-clorometil-fenol) = 1,30 mMol/Lcm⁻¹

Para o produto de hidrólise do fenil-acetato (fenol) = 1,31 mMol/Lcm⁻¹

Correção do caminho ótico (*Path length correction*)

Greiner bio-one. Application Note: UV/VIS Spectroscopy in Microplates UV-Star[®], μ Clear[®], MICROLON[®] and CELLSTAR[®] <http://www.greinerbioone.com/en/row/articles/literatures/application_notes/>

- a) Correção pela geometria da placa – para placas com poços cilíndricos de fundo plano:

Utilizando as especificações do fabricante quanto ao diâmetro dos poços, fazer o seguinte cálculo:

$$h = \frac{4 \times V}{\pi \times d^2}$$

Onde:

h = fator de correção para a placa

V = volume final que será utilizado

d = média dos diâmetros especificados

b) Correção por volume de água:

Utilizando as leituras em 900nm e 977nm, é possível realizar a correção do *path length* para cada poço de reação, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$h = \frac{(A_{977} - A_{900})_{amostra}}{(A_{977} - A_{900})_{1cm\acute{a}gua}}$$

Como referência para água, utilizar o valor padrão de 0,180