

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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BIOMARCADORES  
OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E DE DISFUNÇÃO  
ENDOTELIAL EM PACIENTES OBESOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Sílvia Juliane Piva**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BIOMARCADORES  
OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E DE DISFUNÇÃO  
ENDOTELIAL EM PACIENTES OBESOS**

**Sílvia Juliane Piva**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BIOMARCADORES  
OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL  
EM PACIENTES OBESOS**

elaborada por  
**Sílvia Juliane Piva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Rafael Noal Moresco, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Jarbas Rodrigues de Oliveira, Dr. (PUCRS)**

**Ricardo Brandão, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 25 de março de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho de dissertação é um processo decorrente de vários anos de dedicação e aprendizado, iniciados ainda durante a graduação e que se perpetuam até hoje. Por isto dedico tal trabalho àqueles cuja amizade, paciência e carinho tornaram o caminho mais leve e tranquilo a fim de transformar o conhecimento abstrato em massa concreta para a fundamentação científica. Agradeço principalmente ao meu orientador, que além de excelente professor é também uma pessoa de grande humanidade, cujo exemplo procuro seguir tanto em aspectos éticos quanto morais. Agradeço também a minha família, cujo apoio e amor levou-me em busca do conhecimento e é ícone principal nas vitórias alcançadas; e igualmente aos amigos, dentre os quais incluem-se os colegas de laboratório que sempre foram companheiros de risadas, chimarrão, RU (restaurante universitário) e, é claro, muito trabalho. Não esqueço de que para chegar até este momento, outros professores, amigos e colegas foram de essencial importância em minha vida pessoal e acadêmica. Para eles dedico igualmente tal conquista.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ASSOCIAÇÃO ENTRE BIOMARCADORES OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM PACIENTES OBESOS**

AUTORA: SÍLVIA JULIANE PIVA

ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de março de 2011

A obesidade é um fenômeno mundial caracterizado por uma desordem metabólica crônica, em que o excesso de tecido adiposo é responsável por estados de estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. Devido ao crescente número de pessoas obesas e à mortalidade decorrente de patologias associadas à obesidade, faz-se necessário a realização de estudos que contribuam para a prevenção e monitoramento desta. Para tanto, o estudo de biomarcadores de estados oxidativos, inflamatórios e de dano endotelial que detectem precocemente os danos causados pela obesidade podem contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia da doença, bem como seu diagnóstico e monitoramento. Neste trabalho a população estudada constituiu-se de indivíduos obesos, com sobrepeso e controles saudáveis. Os objetivos principais deste trabalho foram, na população em estudo: avaliar o comportamento de alguns marcadores de estresse oxidativo – malondialdeído (MDA), albumina modificada pela isquemia (IMA), produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP) e grupamento tiol plasmático (-SH); avaliar os níveis da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6); determinar os níveis de marcadores laboratoriais relacionados à disfunção endotelial – óxido nítrico (NO) e albuminúria – e investigar o comportamento de biomarcadores lipídicos e glicêmicos, bem como a prevalência de diabetes *mellitus* e hipertensão. Os indivíduos obesos, em comparação com os demais indivíduos estudados apresentaram: níveis mais elevados de MDA, IMA e AOPP, denotando uma oxidação lipídica e protéica (principalmente da proteína albumina); elevação dos níveis de IL-6, caracterizando um estado pró-inflamatório significativo; baixos níveis de NOx com conseqüente redução da biodisponibilidade de NO e elevação da albuminúria, refletindo provável disfunção endotelial; redução discreta nos níveis de HDL colesterol, e elevação dos níveis de glicose bem como maior prevalência de diabetes e hipertensão. Sendo assim, considerando-se os resultados obtidos, observou-se que os indivíduos obesos apresentaram alterações relacionadas a processos oxidativos, inflamatórios e vasculares, sendo a avaliação de biomarcadores associados a tais processos de grande importância para melhor entender a fisiopatologia da doença, evitando patologias relacionadas e a mortalidade decorrente delas.

*Palavras-chave:* Obesidade. Biomarcadores. Estresse oxidativo. Inflamação. Disfunção endotelial.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ASSOCIATION AMONG OXIDATIVE, INFLAMMATORY AND ENDOTHELIAL BIOMARKERS IN OBESE PATIENTS**

AUTHOR: SÍLVIA JULIANE PIVA

ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Date and Place: March 25<sup>th</sup>, 2011, Santa Maria

Obesity is a world phenomenon characterized as a chronic metabolic disorder, where the excess of adipose tissue is responsible for oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction states. Due to the higher number of obese people and the mortality due to pathologies associated to obesity, studies that contribute to the prevention and monitoring are important. So, the study of oxidative stress, inflammatory and endothelial dysfunction biomarkers that detect earlier damages caused by obesity can contribute to its better physiopathology understanding, such as its diagnosis and monitoring. In this work the study population was constituted by obese and overweight subjects and healthy control. The main objectives from this work were, in the study population: evaluate the behavior from some oxidative stress markers – malondialdehyde (MDA), ischemia-modified albumin (IMA), advanced oxidation protein products (AOPP) and plasma thiol (–SH); evaluate the proinflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) levels; determine the laboratory marker levels related to the endothelial dysfunction – nitric oxide (NO) and albuminuria – and investigate the behavior from lipidic and glycaemic biomarkers, such as the prevalence of diabetes *mellitus* and hypertension. The obese subjects compared with the others studied subjects presented: higher levels of MDA, IMA and AOPP, showing a lipidic and proteic oxidation (mainly the albumin protein); increasing of IL-6 levels that characterize a significant proinflammatory state; lower levels of NOx with consequent NO bioavailability reduction and increasing of albuminuria, reflecting a probable endothelial dysfunction; discrete HDL cholesterol levels reduction and increasing of glucose, such as higher prevalence of diabetes and hypertension. Therefore, considering the obtained results, we observed that the obese subjects presented changes related to oxidative, inflammatory and vascular processes, showing that the evaluation of biomarkers associated with these processes has a great importance to better understanding of obesity physiopathology that avoid related pathologies and their consequent mortality.

*Keywords:* Obesity. Biomarkers. Oxidative stress. Inflammation. Endothelial dysfunction.

## **LISTA DE TABELAS**

### **MANUSCRITO I**

<b>Table 1.</b> Baseline characteristics of study participants.....	35
---	----

### **MANUSCRITO II**

<b>Table 1.</b> Baseline characteristics of study population.....	50
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estresse oxidativo e sua influência na obesidade.....	14
Figura 2 – Mecanismos inflamatórios que induzem o estresse oxidativo na obesidade.....	20
Figura 3 – Mecanismos de indução de estresse oxidativo no endotélio.....	23

### MANUSCRITO I

<b>Figure 1.</b> Serum ischemia-modified albumin (IMA) levels in study population.....	34
--	----

### MANUSCRITO II

<b>Figure 1.</b> The values of AOPP (A), IMA (B), and –SH group (C) in study population.....	48
<b>Figure 2.</b> The values of IL-6 (A), NOx (B), and urinary albumin (C) in study population....	49



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABSU – *Absorbance units* (Unidades de absorvância)  
AGE – *Advanced glycosylation end products* (Produtos finais de glicação avançada)  
ANOVA – *Analysis of variance* (Análise de variância)  
AOPP – *Advanced oxidation protein products* (Produtos protéicos de oxidação avançada)  
APO A – *Apolipoprotein A* (Apolipoproteína A)  
APO B – *Apolipoprotein B* (Apolipoproteína B)  
BMI – *Body mass index* (Índice de massa corpórea)  
Cis-34 – Resíduo de cisteína na posição 34  
CRP – *C-reactive protein* (Proteína C-reativa)  
DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)  
EROS – Espécies reativas de oxigênio  
FFA – *Free fatty acids* (Ácidos graxos livres)  
GFR – *Glomerular filtration rate* (Taxa de filtração glomerular)  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – *Hydrogen peroxide* (peróxido de hidrogênio)  
HSA – *Human serum albumin* (Albumina sérica humana)  
ICAM-1 – *Intercellular adhesion molecule-1* (Molécula de adesão intercelular-1)  
IL-6 – *Interleukin-6* (Interleucina-6)  
IMA – *Ischemia-modified albumin* (Albumina modificada pela isquemia)  
IMC – Índice de massa corpórea  
LDL – Lipoproteínas de baixa densidade  
MDA – *Malondialdehyde* (Malondialdeído)  
MPO – *Myeloperoxidase* (Mieloperoxidase)  
NO – *Nitric oxide* (Óxido nítrico)  
N-terminal – Grupo amino terminal  
NO<sub>x</sub> – *Nitrate/Nitrite* (Nitrato/nitrito)  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – *Superoxide anion* (Ânion superóxido)  
OH<sup>-</sup> – *Hydroxyl radical* (Radical hidroxil)  
ONOO<sup>-</sup> – *Peroxynitrite* (Peroxidonitrito)  
PCR – Proteína C-reativa  
ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)  
-SH – *Plasma thiol group* (Grupamento tiol plasmático)  
TNF- $\alpha$  – *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (Fator de necrose tumoral-alfa)  
TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances* (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)  
VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule-1* (Molécula de adesão de células vasculares-1)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
<b>2.1 Obesidade</b> .....	11
<b>2.2 Obesidade e Estresse Oxidativo</b> .....	13
2.2.1 Marcadores de Estresse Oxidativo.....	15
2.2.1.1 Malondialdeído.....	15
2.2.1.2 Albumina Modificada pela Isquemia.....	16
2.2.1.3 Produtos Protéicos de Oxidação Avançada.....	17
2.2.1.4 Grupamento Tiol Plasmático.....	18
<b>2.3 Obesidade e Inflamação</b> .....	19
2.3.1 Marcadores de Inflamação.....	20
2.3.1.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa.....	20
2.3.1.2 Interleucina-6.....	21
2.3.1.3 Proteína C-Reativa.....	21
2.3.1.4 Moléculas de Adesão Molecular.....	22
<b>2.4 Obesidade e Disfunção Endotelial</b> .....	22
2.4.1 Marcadores de Disfunção Endotelial.....	23
2.4.1.1 Óxido Nítrico.....	23
2.4.1.2 Albumina Urinária.....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	25
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	25
<b>4 MANUSCRITOS</b> .....	26
<b>4.1 Manuscrito I</b> .....	26
<b>4.2 Manuscrito II</b> .....	36
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>ANEXO A – Separata do artigo publicado no periódico Clinical Biochemistry</b> .....	61
<b>ANEXO B – Comprovante de submissão do Artigo II para publicação no periódico Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</b> .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo que pode levar ao desenvolvimento de problemas de saúde, sendo considerada atualmente um problema de saúde pública. Tal excesso de tecido adiposo é decorrente de uma alimentação inadequada, com alto consumo e baixo gasto calóricos, sedentarismo e fatores genéticos. A alimentação rica em carboidratos e lipídios e o sedentarismo, tão presente na sociedade moderna, contribui para o alastramento do fenômeno de sobrepeso e obesidade. A Organização Mundial da Saúde revelou uma incidência de 1,6 bilhões de adultos maiores de 15 anos com sobrepeso, e pelo menos 400 milhões de obesos em 2005. Dentre as crianças menores de 5 anos de idade, pelo menos 20 milhões já se encontravam com sobrepeso. A estimativa para 2015 é de que aproximadamente 2,3 bilhões de adultos venham a ter sobrepeso e mais de 700 milhões sejam obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Esta tendência à obesidade envolve, além do próprio excesso de gordura, problemas de saúde relacionados como diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares. A mortalidade entre obesos cresce à medida que tais problemas se desenvolvem. Um estudo prospectivo de corte intitulado Nurses' Health Study destacou que, dentre as 3507 mortes ocorridas em 16 anos de estudo, 751 eram devido às doenças cardiovasculares e 1748 ao câncer, ambas as complicações decorrentes do excesso de tecido adiposo. Sendo assim, devido ao crescente número de pessoas obesas e à mortalidade associada ao fenômeno da obesidade, faz-se necessário a realização de estudos que contribuam para a prevenção e monitoramento desta. Devido ao fato da obesidade ser uma doença crônica caracterizada pela inflamação e disfunção endotelial e resultante, principalmente, do desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes do organismo, a investigação de biomarcadores que atentem para tais estados torna-se importante. Para tanto, é de fundamental importância o estudo de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico e na avaliação da evolução da obesidade a fim de contribuir para evitar complicações futuras decorrentes desta desordem metabólica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Obesidade

A obesidade é um fenômeno mundial caracterizado por uma desordem metabólica crônica, em que o excesso de tecido adiposo é responsável por estados de estresse oxidativo, inflamatório e de disfunção endotelial. O aumento do tecido adiposo provém de um desequilíbrio entre consumo e gasto calóricos, em que uma dieta rica em carboidratos e lipídios fornece altas reservas de energia, sob a forma de gordura, sem que haja depleção dessas através de exercício físico. Por isto o sedentarismo é considerado importante fator para o desenvolvimento do sobrepeso e consequente obesidade. Para melhor controle do peso e da saúde do indivíduo, há formas de se mensurar o tecido adiposo e uma delas é o cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC), em que o peso em quilogramas é dividido pelo quadrado da altura em metros. Os indivíduos podem ser classificados, de acordo com o IMC, em normais (IMC 18,5 – 24,9 kg/m<sup>2</sup>), com sobrepeso (IMC 25,0 – 29,9 kg/m<sup>2</sup>) e obesos (IMC ≥ 30,0 kg/m<sup>2</sup>), sendo que os últimos ainda podem ser divididos em classes: classe I (IMC 30 – 34,9 kg/m<sup>2</sup>), classe II (IMC 35 – 39,9 kg/m<sup>2</sup>) e classe III – obesos mórbidos (IMC ≥ 40 kg/m<sup>2</sup>) (CLINICAL GUIDELINES, 1998). Sendo a obesidade um fator de risco para diabetes, hipertensão, dislipidemia, infarto, doenças coronarianas, artrite e certos tipos de câncer (MALNICK et al., 2006), o monitoramento do IMC permite evitar tais complicações. No entanto, percebe-se uma relevante incidência de obesidade entre a população mundial. Em 2005 cerca de 1,6 bilhões de adultos eram obesos no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Em 2010, um estudo realizado por FLEGAL et al. (2010) revelou a tendência à obesidade em aproximadamente 30% da população norte-americana estudada entre 2007 e 2008, independente do sexo ou etnia.

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a tendência da obesidade também é crescer. Pesquisa realizada pelo MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO et al. (2004) mostrou a incidência de 29,5% de sobrepeso e 11,1% de obesidade entre os indivíduos estudados. Já no ano de 2009 o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010) demonstrou que aproximadamente 46,6% e 13,9% da população estudada apresentava sobrepeso ou obesidade, respectivamente. A evidência da obesidade como uma doença mundial também se reflete nos índices de mortalidade gerados por doenças decorrentes. Analisando um estudo prospectivo de corte, o Nurses' Health Study, ZHANG et al. (2001) observaram que uma elevada circunferência

abdominal estava associada ao aumento da mortalidade por doença cardiovascular, o que correspondia a 21,4% do total das mortes. A circunferência abdominal, assim como o IMC é uma medida para avaliar sobrepeso e obesidade. Já FLEGAL et al. (2005) relataram recentemente um aumento na mortalidade entre indivíduos obesos, principalmente os com IMC superior a 35 kg/m<sup>2</sup>. Portanto, a obesidade e suas complicações resultam em transtornos sócio-econômicos, enfermidades e mortes.

O tecido adiposo, há pouco tempo atrás, desempenhava apenas funções termoprotetoras, de reserva energética e de proteção contra choques mecânicos. Hoje se sabe que além de tais funções, ele também é responsável pela produção de substâncias mediadoras de respostas biológicas. Ácidos graxos não-esterificados, citocinas, inibidor do ativador do plasminogênio 1 e adiponectina são algumas das substâncias ativadas pelo excesso de lipídios no organismo, e que favorecem o aparecimento de comorbidades como resistência a insulina, hipertensão, dislipidemia e danos vasculares (GRUNDY et al., 2004). Tais comorbidades, por sua vez, contribuem para um estado de desequilíbrio entre radicais livres teciduais, espécies reativas de oxigênio (EROS) e antioxidantes naturais do organismo, denominado estresse oxidativo. Em tal estado os radicais livres em excesso, altamente reativos, são responsáveis pelo dano aos carboidratos, às proteínas, às estruturas lipídicas, ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e às estruturas funcionais das células (YU, 1994). Como uma reação em cadeia, o próprio estresse oxidativo é responsável por um próximo estado importante da obesidade: o de inflamação. Os EROS contribuem para o aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6), quimiocinas, proteína C-reativa (PCR), contagem de leucócitos e das células de adesão molecular (LI et al., 2003). A elevação das moléculas inflamatórias estimula a expressão de moléculas de adesão plaquetária aterogênicas e promovem a ligação e migração de monócitos nas paredes dos vasos, transformados, posteriormente, em macrófagos (LYON et al., 2003) Sendo assim, a ação inflamatória gerada pelo estresse oxidativo pode gerar placas ateromatosas nos vasos ou simplesmente ajudar no processo de desenvolvimento de disfunção endotelial. Por isto, o estudo de biomarcadores capazes de detectar precocemente os estados oxidativos, inflamatórios e de dano endotelial da obesidade tornam-se ferramentas bastante importantes no diagnóstico e monitoramento da doença. A associação entre eles pode contribuir para evitar patologias relacionadas à obesidade que tanto contribuem para a mortalidade pelo excesso de peso.

## 2.2 Obesidade e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre radicais livres teciduais, EROS e substâncias antioxidantes do organismo, e pode ser um dos principais mecanismos responsáveis pela obesidade. Os radicais livres e as EROS são moléculas altamente reativas de elétrons não pareados que se ligam rapidamente às moléculas próximas ou preferencialmente em tecidos, respectivamente. Dentre as EROS, que são moléculas detentoras de oxigênio, destacam-se o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), o óxido nítrico (NO), o hipoclorito e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ , resultado da reação com  $O_2^-$  e NO) (YU, 1994). Normalmente baixas concentrações de radicais livres e EROS são importantes para o estado redox (redução/oxidação) normal das células, função tecidual e processos de sinalizações intracelulares. No entanto, quando em excesso, como é o caso da obesidade, a oxidação de lipídios e proteínas pode ser citotóxica e causar dano à membrana e receptores celulares, ao DNA e ácidos nucleicos, provocar disfunção enzimática, perturbar a sinalização de cascatas, e ainda ativar doenças através de processos como a inflamação (MARITIM et al., 2003).

Tanto o estresse oxidativo quanto a obesidade podem se manifestar até mesmo nas duas primeiras décadas de vida, podendo contribuir para o desenvolvimento de diabetes, e até mesmo doenças cardiovasculares (VINCENT et al., 2007). Para tanto, no intuito de reduzir o avanço dos danos causados pelos radicais livres e EROS, os antioxidantes naturais do organismo, que são divididos em não-enzimáticos e enzimáticos, apresentam um importante papel fisiológico. Os antioxidantes não-enzimáticos são basicamente aqueles adquiridos através da dieta – vitaminas A (retinol), C (ácido ascórbico) e E (alfa tocoferol) e minerais (zinco, selênio, cobre e manganês) – e substâncias contendo grupos tióis, que agem eficientemente na ausência de qualquer doença. Já os antioxidantes enzimáticos constituem-se de superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase e combatem de forma mais agressiva o estresse oxidativo. Na obesidade há, pois, uma deficiência de substâncias antioxidantes, principalmente devido a pouca ingestão destas na forma de frutas, vegetais, óleo de oliva, sementes e castanhas. O estresse oxidativo decorrente pode ser detectado através do baixo consumo de substâncias antioxidantes correlacionado ao aumento da circunferência abdominal, IMC e peroxidação lipídica do plasma em obesos (VINCENT et al., 2010). Além dos antioxidantes não-enzimáticos, também os enzimáticos podem estar deficientes na obesidade. Na fase aguda da doença as enzimas antioxidantes parecem estar aumentadas, mas à medida que se cronifica, há uma depleção das reservas antioxidantes ao

longo do tempo (ERDEVE et al., 2004). E, além da deficiência da ação antioxidante nos obesos e do excesso de tecido adiposo, ainda outros mecanismos podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo: a hiperglicemia, o aumento da atividade muscular por carregamento excessivo de peso, a hipertensão, a inflamação crônica, a produção endotelial de EROS e a hiperleptinemia (Figura 1) (VINCENT et al. 2006).

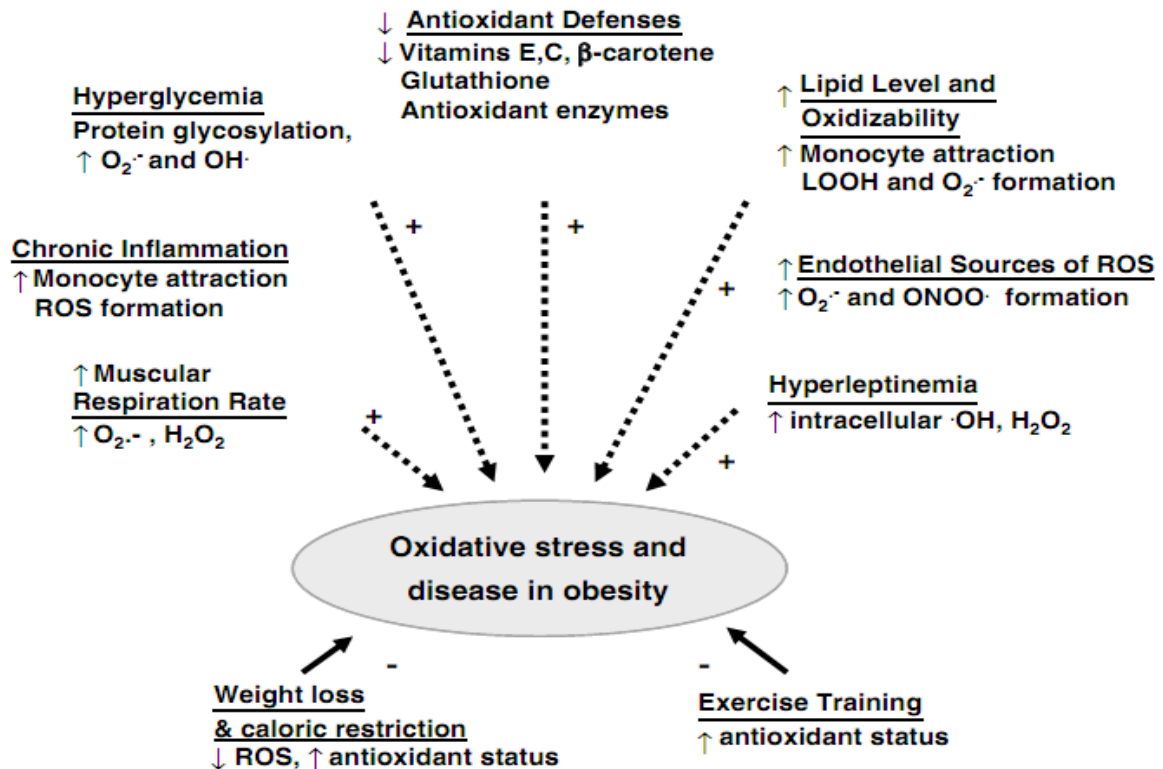


Figura 1 – Estresse oxidativo e sua influência na obesidade (o símbolo + e – significam respectivamente aumento e atenuação do estresse oxidativo; LOOH significa hidroperóxidos lipídicos) (Reproduzido de VINCENT et al., 2006).

Na hiperglicemia, decorrente principalmente de resistência à insulina, há três formas principais de produção de EROS: autooxidação da glicose, glicação avançada com formação de produtos finais (produtos finais de glicação avançada – AGE) e pelo trajeto de polióis (VINCENT et al., 2006), que certamente contribuem para o aparecimento do diabetes, uma das principais complicações da obesidade. A presença dos radicais livres e EROS são responsáveis pelas complicações decorrentes da obesidade, como diabetes, hipertensão e dislipidemia precisam, pois, ser mensurados através de técnicas que venham a prevenir danos futuros. Devido ao fato da medida direta de radicais livres e EROS e da captura das reações de radicais livres em tempo real serem bastante difíceis e custosas (HALLIWELL et al., 2004), técnicas mais simples de mensuração de biomarcadores ou produtos finais de reações

estão sendo utilizadas para avaliar o estresse oxidativo (VINCENT et al., 2007). Dentre tais medidas estão a de peroxidação lipídica, principalmente do malondialdeído (MDA). Além do MDA outros biomarcadores se destacam envolvidos no estresse oxidativo em obesos, dentre eles a albumina modificada pela isquemia (IMA), os produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP) e o grupamento tiol plasmático (-SH).

### 2.2.1 Marcadores de Estresse Oxidativo

A obesidade é um estado marcado pelo estresse oxidativo e pelo acúmulo de gorduras devido à grande ingestão de produtos calóricos e sedentarismo. O aumento das reservas de gorduras faz com que haja um excesso de triglicérides intracelular, ácidos graxos livres (FFA) e dislipidemia (DAVI et al., 2002). O excesso de triglicérides intracelular suprime o transportador mitocondrial do nucleotídeo adenina levando a um aumento da produção de  $O_2^-$  dentro da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, e diminuindo a adenina difosfato intra-mitocondrial. Então, elétrons se acumulam dentro da cadeia transportadora de elétrons e reagem com oxigênio adjacente para formar mais  $O_2^-$  (BAKKER et al., 2000) Os FFA provenientes da obesidade visceral ou abdominal também contribuem para a formação de EROS, principalmente  $O_2^-$ , ácido hipocloroso e  $ONOO^-$ . Além disto, eles também elevam a hiperglicemia e induzem a produção de radicais nitróxidos nas células e parede do endotélio via mecanismo da proteína quinase (INOBUCHI, et al., 2000). Sendo assim, o tecido adiposo desempenha papel de substrato para oxidação, estímulo para formação de radicais e reserva de produtos do estresse oxidativo, aumentando o risco para trombose, disfunção endotelial e aterosclerose (LYON et al., 2003).

#### 2.2.1.1 Malondialdeído

Na obesidade o perfil dislipidêmico, marcado pelos altos níveis de triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) favorece a peroxidação lipídica através dos radicais livres e EROS. A oxidação lipídica gera alguns produtos, dentre eles as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), F2-isoprostanos e MDA, que são utilizados como marcadores do estresse oxidativo (LYKKESFELDT, 2007).

O MDA é um dos mais conhecidos produtos finais da peroxidação lipídica, sendo gerado a partir da reação da ciclooxigenase no metabolismo das prostaglandinas (OZDEMIR



et al., 2009). Ele modifica proteínas e o DNA, e é considerado um dos mais mutagênicos produtos da peroxidação lipídica, presente em diversas patologias como diabetes, aterosclerose, câncer de cólon e doença de Parkinson (DALLE-DONNE et al., 2006; ESTEBAUER et al., 1991). Há estudos relacionando também a obesidade com o aumento do marcador MDA. Alguns analisaram o aumento progressivo do IMC com o aumento das concentrações de MDA em homens e mulheres adultos com sobrepeso e obesos, tanto no Oriente Médio (MUTLU-TURKOGLU et al., 2003) quanto na Europa (DAVI et al., 2002) e América (KEANEY et al., 2003). Elevados valores de MDA também foram observados em crianças e adolescentes obesos de 8 a 18 anos. Quando comparados com não obesos, os valores de MDA de tal população praticamente duplicaram (HASZON et al., 2003).

#### 2.2.1.2 Albumina Modificada pela Isquemia

A albumina é uma proteína constituída por 585 aminoácidos, de massa molecular de aproximadamente 66,5 kDa e poucos resíduos de triptofano ou metionina (PETERS, 1995). Possui 35 resíduos de cisteína – 34 envolvidas na formação de pontes de dissulfeto (17 pontes ao todo) e 1 cisteína livre redox ativa (Cis-34), que representa cerca de 80% dos tióis livres do plasma e garante o poder antioxidante da albumina. Tal tiol da Cis-34 é reativo e capaz de tioração (albumina-S-R) e nitrosilação (albumina-S-NO), processos responsáveis por inúmeras funções *in vivo* (MARTIN-VENTURA et al., 2009; QUINLAN et al., 2005). Tanto a estrutura flexível da albumina quanto seus três domínios homólogos (I – III) proporcionam uma variedade de sítios de ligação e adaptabilidade aos seus ligantes. Ácidos graxos de cadeia longa ligam-se em cerca de 6 sítios, enquanto que os metais de transição cobre e níquel ligam-se ao N-terminal, desde que o terceiro aminoácido seja a histidina. Compostos sulfidrílicos e certos oxidantes ligam-se covalentemente ao tiol da Cis-34 (PETERS, 1995). Sendo assim, diversos compostos endógenos e exógenos, como fármacos, hormônios e íons metálicos ligam-se à albumina. Dentre os ligantes catiônicos, o cobre (Cu-II) e o ferro (Fe-II) merecem particular consideração porque, como metais de transição, eles são muito potentes para gerar EROS após uma reação com o oxigênio. Tais metais podem interagir com o  $H_2O_2$ , levando à formação de radicais  $OH^\cdot$  deletérios (ROCHE et al., 2008). Os principais alvos dos radicais livres e EROS são os grupos tióis da cisteína da albumina.

Situações de estresse oxidativo, como isquemia e obesidade, permitem que radicais livres e EROS se elevem em excesso na circulação sanguínea, e atinjam uma porção fundamental para a ligação da albumina aos metais de transição, o N-terminal. Há então uma

clivagem do N-terminal em outros dois aminoácidos e oxidação do cis-34, resultando em menos cobalto, cobre, níquel ou ferro ligado à albumina e, conseqüentemente, mais metais livres na circulação (BAR-OR et al., 2008). A modificação da albumina através da isquemia produziu um marcador denominado IMA (BAR-OR et al., 2000). Processos isquêmicos com alterações vasculares de pH, hipóxia ou demais mecanismos que desencadeiem o estresse oxidativo levam à formação da IMA. Esta, antes apenas associada à isquemia, hoje possui uma relação mais estreita com diversos estados patológicos. Sendo assim, ela já esteve aumentada na isquemia do músculo esquelético (FALKENSAMMER et al., 2007), na embolia pulmonar (TUREDI et al., 2008) e na doença renal crônica (elevação da IMA e lactato durante a anemia, evidenciando hipóxia) (CICHOTA et al., 2008). PIWOWAR et al. (2008) e KAEFER et al. (2010) demonstraram também elevados níveis de IMA em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, levando a crer que a hiperglicemia, como também o estresse oxidativo e a inflamação levam à hipóxia crônica e conseqüente modificação da albumina sérica. Pacientes com hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2009) e síndrome metabólica (GOTTLIEB et al., 2010) também apresentaram altos valores de IMA, sugerindo um envolvimento com o processo de estresse oxidativo.

### 2.2.1.3 Produtos Protéicos de Oxidação Avançada

Os AOPP, primeiramente caracterizados por WITKO-SARSAT et al. (1996), são decorrentes do estresse oxidativo causado pela ação de oxidantes cloraminados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas produzidos pela enzima mieloperoxidase (MPO) nos neutrófilos ativados. A enzima MPO catalisa a reação do íon cloreto com peróxido de hidrogênio, gerando grandes quantidades de ácido hipocloroso, importante na oxidação e cloração de substâncias (KETTLE et al., 1997). De acordo com CAPELLERE-BLANDIN et al. (2004), os AOPP são diretamente relacionados à oxidação da albumina, mas também de fibrinogênio e lipoproteínas (PIWOWAR, 2010). Os AOPP são marcadores do dano oxidativo às proteínas, da intensidade dele e também da inflamação (PIWOWAR, 2010) e possuem vantagens sobre outros marcadores devido a sua rápida formação, grande estabilidade e confiabilidade e longa meia-vida (DALLE-DONNE et al., 2003). No primeiro relato da existência dos AOPP (WITKO-SARSAT et al., 1996), sua concentração no plasma era relacionada aos níveis de ditirosina (marca da oxidação de proteínas) e de pentosidina (marcador da glicação protéica enzimática estreitamente ligada ao estresse oxidativo). Em sua estrutura os cromóforos ditirosina, grupos carbonil e pentosidinas estão presentes em grandes

quantidades (CAPEILLERE-BLANDIN et al., 2004). As propriedades biológicas dos AOPP e seus receptores são similares aos AGE.

Fisiologicamente, os AOPP se formam constantemente em pequenas quantidades por toda a vida do indivíduo e são retirados do organismo através do fígado e baço, podendo estar aumentados em condições patológicas (PIWOWAR, 2010). As concentrações de AOPP foram encontradas elevadas no plasma de pacientes urêmicos hemodialisados (WITKO-SARSAT et al., 1996), diabéticos e obesos (ATABEK et al., 2006). No diabetes a formação do AOPP é induzida por intensos processos de glicooxidação, estresse oxidativo e inflamação coexistente (PIWOWAR, 2010). KOÇAK et al. (2007) demonstraram um aumento nos níveis de AOPP em diabéticos em comparação com pré-diabéticos, confirmando o estresse oxidativo proveniente da hiperglicemia. Já no caso da obesidade, em que há estresse oxidativo decorrente da carbonilação de proteínas, permanente ativação plaquetária e produção de citocinas inflamatórias em células mononucleares (DANDONA et al., 2004), o aumento de AOPP progressivamente com o aumento do IMC é confirmado pelo estudo de PIWOWAR (2010). De acordo com ATABEK et al. (2006), crianças e adolescentes obesos também apresentaram valores superiores de AOPP. A macroangiopatia também esteve relacionada ao aumento dos valores de AOPP na obesidade (PIWOWAR, 2010).

#### 2.2.1.4 Grupamento Tiol Plasmático

O estresse oxidativo produzido pela obesidade contribui para o dano ao DNA celular, lipídios e proteínas, havendo uma ação citotóxica por parte dos radicais livres e EROS em desequilíbrio com os antioxidantes. As proteínas estão entre os principais alvos da oxidação no plasma, podendo sofrer alterações funcionais e, em particular, uma perda de propriedades metabólicas, enzimáticas e imunológicas (HIMMELFARB et al., 2001). Os grupos tióis das proteínas são os mais suscetíveis à oxidação. Dentre as proteínas detentoras de tal grupamento, destacam-se poderosos antioxidantes não-enzimáticos como a glutathiona e o diidrolipoato, que reciclam a vitamina E e radicais semi-hidroscórbicos e reduzem moléculas oxidadas como lipídios hidroperóxidos (YU, 1994). Os tióis e enzimas antioxidantes são encontrados no sangue, fígado, cérebro, esqueleto e músculo cardíaco. No plasma os grupamentos tióis servem como antioxidantes capazes de remover oxidantes responsáveis pelo início da peroxidação, e são quantitativamente a maior manifestação dos danos protéicos oxidativos (HIMMELFARB et al., 2001). Em tecidos saudáveis, esses antioxidantes

trabalham na manutenção do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante prevenindo danos teciduais e consequentes doenças (VINCENT et al., 2007).

Na obesidade, o aumento de proteínas carbonil e concomitante redução de grupamentos tióis plasmáticos podem ser um possível mecanismo contribuinte para aterosclerose, resistência a insulina e hipertensão (UZUN et al., 2007). Em um estudo de OLUSI et al. (2002), a atividade da glutathione peroxidase em obesos estava reduzida se comparada com não obesos, bem como em outro estudo desenvolvido por OZATA et al. (2002). Tais dados demonstram um consumo de grupamentos tióis no combate à superprodução de radicais livres e EROS produzidos no estresse oxidativo.

### **2.3 Obesidade e Inflamação**

A obesidade vem sendo considerada um estado inflamatório crônico (KOPP et al., 2003) marcado pela secreção, a partir dos adipócitos, de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a IL-6. A inflamação é caracterizada por esta produção de citocinas bem como de PCR, e do aumento da contagem e atividade dos leucócitos (VINCENT et al., 2006). Assim, com o excesso de tecido adiposo, há uma elevação na secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 que exacerbam a produção de PCR no fígado (MAACHI et al., 2004). As moléculas inflamatórias estimulam também a expressão de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), promovendo a ligação e migração de monócitos para as paredes vasculares, onde se convertem em macrófagos para participar do processo inflamatório (LYON et al., 2003). Os monócitos contribuem para o desenvolvimento de estresse oxidativo, produzindo EROS ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $ONOO^-$ , ácido hipocloroso) e MPO. Já quando se transformam em macrófagos, reforçam o estado inflamatório gerando interleucinas e TNF- $\alpha$  (GARG et al., 2000). A alta contagem dos leucócitos e da enzima MPO são poderosos preditores de eventos cardiovasculares (LIPINSKI, 2001). Devido ao fato da obesidade consistir em uma constante ativação de citocinas, EROS, macrófagos e interleucinas, a inflamação decorrente (Figura 2) é responsável pelo desenvolvimento de processos ateroscleróticos, doenças cardiovasculares e trombose (KOPP et al., 2003).

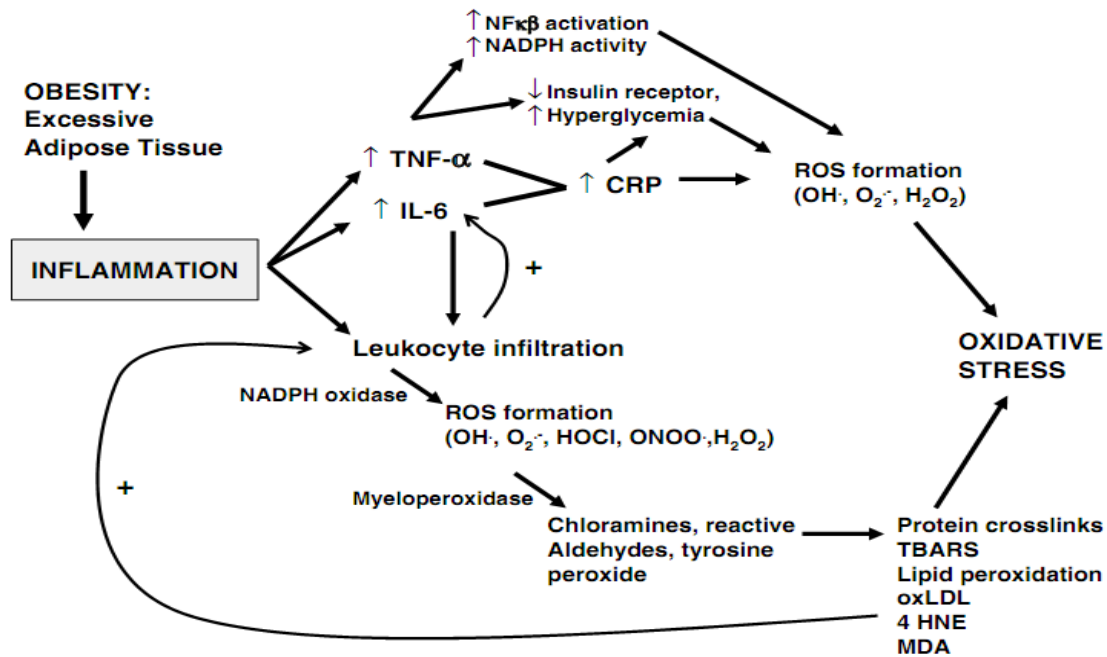


Figura 2 – Mecanismos inflamatórios que induzem o estresse oxidativo na obesidade: aumento de adipócitos e infiltração leucocitária (o símbolo + significa aumento do estresse oxidativo) (Reproduzido de VINCENT et al., 2006).

### 2.3.1 Marcadores de Inflamação

#### 2.3.1.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa

O TNF- $\alpha$  é secretado pelos leucócitos (macrófagos, monócitos e linfócitos) e adipócitos e seu principal efeito fisiológico é a ativação de mais leucócitos para áreas de inflamação, como também, promoção da vasodilatação e secreção de citocinas de ação quimiotática para um processo inflamatório local (ABBAS et al., 1994). Há evidências que o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão das células de adesão endotelial, prejudicando assim a transdução do sinal da insulina e sua expressão nos receptores, e levando indiretamente a um desequilíbrio no metabolismo da glicose com eventual destruição de células beta do pâncreas e resistência à insulina (WEYER et al., 2002). Na obesidade o TNF- $\alpha$  estimula a lipólise e inibe a enzima lipase lipoprotéica (MAEDA et al., 2001), contribuindo para o aumento de FFA e conseqüentemente elevação dos níveis de IL-6. Estudos como o de SOLA et al. (2009) demonstram que níveis aumentados de TNF- $\alpha$  são vistos em pacientes obesos, evidenciando altos níveis também de citocinas inflamatórias nesta população.

### 2.3.1.2 Interleucina-6

Outra citocina presente na obesidade é a IL-6, secretada pelos leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e também pelos adipócitos, que contribuem com cerca de 15 a 30% do total circulante (MOHAMED-ALI et al., 1997). Juntamente com o TNF- $\alpha$ , a IL-6 em grandes quantidades é responsável pelo estímulo à secreção de PCR pelos hepatócitos e regula outras citocinas como a interleucina-1 e o próprio TNF- $\alpha$  (FILHO et al., 2003). Tal citocina participa, além das respostas inflamatórias, também nas respostas imunes, estando em níveis elevados em doenças auto-imunes. No diabetes tipo 1, por exemplo, é sugerido que sua expressão elevada possa induzir a diferenciação da célula beta pancreática, contribuindo para o estabelecimento de tal patologia (ISHIHARA et al., 2002). Os níveis de IL-6 estão aumentados principalmente em situações como infarto do miocárdio, angina instável e mesmo em intervenções percutâneas coronarianas, sendo por isto considerado como bom marcador inflamatório de aterosclerose (FILHO et al., 2003). Na obesidade e na síndrome metabólica também há elevação dos valores de IL6, que pode ser revertida com redução de peso e exercícios físicos (CARVALHO et al., 2006).

### 2.3.1.3 Proteína C-Reativa

O TNF- $\alpha$  e a IL-6 contribuem para a ativação da PCR, uma proteína que, além de participar da resposta inflamatória, também ativa o sistema complemento, modula a ativação plaquetária e remove restos celulares. A PCR também está implicada na estimulação da produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  pelos monócitos e essa produção aumentada serve como um mecanismo para sua contínua produção pelo fígado (ARROYO-ESPLIGUERO et al., 2009). Um estudo epidemiológico demonstrou que níveis de PCR têm sido um forte preditor independente de disfunção endotelial, futura disfunção do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial e morte vascular em indivíduos sem doença cardiovascular conhecida (PASCERI et al., 2000). Em recente estudo realizado com pacientes hipercolesterolêmicos, foram relatadas correlações positivas entre a PCR e LDL oxidado, anticorpos anti-LDL oxidado, triglicérides e IMA, sugerindo que elevados valores de colesterol estão associados aos marcadores oxidativos e inflamatórios, como a PCR (DUARTE et al., 2009). A obesidade também evidenciou a elevação nos níveis de PCR, devido ao próprio excesso de adipócitos estimular sua produção (PAIVA et al., 2006). A PCR é associada positivamente com a elevação de níveis de F2-isoprostano e marcadores pró-trombóticos em obesos, sugerindo que

a obesidade além de um estado crônico de inflamação, também é um estado de estresse oxidativo e de ativação plaquetária (DAVI et al., 2002).

#### 2.3.1.4 Moléculas de Adesão Endotelial

No estado inflamatório, moléculas de adesão endotelial também são expressas através do estímulo de citocinas e células endoteliais. A ICAM-1 e a VCAM-1 são dois membros da superfamília das imunoglobulinas que possuem um papel importante, mas diferente na adesão de células sanguíneas ao endotélio vascular (POSTADZHIYAN et al., 2008). Tais moléculas estão presentes tanto na obesidade quanto no diabetes, exercendo um papel importante em complicações macrovasculares e microvasculares, incluindo a própria retinopatia diabética. (MATSUMOTO et al., 2002).

### 2.4 Obesidade e disfunção endotelial

O endotélio, em condições normais, regula a vasodilatação, fornece uma superfície lisa para a circulação de leucócitos e inibe a proliferação do músculo liso vascular, a agregação plaquetária e a formação de trombos. Já em condições patológicas, como na aterosclerose, o endotélio emite sinais para a redução da biodisponibilidade de NO, um importante vasodilatador (BREVETTI et al., 2008). Tanto o NO quanto o vasoconstritor endotelina são substâncias fundamentais para o bom funcionamento vascular. No entanto, fatores de risco cardiovascular, inflamação, alteração nas forças hemodinâmicas e estresse oxidativo podem prejudicar as células endoteliais e causar disfunção endotelial (VERMA et al., 2002). O estresse oxidativo é um dos grandes contribuintes para tal estado, pois nas células endoteliais há enzimas que produzem substâncias oxidantes responsáveis pela redução da vasodilatação. Dentre elas estão a NADPH oxidase que gera uma grande quantidade de  $O_2^-$  e reduz a biodisponibilidade de NO (pois este se liga ao  $O_2^-$ , produzindo  $ONOO^-$ ), a xantina óxido redutase e a NO sintase (CAI et al., 2000). Também altos níveis hormonais de angiotensina-II podem contribuir para a disfunção endotelial. Na hipertensão há elevação de angiotensina-II que estimula o estresse oxidativo diretamente nos vasos por vários mecanismos: aumento nos níveis de  $O_2^-$  vascular (principalmente pela ativação de NADPH oxidase), aumento da expressão de NADPH oxidase nas proteínas trans-membrana, produção de  $H_2O_2$  nas células endoteliais e aumento da captação de LDL pelos macrófagos, o que leva ao aumento da oxidação lipídica e dano oxidativo (MARITIM et al., 2003). Na obesidade a hipertensão é

uma comorbidade bastante presente, sendo que os mecanismos de indução de estresse oxidativo no endotélio, com a conseqüente elevação dos níveis de angiotensina-II estão apresentados na figura 3.

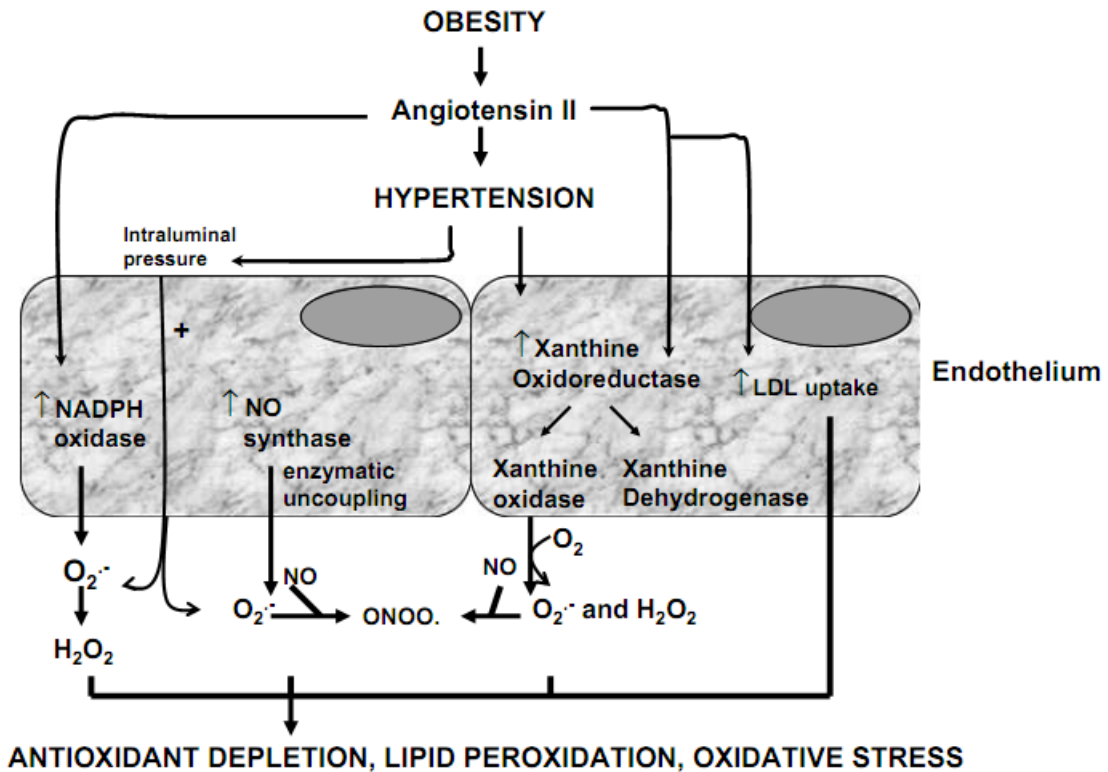


Figura 3 – Mecanismos de indução de estresse oxidativo no endotélio. Elevação dos níveis de angiotensina II e conseqüente hipertensão (Reproduzido de VINCENT et al., 2006).

#### 2.4.1 Marcadores de Disfunção Endotelial

##### 2.4.1.1 Óxido Nítrico

O NO é uma importante molécula anti-aterogênica e mediadora de diversas funções como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, atividades anti-tumorais e antimicrobianas e de neurotransmissão (DUSSE et al., 2005) Sua formação é catalisada por uma família de isoenzimas óxido nítrico sintase (MIRANDA et al., 2001), podendo reagir com ERO e moléculas biológicas para formar vários produtos, dentre eles o nitrato e nitrito (NOx) que são mensurados em análises quantitativas (ROMITELLI et al., 2007; TATSCH et al., 2011). Em pequenas quantidades o NO possui papel anti-aterosclerótico regulando o tônus vascular, inibindo a ativação plaquetária, a adesão leucocitária e a peroxidação lipídica. No entanto, sua superprodução pode causar danos às células endoteliais, principalmente devido



ao estresse oxidativo exercido por ele (HAYASHI et al., 2004). Além do estresse oxidativo, a inflamação também está associada à obesidade, sendo ambos responsáveis pela redução da biodisponibilidade do NO, podendo afetar seu papel vasodilatador e levar a processos ateroscleróticos (MATHER et al., 2004; GRUBER et al., 2008). Em recente estudo GRUBER et al. (2008) demonstrou uma correlação negativa entre NOx e o LDL oxidado em pacientes obesos, ressaltando a redução da biodisponibilidade de NO. O estresse oxidativo que, neste estudo foi responsável por níveis reduzidos de NO, contribui para o aparecimento de disfunção endotelial e aterogênese.

#### 2.4.1.2 Albumina Urinária

O endotélio glomerular produz uma quantidade de vasodilatadores (NO e a prostaciclina) que agem na microcirculação renal permitindo uma perfusão sanguínea adequada para a estrutura do néfron. No entanto, quando há disfunção endotelial (devido ao estresse oxidativo ou à inflamação) ou hemodinâmica, hipertensão intra-glomerular ou dano aos podócitos, ocorre a albuminúria. Tal fenômeno nada mais é do que a passagem da proteína plasmática albumina pela barreira de filtração glomerular dos podócitos para a urina (FUTRAKUL et al., 2009), sendo influenciada por fatores genéticos e ambientais (MOTTIL et al., 2009). O estresse oxidativo e a inflamação provocam uma disfunção no endotélio glomerular reduzindo as cargas negativas de superfície que aumentam a permeabilidade capilar da albumina, induzindo a albuminúria. A albumina urinária é considerada um marcador de dano endotelial (FUTRAKUL et al., 2009), renal e também um fator de risco cardiovascular (STEHOUWER et al., 2006). Na obesidade há infiltração de lipoproteínas aterogênicas para o endotélio glomerular e das células mesangiais, iniciando uma cascata de eventos que incluem estresse oxidativo com produção de EROS e inflamação, marcada pela expressão de moléculas de adesão e monócitos (KAMANNA et al., 1998). No estudo de TAMBA et al. (2010) houve a demonstração de que o acúmulo de gordura visceral está associado com o aumento da excreção de albumina urinária. Já SCAGLIONE et al. (1995) evidenciou a presença mais frequente da albumina urinária em pacientes obesos do que em magros.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre biomarcadores oxidativos, inflamatórios e endoteliais em pacientes obesos, a fim de propiciar a melhor compreensão do envolvimento destes processos na fisiopatologia da obesidade.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o comportamento de alguns marcadores associados ao estresse oxidativo (MDA, IMA, AOPP e –SH) em indivíduos obesos, com sobrepeso e em controles saudáveis.
- Avaliar os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 nos indivíduos obesos, com sobrepeso e em controles saudáveis.
- Determinar os níveis de marcadores laboratoriais relacionados à disfunção endotelial (NO e albuminúria) nos indivíduos incluídos nesse estudo.
- Investigar o comportamento de biomarcadores lipídicos e glicêmicos, bem como a prevalência de diabetes *mellitus* e hipertensão, nos indivíduos incluídos nesse estudo.

## 4 MANUSCRITOS

O estudo da associação entre biomarcadores oxidativos, inflamatórios e de dano endotelial na obesidade fez com que um artigo fosse publicado, e outro submetido, ambos em revistas internacionais relacionadas ao assunto.

### 4.1 Manuscrito I

Clinical Biochemistry 2011, 44:345-347

Short Communication

#### **Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in obesity**

Sílvia J. Piva<sup>a,b</sup>, Marta M. M. F. Duarte<sup>c</sup>, Ivana B. M. Da Cruz<sup>d,e</sup>, Adriane C. Coelho<sup>f</sup>, Ana Paula L. Moreira<sup>b</sup>, Raquel Tonello<sup>e</sup>, Solange C. Garcia<sup>d,g</sup>, Rafael N. Moresco<sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>f</sup>Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>g</sup>Laboratório de Toxicologia, Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**\*Corresponding author:** Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1216, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

## **ABSTRACT**

**Objective:** We evaluated the levels of ischemia-modified albumin (IMA) and its association with body mass index (BMI) in patients who are obese.

**Design and methods:** Fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, malondialdehyde, and IMA levels were assessed in 148 subjects.

**Results:** IMA, malondialdehyde, and fasting glucose levels were significantly higher while the HDL cholesterol levels were lower in obese population.

**Conclusions:** IMA levels increase in overweight and obese subjects.

**Keywords:** Human serum albumin, obesity, oxidative stress.

## 1. Introduction

Obesity is a chronic metabolic disorder considered an important risk factor leading to the development of health problems, such as diabetes, hypertension, high cholesterol, stroke, some kinds of cancers, and arthritis [1]. It is known that these problems have increased in the world population recently. A recent study in the United States has demonstrated evidence to support this increasing trend by showing that nearly 30% of the American population is obese, with a significant variation regarding racial and ethnic groups [2]. The excess of adipose tissue, determined by the body mass index (BMI), releases several products such as unesterified fatty acids, cytokines, plasminogen activator inhibitor-1, and adiponectin, which probably exacerbate some associated conditions such as insulin resistance, dyslipidemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease [3]. Such conditions are possible mechanisms that generate oxidative stress in obesity [4]. Bad eating habits, sedentary lifestyle, and stressful life exacerbate this state of imbalance between the free radicals and the antioxidant defenses contributing to the structural function changes of some proteins, such as the human serum albumin (HSA), which plays a vital role in the efficient antioxidant defense of the organism [5].

Overproduction of free radicals may modify the N-terminal region of HSA generating ischemia-modified albumin (IMA), a sensitive marker of ischemia that is also increased in diseases associated with obesity, such as hypercholesterolemia [6], type 2 diabetes [7], metabolic syndrome [8], and higher amounts of free fatty acids (FFA) in the body [9]. According to Duarte et al. [6], IMA appears to play the role of an oxidative stress biomarker.

Therefore, due to the fact that obesity and oxidative stress belong to an associated event, and based on the fact that albumin may be modified in situations associated with oxidative stress, the aim of this study was to evaluate the levels of the novel marker IMA in patients with obesity as well as its association with BMI.

## 2. Methods

This study included 148 volunteers enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The subjects were divided into three groups, according to their BMI (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared) rounded to the nearest tenth. BMI exposure groups were based on standard clinical definitions: normal weight 18.5–24.9 kg/m<sup>2</sup>; overweight 25.0–29.9 kg/m<sup>2</sup> and obese  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Patients on statin therapy were excluded from this study. All eligible subjects provided informed written consent and all studies were conducted in accordance with guidelines approved by the local research ethics committee (number: 0199.0.243.000-07).

Blood samples were drawn by venipuncture technique into Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride (gray top tubes), EDTA (purple top tubes) or no anticoagulant (red top tubes). Blood specimens in red top tubes were allowed to clot for 60 min. Blood specimens were routinely centrifuged for 15 min at 1500 g, and aliquots of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 2 weeks before measurement of IMA levels. Plasma was used to measure the levels of fasting glucose, while the fresh serum was used to assess the levels of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides. All analyses were performed at Cobas Mira (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer using standard methods. LDL cholesterol was estimated by the use of Friedewald equation [10]. Serum IMA was measured by a colorimetric cobalt-albumin binding analysis previously described [7]. Blood specimens collected with EDTA were used to analyze plasma malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation. Samples were placed on ice and centrifuged at 1500 x g for 15 minutes at 4°C, and plasma MDA levels were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) with visible detection as previously described [11].

Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). Categorical data were summarized as percentages, and comparisons among groups were performed with Chi-squared test. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test were used to determine statistical differences among the BMI groups. Pearson correlation was assessed to evaluate the association between IMA and BMI. Statistical significance was assumed at  $P < 0.05$ . Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3. Results

Fasting blood glucose and MDA levels were significantly higher in the obese population (Table 1). HDL cholesterol levels were lower in the obese population. No significant differences were observed for total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides in the studied population. Serum IMA levels were significantly higher in overweight and obese subjects, as shown in Figure 1. A significant correlation between IMA and BMI was observed ( $r = 0.340$ ,  $P < 0.001$ ).

Please add **Table 1** here

Please add **Figure 1** here

### 4. Discussion

Obesity is a chronic state that is related with the free radical production through diverse pathways. Hyperglycemia, increased muscle activity, inadequate antioxidant defenses, lipid oxidizability, chronic low-grade inflammation, hypertension, and hyperleptinemia are some possible contributors to the oxidative stress in obesity [4]. IMA has not been previously correlated directly with oxidative stress in obesity, and according to findings, it seems a possible marker of this state. We have previously reported the increase of IMA in metabolic

syndrome [8]. However, to the best of our knowledge, this is the first report assessing the role of IMA as a marker of oxidative stress in obesity and its association with BMI.

The obese subjects in our study have showed higher levels of glucose, IMA, and MDA. Hyperglycemia is related with the advanced glycosylation end products formed from proteins, lipids, and nucleic acids that bind with specific cell surface receptors, generating radical oxidative species [4]. These free radicals affect the albumin ability to combine with metals such as cobalt, and may promote an increase of IMA levels [7]. Lipid peroxidation often occurs in response to enhanced oxidative stress, and MDA is one of the low-molecular weight end products formed via decomposition of certain primary and secondary products of cell membrane injury due to lipid peroxidation.

It is known that HSA is the primary binder of fatty acids, commonly known as FFA, and that plasma concentrations of such acids are increased in obesity. Bhagavan et al. [9] described that changes in IMA values during acute muscular heart tissue necrosis are likely to be caused by reversible conformational changes in HSA associated with FFA fluxes.

In summary, IMA levels were elevated in obesity associated with oxidative stress and FFA fluxes. Thus, we postulate that free radicals and FFA fluxes may modify the HSA and increase the IMA levels in overweight and obese subjects. However, further studies including other oxidative stress markers such as dityrosine, advanced oxidation protein products, and 15-F2t-isoprostane are required to investigate associations between IMA and other markers, such as its clinical potential for application as an oxidative stress biomarker in the obese population.

#### **Conflicts of interest statement**

None of the authors have conflicts of interest to declare.

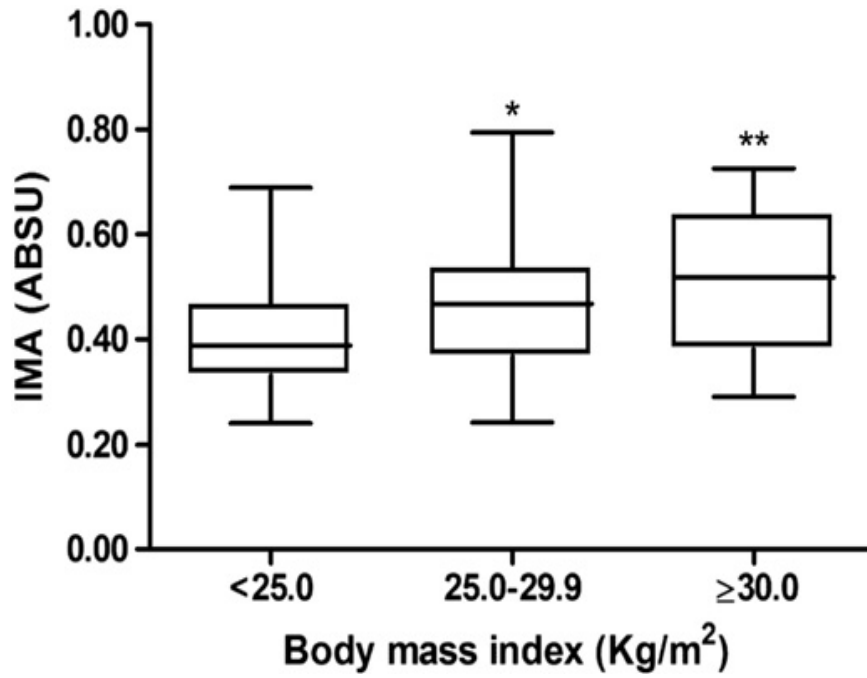


## References

- [1] Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM* 2006;99:565-79.
- [2] Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US Adults, 1999-2008. *JAMA* 2010;303:235-41.
- [3] Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-8.
- [4] Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obesity* 2006;30:400-18.
- [5] Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 1999;13:233-44.
- [6] Duarte MMMF, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL, Schetinger MR. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009;42:666-71.
- [7] Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JA, Da Silva DB, Becker AM, Coelho AC, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43:450-4.
- [8] Valle MG, Da Cruz IB, Duarte MM, Moresco RN, Wiehe M, Schwanke CHA, et al. Associations among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidatives, and lipids biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:586-91.
- [9] Bhagavan NV, Ha JS, Park JH, Honda SA, Rios CN, Sugiyama C, et al. Utility of serum fatty acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction and their potential role in the formation of ischemia- modified albumin: a pilot study. *Clin Chem* 2009; 55:1588-90.

[10] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of lowdensity lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972;18:499-502.

[11] Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. J Pharm Biomed Anal 2007;43:619-24.



**Figure 1.** Serum ischemia-modified albumin (IMA) levels in study population. \*\*P<0.001 and \*P<0.05 compared to normal subjects (BMI <25.0 Kg/m<sup>2</sup>).

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

	<b>BMI</b>	<b>BMI</b>	<b>BMI</b>
	<b>&lt;25.0 Kg/m<sup>2</sup></b>	<b>25.0-29.9 Kg/m<sup>2</sup></b>	<b>≥30 Kg/m<sup>2</sup></b>
N	75	43	30
Age (years)	52.3 ± 12.1	55.2 ± 13.0	55.0 ± 11.7
Male (n)	35	18	14
Type 2 diabetes (n)	14	25**	22**
Glucose (mmol/L)	5.4 ± 2.7	6.0 ± 2.5	7.8 ± 3.7**†
Total cholesterol (mmol/L)	5.3 ± 1.7	5.4 ± 1.8	4.8 ± 1.2
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.4*
LDL cholesterol (mmol/L)	3.3 ± 1.4	3.5 ± 1.6	3.0 ± 1.2
Triglycerides (mmol/L)	1.7 ± 1.4	1.4 ± 0.9	1.6 ± 0.7
Malondialdehyde (μmol/L)	9.3 ± 2.4	10.8 ± 2.9	11.5 ± 2.6*

Data are expressed as means ± SD or number of patients. BMI, Body mass index.

\*\*P<0.001, \*P<0.05 compared to normal group (BMI <25.0 Kg/m<sup>2</sup>).

†P<0.05 compared to overweight group (BMI 25.0-29.9 Kg/m<sup>2</sup>).

## 4.2 Manuscrito II

*Submetido para publicação no periódico Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

### **Assessment of oxidative, inflammatory, and endothelial biomarkers in obesity**

Sílvia J. Piva<sup>1,2</sup>, José A. M. De Carvalho<sup>1,2</sup>, Etiane Tatsch<sup>1,2</sup>, Renata S. Pereira<sup>1,2</sup>, Guilherme V. Bochi<sup>1,3</sup>, Helena Kober<sup>1</sup>, Ivana B. M. Da Cruz<sup>3</sup>, Marta M. M. F. Duarte<sup>4</sup>, Thiago Duarte<sup>1</sup>, Adriane C. Coelho<sup>5</sup>, Rafael N. Moresco<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>5</sup> Associação dos Diabéticos e Hipertensos de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

**Running title:** Oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in obesity

**\*Corresponding author:** Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1402, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

Number of words of the manuscript (excluding Abstract, References): 1858

Number of references: 29

Number of Tables/Figures: 1 Table / 2 Figures

Declaration of Interest: There are no conflicts of interest to declare.

## **Abstract**

*Background:* The aim of this study was evaluate the oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers levels in obese subjects and its association with body mass index (BMI), in order to investigate the role of these biomarkers in the obesity.

*Methods:* Fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, APO A, APO B, urinary albumin, creatinine, glomerular filtration rate, IMA, -SH, AOPP, IL-6 and NOx were measured in 155 subjects divided according to different BMI.

*Results:* Fasting glucose, IMA, AOPP, IL-6 and urinary albumin levels were significantly higher in obese patients. The levels of NOx, however were significantly lower in this population.

*Conclusions:* We have shown an increase of IMA, AOPP, IL-6, and urinary albumin, combined with lower levels of NOx in obese patients, suggesting a possible interplay of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction state in the obesity.

**Keywords:** Oxidative stress; Inflammation; Endothelial dysfunction; Obesity.

## 1. Introduction

Obesity has been spread around the world as a chronic metabolic disorder. According to a recent study, the prevalence of obesity in the United States continues high, exceeding 30% of American population in different sex and racial groups (1). The excess of adipose tissue, determined by the body mass index (BMI), releases several products such as unesterified fatty acids, cytokines, plasminogen activator inhibitor-1, and adiponectin which probably exacerbate some associated conditions (2). Insulin resistance, dyslipidaemia, hypertension and cardiovascular disease are some of these conditions that are possible contributors to the oxidative stress in obesity (3). Oxidative stress is associated with the damage of biological structures by reactive oxygen species (ROS) excessive generation and by the deficiency of antioxidant defense mechanisms (4). Overproduction of ROS may modify the N-terminal region of the human serum albumin, which plays a vital role in the efficient antioxidant defense of the organism (5). This change results in ischemia-modified albumin (IMA), a sensitive marker of ischemia that is also increased in obese and overweight population, associated to free fatty acid fluxes (6).

The attack of ROS also modifies proteins and amino acids whose results are some products known as advanced oxidation protein products (AOPP), considered reliable markers of oxidative stress-induced tissue damage (7). AOPP have some advantages in comparison with other markers because of their relatively early formation, greater stability and reliability, as well as their longer life span (8). AOPP seem to be increased in patients suffering from obesity and diabetes (9). Plasma thiol group (-SH) serves as antioxidant scavenging oxidants that initiate peroxidation, and is quantitatively the major manifestation of oxidative protein damage (10).

In particular, reports indicate that oxidative stress is responsible for the increase of the expression of proinflammatory cytokines, chemokines and cell adhesion molecules (11),

evidencing an inflammatory state. A key regulator of the inflammatory response is the interleukin-6 (IL-6), which stimulates synthesis acute phase proteins including C-reactive protein and fibrinogen (12). The increase of obesity can also be related with endothelial dysfunction and consequently with an increase of urinary albumin excretion, which is known as a kidney failure marker, and more recently as a marker for generalized endothelial dysfunction (13), as well as a prognostic for cardiovascular risk in both diabetic and non-diabetic subjects (14). Besides the urinary albumin, the nitric oxide (NO) also plays a central role in the pathogenesis of endothelial cell dysfunction when imbalanced. Superoxide produced in the vascular wall may inhibit NO-mediated endothelial function by reacting with NO, forming peroxynitrite, a cytotoxic substance (15). It has been hypothesized that obesity-related oxidative stress reduces the bioavailability of NO (16), resulting in an impairment of endothelium-dependent vasodilatation, promoting atherosclerosis.

Thus, considering the fact that obesity is a chronic state that involves diverse pathways such as oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction, the aim of this study was to assess the levels of oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in obese subjects as well as their associations with BMI.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Study population*

This study included 155 volunteers (65 men and 90 women) enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil from May to July 2010. The subjects were divided into three groups according to their BMI (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared). BMI exposure groups were based on standard clinical definitions: normal weight (18.5–24.9 kg/m<sup>2</sup>); overweight (25.0–29.9 kg/m<sup>2</sup>), and obese ( $\geq 30.0$  kg/m<sup>2</sup>). Exclusion criteria to avoid unpredictable confounding were history of malignancy, acute illness, fever, and



infectious or liver diseases. All eligible subjects provided informed written consent and this protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 0198.0.243.000-09).

## 2.2. Laboratory assays

Blood samples were drawn after 12h overnight fasting by venipuncture technique in Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA (gray top tubes), EDTA (purple top tubes) or no anticoagulant (red top tubes). Blood specimens in the red top tubes were allowed to clot for 60 min. Blood specimens were routinely centrifuged at 2500 x g for 15 min and aliquots of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 2 weeks before measurement of IMA levels. Plasma with sodium fluoride plus EDTA was used for the measurement of fasting glucose, while plasma with EDTA was used for the measurement of AOPP and thiol groups (-SH). Serum was used to assess the levels of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, apolipoprotein A (Apo A), apolipoprotein B (Apo B), IL6, nitrate/nitrite (NO<sub>x</sub>), and IMA. All subjects also collected an early morning urine sample for the assessment of creatinine and urinary albumin. The results of urinary albumin were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine as a tool to match the levels of albumin in accordance with the concentration of urine (17).

All assays, except IL-6 and plasma -SH, were performed at Cobas Mira (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer using standard methods. AOPP levels were measured as previously described by Selmeçi et al. (18). Serum IMA was measured by colorimetric assay based on biochemical properties of albumin to bind exogenous cobalt as previously described (19). NO<sub>x</sub> was measured as previously described by Tatsch et al. (20). IL-6 levels were determined by ELISA capture according to the manufacturer instructions (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), and plasma -SH levels were

assayed according to the method previously described by Ellman (21). LDL cholesterol was estimated by the use of Friedewald equation (22), and glomerular filtration rate was estimated by the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula (23).

### *2.3. Statistical analysis*

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M). Categorical data were summarized as percentages, and comparisons among groups were performed with Chi-square test. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test was used to determine statistical differences between the BMI groups. Statistical significance was assumed at  $P < 0.05$ . Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## **3. Results**

Baseline characteristics of study participants are described in Table 1. The obese group had significantly higher levels of fasting glucose and the highest proportion of hypertension and diabetes mellitus subjects. No significant differences were observed for total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, Apo A, Apo B and GFR in the studied population. AOPP levels in both obese and overweight subjects were significantly higher, while IMA levels were higher only in the obese group, as shown in Fig. 1. No significant differences were observed for -SH group. IL-6 levels were significantly higher in both obese and overweight groups. Urinary albumin levels were significantly higher in the obese group, while NOx levels were significantly lower in this group, as shown in Fig. 2.

**Please add the Table 1 here**

**Please add the Figure 1 here**

**Please add the Figure 2 here**

#### 4. Discussion

Obesity is a chronic metabolic disorder considered an important risk factor leading to the development of health problems, such as diabetes, hypertension, high cholesterol, stroke, some kinds of cancers, and arthritis (24). We described in this study an association between oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction and some of their biomarkers in obese population.

Obesity is related with the oxidative stress through diverse ways, such as hyperglycemia, increased muscle activity, inadequate antioxidant defenses, lipid oxidizability, chronic low-grade inflammation, and hypertension (3). In our study a higher percentages of diabetic and hypertension subjects in the obese population were observed. Hyperglycemia is one of the most important producers of ROS from proteins, lipids, and nucleic acids (3). One of the proteins modified is the human serum albumin that plays a vital role as antioxidant. This change increased the IMA levels, especially in the obesity groups, which is in agreement with a previous study performed by our team (6). We also observed higher levels of AOPP in overweight and obese subjects. AOPP are formed during oxidative stress by the reaction of plasma protein with chlorinated oxidants (25), and have been suggested as a measure of highly oxidized proteins, especially albumin (18).

The overproduction of ROS is responsible for the increase of the expression of proinflammatory cytokines, chemokines and cell adhesion molecules (11). One possible mechanism of the proinflammatory state is that adipocytes in obese patients release high amounts of IL-6 into the circulation that stimulates the liver production of C-reactive protein and induces insulin resistance (26), as we had evidenced in our results through the higher IL-6 levels. However, there are some antioxidants such as plasma -SH that act against the formation of ROS, with the important role of keeping the cellular oxidation-reduction balance. In obesity there is an increase of protein carbonyl and a decrease of plasma -SH that

can be a possible mechanism contributor to atherosclerosis, insulin resistance and hypertension (27). However, in our study plasma –SH levels were not significantly different. Plasma –SH may show a defense mechanism thus other antioxidants such as ascorbic acid, alpha-tocopherol, superoxide dismutase and catalase can play the role of antioxidants. Thus, our results point to the fact that probably other antioxidants, but not just plasma –SH isolated, could be present and important in obesity.

Oxidative stress is associated with inflammation and consequently with endothelial dysfunction, well characterized by the urinary albumin, which, in general, is a result from three mechanisms that involve glomerular endothelial dysfunction, intraglomerular hypertension and hemodynamic maladjustment, and podocyte injury (13). Increased urinary albumin excretion rate, even in the range of early microalbuminuria, is associated with atherosclerotic risk factors such as hypertension, dyslipidemia and obesity (28). As we observed in the results, urinary albumin levels were higher in obese subjects evidencing a possible endothelial damage. Another marker related to endothelial dysfunction is the NO that is a potent regulator of vasomotor tone and an important anti-atherogenic molecule. These anti-atherogenic effects include the regulation of endothelium-dependent vasodilatation, inhibition of smooth muscle cell proliferation, and modulation of cellular interactions by inhibiting cell adhesion (29). However, obesity decreases the bioavailability of NO, probably due to the fact that oxidative stress induced a decrease in NOx. Superoxide produced in the vascular wall may inhibit NO-mediated endothelial function by reacting with NO and producing peroxynitrite, a cytotoxic substance (15). In our study NOx levels were lower in the obese population, fact that is in agreement with some previous studies (15, 16).

In conclusion, the present study demonstrates that higher concentrations of IMA, AOPP, IL-6, and urinary albumin, combined with lower levels of NOx are associated with obesity. Therefore, we can suggest that obesity promotes the raise of oxidative stress,

inflammation and endothelial dysfunction. However, further studies are required to assess the interplay of different mechanisms related to obesity, as well as the clinical applicability of these biomarkers in a larger population.

### **Conflict of Interest**

None declared.

### **Acknowledgments**

The authors thank Biotécnica (Varginha, MG, Brazil) for providing biochemical reagents.

### **References**

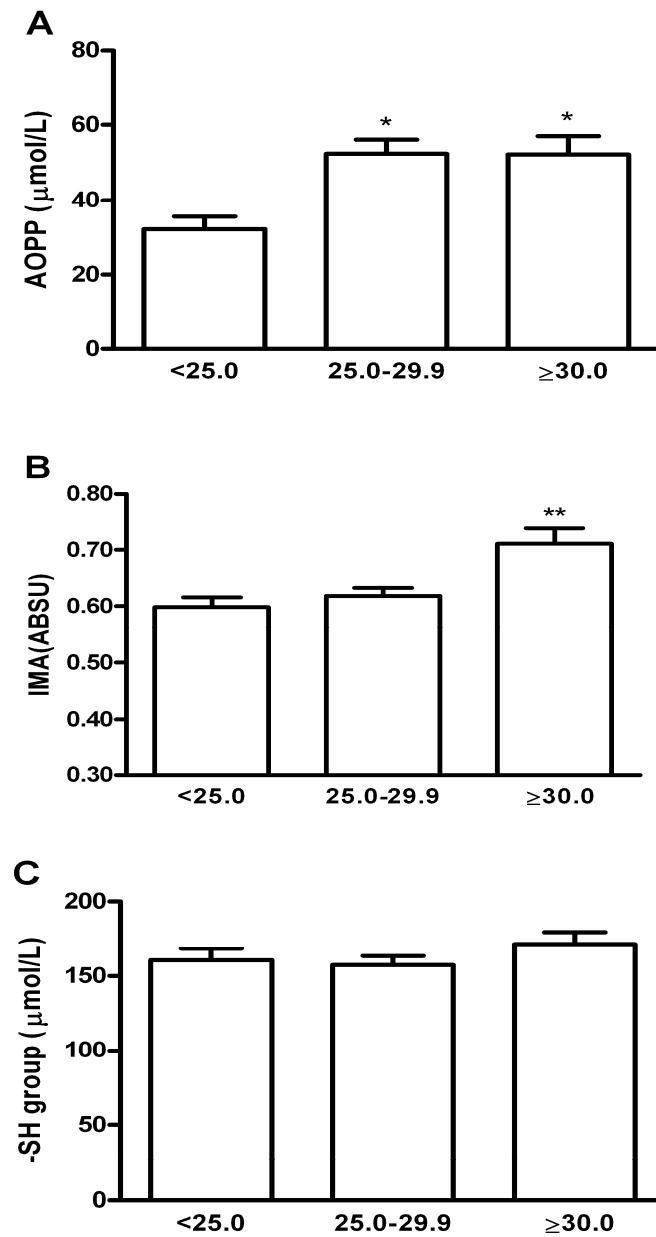
1. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010;303:235-41.
2. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-8.
3. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obesity* 2006;30:400-18.
4. Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008;41:1162-7.
5. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 1999;13:233-44.
6. Piva SJ, Duarte MMF, Da Cruz IB, Coelho AC, Moreira AP, Tonello R, et al. Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in obesity. *Clin Biochem* 2011; 44:345-7.

7. Koçak H, Oner-Iyidoğan Y, Gürdöl F, Oner P, Süzme R, Esin D, et al. Advanced oxidation protein products in obese women: its relation to insulin resistance and resistin. *Clin Exp Med* 2007;7:173-8.
8. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23-38.
9. Atabek ME, Keskin M, Yazici C, Kendirci M, Hatipoglu N, Koklu E, et al. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *Eur J Pediatr* 2006;165:753-6.
10. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58:2571-8.
11. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-34.
12. Lowe GDO, Rumley A, McMahon AD, Ford I, O'Reilly DS, Packard CJ. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors VII and XIIa in prediction of coronary heart disease. *Arterios Thromb Vasc Biol* 2004;24:1529-34.
13. Futrakul N, Sridama V, Futrakul P. Microalbuminuria—a biomarker of renal microvascular disease. *Ren Fail* 2009;31:140-3.
14. Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, et al. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation* 2002;106:1777-82.
15. Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* 2004;11:89-97.
16. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Chayama K, Oshima T. Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14:1038-45.

17. Newman DJ, Pugia MJ, Lott JA, Wallace JF, Hiar A. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. *Clin Chim Acta* 2000;294:139-55.
18. Selmeçi L, Seres L, Antal M, Lukács J, Regöly-Mérei A, György A. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:294-7.
19. Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JA, Da Silva DB, Becker AM, Coelho AC, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43:450-4.
20. Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, Kober H, Agertt VA, Campos MMA, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 2011;44:348-50.
21. Ellman GS. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
22. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
23. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70.
24. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM* 2006;99:565-79.
25. Kelly C, Speirs A, Gould F, Petrie J, Lyall H, Connell J. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:742-6.
26. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997;40:1286-92.

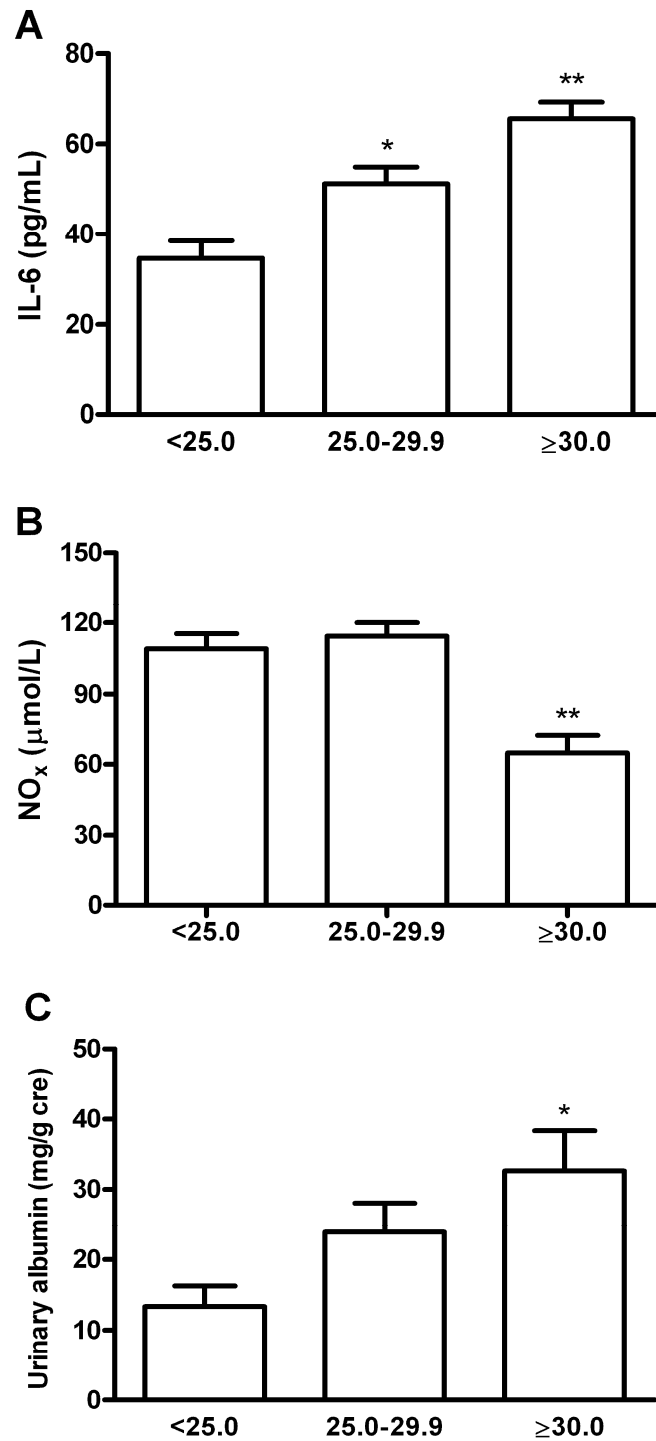
27. Uzun H, Konukoglu D, Gelisgen R, Zengin K, Taskin M. Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2007;17:1367-73.
28. Tseng CH. Differential dyslipidemia associated with albuminuria in type 2 diabetic patients in Taiwan. *Clin Biochem* 2009;42:1019-24.
29. Elahi MM, Naseem KM, Matata BM. Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. *FEBS J* 2007;274:906-23.



**Figure 1**

**Figure 1.** The values of AOPP (A), IMA (B), and -SH group (C) in study population, expressed as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05 and \*\*P<0.001 compared to normal subjects (BMI <25.0 kg/m<sup>2</sup>).

Figure 2



**Figure 2.** The values of IL-6 (A), NO<sub>x</sub> (B), and urinary albumin (C) in study population, expressed as mean ± SEM. \*P<0.05 and \*\*P<0.001 compared to normal subjects (BMI <25.0 kg/m<sup>2</sup>)

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

	<b>BMI</b>	<b>BMI</b>	<b>BMI</b>	<b>P-value</b>
	<b>&lt;25.0 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>25.0-29.9 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>≥30.0 kg/m<sup>2</sup></b>	
N	47	75	33	
Age (years)	43.5 ± 2.1	58.1 ± 1.1	59.0 ± 2.4	<0.001
Male (%)	19.1	57.3	39.4	<0.001
Hypertension (%)	2.1	24.1	63.6	<0.001
Diabetes mellitus (%)	6.3	29.3	66.6	<0.001
Smokers (%)	10.6	2.6	12.1	0.111
Glucose (mmol/L)	5.0 ± 0.3	5.6 ± 0.3	6.7 ± 0.5	0.020
GFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	98.3 ± 5.7	97.6 ± 3.0	91.6 ± 4.1	0.577
Total cholesterol (mmol/L)	5.5 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.2 ± 0.1	0.079
LDL cholesterol (mmol/L)	3.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.1 ± 0.1	0.055
HDL cholesterol (mmol/L)	1.2 ± 0.06	1.2 ± 0.03	1.1 ± 0.06	0.175
Triglycerides (mmol/L)	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.333
Apo A (g/L)	1.6 ± 0.04	1.5 ± 0.04	1.6 ± 0.05	0.604
Apo B (g/L)	0.9 ± 0.02	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.05	0.734

Data are expressed as mean ± SEM.

## 5 DISCUSSÃO

A obesidade é uma desordem metabólica crônica marcada por hiperglicemia, baixos níveis de substâncias antioxidantes, oxidação lipídica, inflamação crônica e hiperleptinemia (VINCENT et al., 2006), sendo por si só um importante fator de risco para doenças como diabetes, hipertensão, dislipidemia, infarto, alguns tipos de câncer e artrite (MALNICK et al., 2006). O estresse oxidativo está presente na obesidade, assim como a inflamação e o dano endotelial. Por isto, no Artigo I a IMA foi investigada como possível biomarcador de estresse oxidativo na obesidade. Em artigos prévios a IMA tem sido relacionada com comorbidades decorrentes da obesidade, mas não com ela propriamente dita. Em situações de diabetes, hipercolesterolemia e síndrome metabólica seu aumento foi significativo (PIWOWAR et al., 2008; DUARTE et al., 2009; GOTTLIEB et al., 2010). No artigo em questão os pacientes foram divididos de acordo com IMC (normais, sobrepeso e obesos) e os marcadores IMA e MDA, como também o perfil lipídico e a glicose foram determinados por técnicas previamente testadas. Nos obesos os níveis de glicose, IMA e MDA se elevaram. A hiperglicemia é responsável pelos AGE, substâncias formadas a partir da oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que geram radicais livres e modificam proteínas como a albumina (VINCENT et al., 2006). Tal modificação reduz a capacidade da albumina em se ligar ao cobalto, produzindo altas concentrações de IMA (KAEFER et al., 2010). O estresse oxidativo também afeta os lipídios que sofrem peroxidação com subsequente formação de MDA. Sabendo-se que a albumina é o principal ligante dos FFA, e estes estão aumentados na obesidade, BHAGAVAN et al. (2009) confirmaram uma elevação de IMA associada à elevação de FFA durante a necrose aguda do tecido muscular cardíaco. Assim, os altos níveis de IMA estavam associados ao estresse oxidativo e à elevação dos fluxos de FFA. De acordo com o artigo I, provavelmente os EROS e os FFA modificam a albumina produzindo IMA nos pacientes com sobrepeso e obesos. No entanto, devido ao fato de haver poucos estudos relacionando IMA na obesidade, estudos adicionais são necessários para relacionar outros marcadores (FFA, leptina, TNF- $\alpha$  dentre outros) à obesidade, bem como a associação destes aos níveis de IMA.

No artigo II, além do estado de estresse oxidativo, os estados inflamatórios e de disfunção endotelial foram abordados em uma população previamente classificada de acordo com os valores de IMC. Foi observada uma alta percentagem de diabéticos e hipertensos entre a população obesa. A hiperglicemia é uma das principais fontes de EROS (VINCENT et al.,

2006), sendo responsável pela modificação da albumina e formação de IMA. O aumento de IMA entre os obesos foi constatado, como previamente descrito no artigo I. Altos valores de AOPP também foram evidenciados nos grupos com sobrepeso e obesos, destacando o papel do estresse oxidativo na oxidação de proteínas plasmáticas como a albumina (SELMECI et al., 2005). A superprodução de EROS também eleva a expressão de substâncias inflamatórias como as citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular (LI et al., 2003). Um possível mecanismo deste estado ocorre devido à grande produção de IL-6, responsável pela ativação de PCR no fígado e também pela indução de resistência à insulina (PICKUP et al., 1997). No grupo de obesos foi possível observar altos níveis de IL-6. Para combater o estresse oxidativo e a inflamação, alguns antioxidantes como o -SH são essenciais. Na obesidade há um aumento de proteínas carbonil e redução de -SH, o que pode ser um possível mecanismo contribuinte para a aterosclerose, resistência à insulina e hipertensão (UZUN et al., 2007). No entanto, em nosso estudo tal marcador não apresentou variação significativa entre os grupos, possivelmente pelo fato de outros antioxidantes como ácido ascórbico, alfa-tocoferol, superóxido dismutase e catalase estarem mais atuantes do que os tióis plasmáticos nos pacientes avaliados neste estudo. Além do estresse oxidativo e inflamação, a disfunção endotelial também está presente na obesidade, sendo esta bem caracterizada pela albuminúria, que pode estar associada aos fatores de riscos ateroscleróticos, como hipertensão e dislipidemia (TSENG, 2009). A albumina urinária esteve aumentada nos pacientes obesos, confirmando um possível dano endotelial. O NO atua na manutenção do tônus vascular e apresenta ação anti-aterogênica, sendo também um importante marcador de disfunção endotelial. O superóxido produzido nas paredes vasculares pode inibir a função do NO que reage com o primeiro, formando peróxido nitrito citotóxico (ZOU et al., 2004). Em nosso estudo os níveis de NOx foram inferiores na população obesa, fato em concordância com estudos prévios, uma vez que a obesidade reduz a biodisponibilidade do NO (ZOU et al., 2004; HIGASHI et al., 2001). Sendo assim o artigo II demonstrou que altas concentrações de IMA, AOPP, IL6 e albumina urinária combinadas com baixos valores de NOx estão associados com a obesidade, tal como com o estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial.

## 6 CONCLUSÕES

- Os indivíduos obesos apresentaram níveis (séricos/plasmáticos) mais elevados de MDA, IMA e AOPP em comparação aos demais indivíduos do estudo, o que indica a ocorrência de uma maior oxidação de lipídios e proteínas, especialmente a albumina, na obesidade.
- Altos níveis de IL-6 foram observados no grupo de obesos, evidenciando um estado pró-inflamatório superior ao dos demais grupos.
- Os indivíduos obesos apresentaram uma redução dos níveis séricos de NOx, que reflete uma menor biodisponibilidade do NO, e um aumento da albuminúria, o que pode estar associado a uma maior disfunção endotelial presente neste grupo.
- Foram observadas alterações discretas entre os biomarcadores lipídicos avaliados na população em estudo, incluindo uma redução nos níveis de HDL colesterol no grupo de indivíduos obesos (encontrado apenas no artigo I)
- O grupo de indivíduos obesos apresentou níveis glicêmicos mais elevados em comparação aos demais grupos, além de uma maior prevalência de diabetes *mellitus* e hipertensão.
- Os indivíduos obesos apresentaram alterações relacionadas a processos oxidativos, inflamatórios e vasculares, o que indica que a avaliação de biomarcadores relacionados a estes processos pode contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 2 ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1994.

ARROYO-ESPLIGUERO, R. et al. C-reactive protein predicts functional status and correlates with left ventricular ejection fraction in patients with chronic stable angina. **Atherosclerosis**, v. 205, n. 1, p. 319-324, 2009.

ATABEK, M. E. et al. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. **European Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 11, p.753-756, 2006.

BAKKER, S. J. L. et al. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? **Atherosclerosis**, v. 148, n. 1, p. 17-21, 2000.

BAR-OR, D. et al. The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action. **Clinica Chimica Acta**, v. 387, n. 1-2, p. 120-127, 2008.

BAR-OR, D.; LAU, E.; WINKLER, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report. **Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n. 4, p. 311-315, 2000.

BHAGAVAN, N. V. et al. Utility of serum fatty acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction and their potential role in the formation of ischemia-modified albumin: a pilot study. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1588-1590, 2009.

BREVETTI, G.; SCHIANO, V.; CHIARIELLO, M. Endothelial dysfunction: A key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 1-11, 2008.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

CAPEILLERE-BLANDIN, C. et al. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1689, n. 2, p. 91-102, 2004.

CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 304-312, 2006.

CICHOTA, L. C. et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2008.

CLINICAL GUIDELINES ON THE IDENTIFICATION, EVALUATION, AND TREATMENT OF OVERWEIGHT AND OBESITY IN ADULTS: EXECUTIVE SUMMARY. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 899-917, 1998.

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

DANDONA, P. et al. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 10, p. 5043-5047, 2004.

DAVI, G. et al. Platelet activation in obese women – Role of inflammation and oxidant stress. **JAMA: Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 16, p. 2008-2014, 2002.

DUARTE, M. M. F. et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 666-671, 2009.

DUSSE, L. M. S. A. et al. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clinica Chimica Acta**, v. 362, n. 1-2, p. 195-197, 2005.

ERDEVE, O. et al. Antioxidant superoxide dismutase activity in obese children. **Biological Trace Element Research**, v. 98, n. 3, p. 219-227, 2004.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

FALKENSAMMER, J. et al. Serum levels of ischemia-modified albumin in healthy volunteers after exercise-induced calf-muscle ischemia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, n. 4, p. 535-540, 2007.

FILHO, A. C. et al. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 11, n. 3, p. 14-19, 2003.

FLEGAL, K. M. et al. Excess deaths associated with underweight, overweight and obesity. **JAMA: Journal of the American Medical Association**, v. 294, n. 15, p. 1861-1867, 2005.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence and trends in obesity among US Adults, 1999 – 2008. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 303, n. 3, p. 235-241, 2010.

FUTRAKUL, N.; SRIDAMA, V.; FUTRAKUL, P. Microalbuminuria A biomarker of renal microvascular disease. **Renal Failure**, v. 31, n. 2, p. 140-143, 2009.

GARG, R. et al. Troglitazone reduces reactive oxygen species generation by leukocytes and lipid peroxidation and improves flow-mediated vasodilatation in obese subjects. **Hypertension**, v. 36, n. 3, p. 430-435, 2000.



GOTTLIEB, M. G. V. et al. Associations among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidative, and lipids biomarkers. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 2, p. 586-591, 2010.

GRUBER, H. J. et al. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 5, p. 826-831, 2008.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/ American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 433-438, 2004.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HASZON, I. et al. Platelet aggregation, blood viscosity and serum lipids in hypertensive and obese children. **European Journal of Pediatrics**, v. 162, n. 6, p. 385- 390, 2003.

HAYASHI, T. et al. Gene transfer of endothelial NO synthase, but not eNOS plus inducible NOS, regressed atherosclerosis in rabbits. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 2, p. 339-351, 2004.

HIGASHI, Y. et al. Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 14, n. 10, p. 1038-1045, 2001.

HIMMELFARB, J.; McMONAGLE, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. **Kidney International**, v. 60, n. 1, p. 358-363, 2001.

INOBUCHI, T. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1939-1945, 2000.

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 357-368, 2002.

KAEFER, M. et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 4-5, p. 450-454, 2010.

KAMANNA, V. S.; ROH, D. D.; KIRSCHENBAUM, M. A. Hyperlipidemia and kidney disease: Concepts derived from histopathology and cell biology of the glomerulus. **Histology and Histopathology**, v. 13, n. 1, p. 169-179, 1998.

KEANEY, J. F. et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 434-439, 2003.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Report**, v. 3, n. 1, p. 3-15, 1997.

- KOÇAK, H. et al. Advanced oxidation protein products in obese women: its relation to insulin resistance and resistin. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 4, p. 173-178, 2007.
- KOPP, H. P. et al. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, n. 6, p. 1042-1047, 2003.
- LI, H. L.; LIU, D. P.; LIANG, C. C. Paraoxonase gene polymorphisms oxidative stress, and diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 12, p. 766-779, 2003.
- LIPINSKI, B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 15, n. 4, p. 203-210, 2001.
- LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v. 380, n. 1-2, p. 50-58, 2007.
- LYON, C. J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. A. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2195-2200, 2003.
- MAACHI, M. et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF alpha, leptin and IL-6 levels in obese women. **International Journal of Obesity**, v. 28, n. 8, p. 993-997, 2004.
- MAEDA, N. et al. PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2094-2099, 2001.
- MALNICK, S. D.; KNOBLER, H. The medical complications of obesity. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 99, n. 9, p. 565-579, 2006.
- MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.
- MARTIN-VENTURA, J. L. et al. Biomarkers in Cardiovascular Medicine. **Revista Española de Cardiología**, v. 62, n. 6, p. 677-688, 2009.
- MATHER, K. J. et al. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 8, p. 2060-2066, 2004.
- MATSUMOTO, K. et al. Comparison of serum concentrations of soluble adhesion molecules in diabetes microangiopathy and macroangiopathy. **Diabetic Medicine**, v. 19, n. 10, p. 822-826, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. VIGITEL Brasil 2009 – **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. 2010. Disponível em: <<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/arquivos/programas/vigitel2009.pdf>> Acesso em: 04 mar. 2011.
- MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), DIRETORIA DE PESQUISAS,

COORDENAÇÃO DE ÍNDICES DE PREÇOS. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil.** 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/pof2002analise.pdf>> Acesso em: 04 mar. 2011.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MOHAMED-ALI, V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4196-4200, 1997.

MOTTL, A. K. et al. Linkage analysis of albuminuria. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 20, n. 7, p. 1597-1606, 2009.

MUTLU-TURKOGLU, U. et al. An increase in lipoprotein oxidation and endogenous lipid peroxides in serum of obese women. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n. 4, p. 171-174, 2003.

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

OZATA, M. et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 627-631, 2002.

OZDEMIR, E. et al. Serum selenium and plasma malondialdehyde levels and antioxidant enzyme activities in patients with obsessive-compulsive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 62-65, 2009.

PAIVA, M. S. et al. Proteína c reativa como marcador prognóstico pós-intervenção coronária percutânea. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 14, n. 1, p. 71-75, 2006.

PASCERI, V.; WILLERSON, J. T.; YEH, E. T. H. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. **Circulation**, v. 102, n. 18, p. 2165-2168, 2000.

PETERS, T. **All About Albumin: biochemistry, genetics, and medical applications.** 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125521109>> Acesso em: 22 oct 2009.

PICKUP, J. C. et al. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. **Diabetologia**, v. 40, n. 11, p. 1286-1292, 1997.

PIWOWAR, A. [Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property]. **Polski Merkuriusz Lekarski**, v. 28, n. 164, p. 166-169, 2010.

PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. Ischemia-modified albumin level in type 2 diabetes mellitus- Preliminary report. **Disease Markers**, v. 24, n. 6, p. 311-317, 2008.

POSTADZHIYAN, A. S. et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 126-133, 2008.

QUINLAN, G. J.; MARTIN, G. S.; EVANS, T. W. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1211-1219, 2005.

ROCHE, M. et al. The antioxidant properties of albumin. **FEBS Letters**, v. 582, n. 13, p. 1783-1787, 2008.

ROMITELLI, F. et al. Comparison of nitrate/nitrite concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: The importance of a correct removal of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 851, n. 1-2, p. 257-267, 2007.

SCAGLIONE, R. et al. Central obesity and hypertension: Pathophysiologic role of renal haemodynamics and function. **International Journal of Obesity**, v. 19, n. 6, p. 403-409, 1995.

SELM ECI, L. et al. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 43, n. 3, p. 294-297, 2005.

SOLA, E. et al. Parameters of Inflammation in Morbid Obesity: Lack of Effect of Moderate Weight Loss. **Obesity Surgery**, v. 19, n. 5, p. 571-576, 2009.

STEHOUWER, C. D. A.; SMULDERS, Y. M. Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 17, n. 8, p. 2106-2111, 2006.

TAMBA, S. et al. Relationship between visceral fat accumulation and urinary albumin-creatinine ratio in middle-aged Japanese men. **Atherosclerosis**, v. 211, n. 2, p. 601-605, 2010.

TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry** 2011, *in press*, doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.12.011).

TSENG, C. H. Differential dyslipidemia associated with albuminuria in type 2 diabetic patients in Taiwan. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 10-11, p. 1019-1024, 2009.

TUREDİ, S. et al. The value of ischemia-modified albumin compared with d-dimer in the diagnosis of pulmonary embolism. **Respiratory Research**, v. 9, n. 49, p. 1-12, 2008.

UZUN, H. et al. Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. **Obesity Surgery**, v. 17, n. 10, p. 1367-1373, 2007.

VERMA, S.; ANDERSON, T. J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. **Circulation**, v. 105, n. 5, p. 546-549, 2002.

VINCENT, H. K.; BOURGUIGNON, C. M.; TAYLOR, A. G. Relationship of the dietary phytochemical index to weight gain, oxidative stress and inflammation in overweight young adults. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 23, n. 1, p. 20-29, 2010.

VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007.

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

WEYER, C. et al. Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 1, p. 233-242, 2002.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, n. 5, p. 1304-1313, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>> Acesso em: 15 fev. 2011.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

ZHANG, R. et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. **JAMA: Journal of the American Medical Association**, v. 286, p. 2136-2142, n. 17, 2001.

ZOU, M. H.; COHEN, R. A.; ULTRICH, V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Endothelium – Journal of Endothelial Cell Research**, v. 11, n. 2, p. 89-97, 2004.

**ANEXO A – Separata do artigo publicado no periódico Clinical Biochemistry**



## Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in obesity

Sílvia J. Piva<sup>a,b</sup>, Marta M.M.F. Duarte<sup>c</sup>, Ivana B.M. Da Cruz<sup>d,e</sup>, Adriane C. Coelho<sup>f</sup>, Ana Paula L. Moreira<sup>b</sup>, Raquel Tonello<sup>e</sup>, Solange C. Garcia<sup>d,g</sup>, Rafael N. Moresco<sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>f</sup> Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>g</sup> Laboratório de Toxicologia, Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 September 2010

Received in revised form 1 December 2010

Accepted 2 December 2010

Available online 13 December 2010

#### Keywords:

Human serum albumin

Obesity

Oxidative stress

### ABSTRACT

**Objective:** We evaluated the levels of ischemia-modified albumin (IMA) and its association with body mass index (BMI) in patients who are obese.

**Design and methods:** Fasting glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, malondialdehyde, and IMA levels were assessed in 148 subjects.

**Results:** IMA, malondialdehyde, and fasting glucose levels were significantly higher while the HDL cholesterol levels were lower in obese population.

**Conclusions:** IMA levels increase in overweight and obese subjects.

© 2010 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Obesity is a chronic metabolic disorder considered as an important risk factor leading to the development of health problems, such as diabetes, hypertension, high cholesterol, stroke, some kinds of cancers, and arthritis [1]. It is known that these problems have increased in the world population recently. A recent study in the United States has demonstrated evidence to support this increasing trend by showing that nearly 30% of the American population is obese, with a significant variation regarding racial and ethnic groups [2]. The excess of adipose tissue, determined by the body mass index (BMI), releases several products such as unesterified fatty acids, cytokines, plasminogen activator inhibitor-1, and adiponectin, which probably exacerbate some associated conditions such as insulin resistance, dyslipidemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease [3]. Such conditions are possible mechanisms that generate oxidative stress in obesity [4]. Bad eating habits, sedentary lifestyle, and stressful life exacerbate this state of imbalance between the free radicals and the antioxidant defenses contributing to the structural function changes of some proteins, such as the human serum albumin (HSA), which plays a vital role in the efficient antioxidant defense of the organism [5].

Overproduction of free radicals may modify the N-terminal region of HSA generating ischemia-modified albumin (IMA), a sensitive marker of ischemia that is also increased in diseases associated with obesity, such as hypercholesterolemia [6], type 2 diabetes [7], metabolic syndrome [8], and higher amounts of free fatty acids (FFA) in the body [9]. According to Duarte et al. [6], IMA appears to play the role of an oxidative stress biomarker.

Therefore, due to the fact that obesity and oxidative stress belong to an associated event, and based on the fact that albumin may be modified in situations associated with oxidative stress, the aim of this study was to evaluate the levels of the novel marker IMA in patients with obesity as well as its association with BMI.

### Methods

This study included 148 volunteers enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The subjects were divided into three groups, according to their BMI (calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared) rounded to the nearest tenth. BMI exposure groups were based on standard clinical definitions: normal weight 18.5–24.9 kg/m<sup>2</sup>; overweight 25.0–29.9 kg/m<sup>2</sup> and obese  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Patients on statin therapy were excluded from this study. All eligible subjects provided informed written consent and all studies were conducted in accordance with guidelines approved by the local research ethics committee (number: 0199.0.243.000-07).

Blood samples were drawn by venipuncture technique into Vacutainer<sup>®</sup> (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium

\* Corresponding author. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1216, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 32208018.

E-mail address: [rnmoresco@yahoo.com.br](mailto:rnmoresco@yahoo.com.br) (R.N. Moresco).

fluoride (gray top tubes), EDTA (purple top tubes) or no anticoagulant (red top tubes). Blood specimens in red top tubes were allowed to clot for 60 min. Blood specimens were routinely centrifuged for 15 min at 1500g, and aliquots of serum samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a maximum of 2 weeks before measurement of IMA levels. Plasma was used to measure the levels of fasting glucose, while the fresh serum was used to assess the levels of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides. All analyses were performed at Cobas Mira (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer using standard methods. LDL cholesterol was estimated by the use of Friedewald equation [10]. Serum IMA was measured by a colorimetric cobalt-albumin binding analysis previously described [7]. Blood specimens collected with EDTA were used to analyze plasma malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation. Samples were placed on ice and centrifuged at 1500g for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and plasma MDA levels were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) with visible detection as previously described [11].

Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). Categorical data were summarized as percentages, and comparisons among groups were performed with Chi-squared test. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test were used to determine statistical differences among the BMI groups. Pearson correlation was assessed to evaluate the association between IMA and BMI. Statistical significance was assumed at  $P < 0.05$ . Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

Fasting blood glucose and MDA levels were significantly higher in the obese population (Table 1). HDL cholesterol levels were lower in the obese population. No significant differences were observed for total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides in the studied population. Serum IMA levels were significantly higher in overweight and obese subjects, as shown in Fig. 1. A significant correlation between IMA and BMI was observed ( $r = 0.340$ ,  $P < 0.001$ ).

## Discussion

Obesity is a chronic state that is related with the free radical production through diverse pathways. Hyperglycemia, increased muscle activity, inadequate antioxidant defenses, lipid oxidizability, chronic low-grade inflammation, hypertension, and hyperleptinemia are some possible contributors to the oxidative stress in obesity [4]. IMA has not been previously correlated directly with oxidative stress in obesity, and according to findings, it seems a possible marker of this

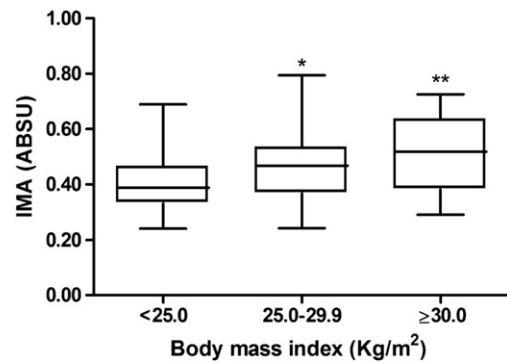


Fig. 1. Serum ischemia-modified albumin (IMA) levels in study population. \*\* $P < 0.001$  and \* $P < 0.05$  compared to normal subjects (BMI  $< 25.0$  kg/m<sup>2</sup>).

state. We have previously reported the increase of IMA in metabolic syndrome [8]. However, to the best of our knowledge, this is the first report assessing the role of IMA as a marker of oxidative stress in obesity and its association with BMI.

The obese subjects in our study have showed higher levels of glucose, IMA, and MDA. Hyperglycemia is related with the advanced glycosylation end products formed from proteins, lipids, and nucleic acids that bind with specific cell surface receptors, generating radical oxidative species [4]. These free radicals affect the albumin ability to combine with metals such as cobalt, and may promote an increase of IMA levels [7]. Lipid peroxidation often occurs in response to enhanced oxidative stress, and MDA is one of the low-molecular weight end products formed via decomposition of certain primary and secondary products of cell membrane injury due to lipid peroxidation.

It is known that HSA is the primary binder of fatty acids, commonly known as FFA, and that plasma concentrations of such acids are increased in obesity. Bhagavan et al. [9] described that changes in IMA values during acute muscular heart tissue necrosis are likely to be caused by reversible conformational changes in HSA associated with FFA fluxes.

In summary, IMA levels were elevated in obesity associated with oxidative stress and FFA fluxes. Thus, we postulate that free radicals and FFA fluxes may modify the HSA and increase the IMA levels in overweight and obese subjects. However, further studies including other oxidative stress markers such as dityrosine, advanced oxidation protein products, and 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane are required to investigate associations between IMA and other markers, such as its clinical potential for application as an oxidative stress biomarker in the obese population.

## Conflicts of interest statement

None of the authors have conflicts of interest to declare.

## References

- [1] Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM* 2006;99: 565–79.
- [2] Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US Adults, 1999–2008. *JAMA* 2010;303:235–41.
- [3] Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433–8.
- [4] Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes* 2006;30:400–18.
- [5] Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 1999;13:233–44.
- [6] Duarte MMMF, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL, Schetinger MR. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009;42:666–71.
- [7] Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JA, Da Silva DB, Becker AM, Coelho AC, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43:450–4.

Table 1  
Baseline characteristics of study participants.

	BMI <25.0 kg/m <sup>2</sup>	BMI 25.0–29.9 kg/m <sup>2</sup>	BMI ≥30 kg/m <sup>2</sup>
N	75	43	30
Age (years)	52.3 $\pm$ 12.1	55.2 $\pm$ 13.0	55.0 $\pm$ 11.7
Male (n)	35	18	14
Type 2 diabetes (n)	14	25**	22**
Glucose (mmol/L)	5.4 $\pm$ 2.7	6.0 $\pm$ 2.5	7.8 $\pm$ 3.7**†
Total cholesterol (mmol/L)	5.3 $\pm$ 1.7	5.4 $\pm$ 1.8	4.8 $\pm$ 1.2
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.4*
LDL cholesterol (mmol/L)	3.3 $\pm$ 1.4	3.5 $\pm$ 1.6	3.0 $\pm$ 1.2
Triglycerides (mmol/L)	1.7 $\pm$ 1.4	1.4 $\pm$ 0.9	1.6 $\pm$ 0.7
Malondialdehyde ( $\mu$ mol/L)	9.3 $\pm$ 2.4	10.8 $\pm$ 2.9	11.5 $\pm$ 2.6*

Data are expressed as means  $\pm$  SD or number of patients. BMI, body mass index.

\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$  compared to normal group (BMI  $< 25.0$  kg/m<sup>2</sup>).

† $P < 0.05$  compared to overweight group (BMI 25.0–29.9 kg/m<sup>2</sup>).



- [8] Gottlieb MGV, Da Cruz IBM, Duarte MMF, Moresco RN, Wiehe M, Schwanke CHA, et al. Associations among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidative, and lipids biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:586–91.
- [9] Bhagavan NV, Ha JS, Park JH, Honda SA, Rios CN, Sugiyama C, et al. Utility of serum fatty acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction and their potential role in the formation of ischemia-modified albumin: a pilot study. *Clin Chem* 2009;55:1588–90.
- [10] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of lowdensity lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [11] Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43: 619–24.

**ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito II para publicação no periódico Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**

De: cclm.editorial@degruyter.com <cclm.editorial@degruyter.com>  
Assunto: Your manuscript ID CCLM.2011.0131 - submission confirmation  
Para: rnmoresco@yahoo.com.br  
Data: Sábado, 5 de Março de 2011, 20:40

05-Mar-2011

Dear Prof. Moresco,

Your manuscript entitled "Assessment of oxidative, inflammatory, and endothelial biomarkers in obesity" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).

Your manuscript ID is CCLM.2011.0131.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your affiliation, street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/cclm> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/cclm> .

Thank you for submitting your manuscript to CCLM.

Kind regards,  
Heike Jahnke  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine