



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**ESTRÉS OXIDATIVO, NITROSATIVO Y DAÑO
CARDIOVASCULAR EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS OBESOS**

PROGRAMA DE DOCTORADO
(030D) BIOQUÍMICA CLÍNICO-MÉDICA E INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Doctoranda: Sandra Tavárez Alonso
Directoras: Dra. D^a. Eulalia Alonso Iglesias
Dra. D^a. Pilar Codoñer Franch
Valencia, 2015

La Doctora **EULALIA ALONSO IGLESIAS**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y la Doctora **PILAR CODOÑER FRANCH**, Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefa del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr Peset de Valencia

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Estrés oxidativo, nitrosativo y daño cardiovascular en pacientes pediátricos obesos**” ha sido realizada bajo su dirección por **Sandra Tavárez Alonso** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y en el Hospital Universitario Dr Peset de Valencia, y consideran que reúne todos los requisitos para su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, expiden y firman el presente informe en Valencia, octubre de 2015.

Fdo: Dra. Eulalia Alonso Iglesias

Fdo: Dra. Pilar Codoñer Franch

El trabajo aquí presentado ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y en el Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Su realización ha sido aprobada por el Comité Ético de Investigación del Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia).

Se ha financiado gracias a las ayudas AP-199/11 y 945/2008 del EVES (Escuela Valenciana de Estudios de la Salud de la Consellería de Sanidad de la Generalitat Valenciana), y CSD 2007-00063 del Programa CONSOLIDER-INGENIO del Ministerios de Educación y Ciencia.

A mis padres, por apoyarme siempre en todos los momentos de mi vida y estar siempre ahí. A mis hermanas por ser un apoyo incondicional.

A los motores de mi vida, mi marido y mis hijos, por hacer que todo sea mucho más fácil

A mi abuelo, siempre fuiste un ejemplo en todo, espero que allá donde estés puedas estar un poco orgulloso de mí.

Agradecer especialmente a mis directoras de tesis, la Doctora Pilar Codoñer por su apoyo, y especialmente a la Doctora Eulalia Alonso por ayudarme y guiarme en este camino de la Ciencia y por toda su paciencia en todos los momentos que hemos compartido.

A mis compañeros de Departamento por tener siempre un momento para ayudar. Y a todos mis amigos por simplemente apoyarme y estar ahí.

ÍNDICE

Índice de tablas

Índice de figuras

Abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBESIDAD Y RIESGO CARDIOVASCULAR	3
1.1.1. Etiología y clasificación	3
1.1.2. Prevalencia de la obesidad infantil	6
1.1.3. Comorbilidades de la obesidad	7
1.1.4. Síndrome metabólico (SM)	8
1.1.5. Insulinorresistencia (IR)	10
1.1.6. Dislipemia	12
1.1.7. Hipertensión arterial (HTA)	15
1.1.8. Inflamación y sus indicadores	17
1.2 ENDOTELIO VASCULAR Y ATEROGÉNESIS	21
1.2.1. Características y funciones del endotelio vascular	21
1.2.2. Disfunción endotelial	24
1.3 METABOLISMO DE LA ARGININA	26
1.3.1. Óxido nítrico (NO)	29
1.3.2. Poliaminas	31
1.4 ESTRÉS OXIDATIVO	36
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	41
2. MATERIAL Y MÉTODOS	43
2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO: PACIENTES	45
2.2 MEDIDAS Y DETERMINACIONES	45
2.2.1. Medidas antropométricas	45
2.2.2. Toma de muestras biológicas y procesamiento	46
2.2.3. Determinaciones clínicas y criterios de riesgo metabólico	47
2.2.4. Determinaciones experimentales	49
2.2.4.1. Parámetros del metabolismo de la arginina	49
2.2.4.2. Parámetros de estrés oxidativo y nitrosativo	52
2.2.4.3. Citoquinas, adipocinas y parámetros de inflamación	57
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59

3. RESULTADOS	61
3.1 ESTRÉS OXIDATIVO	63
3.2 METABOLISMO DE LA ARGININA	66
3.3 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE VITAMINA D	75
3.4 RESISTINA	80
3.5 RESUMEN COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES ENTRE PACIENTES OBESOS Y CONTROLES	83
4. DISCUSIÓN	91
5. CONCLUSIONES	111
6. BIBLIOGRAFÍA	115
7. ANEXO. Publicaciones derivadas del presente trabajo	135

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.1.** Criterios de la SEEDO para definir la obesidad en grados según el IMC en adultos.
- Tabla 1.2.** Prevalencia de obesidad en la población adulta española por grupos de edad y sexo.
- Tabla 1.3.** Principales alteraciones metabólicas en la obesidad.
- Tabla 1.4.** Criterios diagnósticos del Síndrome Metabólico.
- Tabla 1.5.** Criterios diagnósticos del Síndrome Metabólico en niños y adolescentes.
- Tabla 1.6.** Mecanismos que relacionan la IR y/o la hiperinsulinemia con la HTA.
- Tabla 3.1.** Datos clínicos, antropométricos y bioquímicos de los niños controles y obesos incluidos en el estudio.
- Tabla 3.2.** Biomarcadores de estrés oxidativo determinados en plasma de niños control y con obesidad severa.
- Tabla 3.3.** Factores de riesgo metabólico de acuerdo con los puntos de corte para AOPPs en los niños obesos.
- Tabla 3.4.** Parámetros clínicos y bioquímicos de la población infantil de estudio.
- Tabla 3.5.** Parámetros del metabolismo del óxido nítrico, poliaminas, estrés oxidativo y nitrosativo, adipocitoquinas, marcadores de inflamación y moléculas de adhesión en la población de estudio.
- Tabla 3.6.** Coeficientes parciales de correlación de Pearson entre los niveles de espermina y los datos clínicos y experimentales en la población global y en la obesa, ajustada por sexo y estadio Tanner.
- Tabla 3.7.** Datos clínicos, antropométricos y bioquímicos de los niños de estudio divididos de acuerdo a su estado nutricional y al número de factores de riesgo metabólico (MRFs).
- Tabla 3.8.** Parámetros del metabolismo del óxido nítrico, estrés oxidativo e inflamación de los niños de estudio clasificados de acuerdo a su estado nutricional y al número de factores de riesgo metabólico (MRFs).
- Tabla 3.9.** Coeficientes de correlación parcial de Pearson ajustados por edad y sexo en todos los niños del estudio (n=110) y en los niños con obesidad severa (n=60).
- Tabla 3.10.** Datos clínicos, antropométricos, nutricionales y bioquímicos para los 66 niños obesos y los 39 niños control que participaron en el estudio.
- Tabla 3.11.** Datos clínicos, antropométricos y bioquímicos para los 66 niños obesos divididos según los valores de 25(OH)D.
- Tabla 3.12.** Adipocitoquinas, marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación y moléculas de activación endotelial para los 66 niños obesos del estudio divididos de acuerdo con sus niveles de 25(OH)D.

- Tabla 3.13.** Características demográficas, clínicas y de laboratorio de la población de estudio.
- Tabla 3.14.** Correlaciones parciales de Pearson entre los niveles de resistina y los datos clínicos y experimentales de todos los niños incluidos en el estudio y de los niños obesos.
- Tabla 3.15.** Análisis de regresión múltiple para la resistina como variable dependiente en los niños obesos.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Dinámica del metabolismo lipídico.
- Figura 1.2.** Relación entre obesidad, ácidos grasos libres y enfermedad cardiovascular aterosclerótica.
- Figura 1.3.** Mecanismo propuesto para el desarrollo de hipertensión inducido por obesidad.
- Figura 1.4.** Endotelio y disfunción endotelial.
- Figura 1.5.** Orígenes y destinos de la arginina.
- Figura 1.6.** Destinos metabólicos de la arginina.
- Figura 1.7.** Síntesis del óxido nítrico.
- Figura 1.8.** Isoformas y funciones biológicas de las NOS.
- Figura 1.9.** Estructura química de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina.
- Figura 1.10.** Vías de síntesis, interconversión y catabolismo de las poliaminas.
- Figura 1.11.** La arginina como precursora del óxido nítrico y de las poliaminas.
- Figura 1.12.** Mecanismos de acción propuestos para las poliaminas.
- Figura 1.13.** Fuentes de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno implicadas en las rutas de señalización y daño.
- Figura 2.1.** Cromatogramas ilustrativos de muestra patrón y sangre total.
- Figura 2.2.** Fórmula química del reactivo de Ellman.
- Figura 2.3.** Procedimiento esquemático de cuantificación de citoquinas mediante el sistema MULTIPLEX.
- Figura 3.1.A.** Niveles sanguíneos de putrescina, espermidina y espermina.
- Figura 3.1.B.** Curvas ROC para las tres poliaminas.
- Figura 3.2.** Niveles séricos de 25(OH)D, iPTH, relación 25(OH)D/iPTH, calcio y fósforo y producto calcio × fósforo en niños con BMI normal (n=39), niños obesos con $2 < \text{SDS-BMI} \leq 4$ (n=33), y niños extremadamente obesos con $\text{SDS-BMI} > 4$ (n=33).
- Figura 3.3.** Niveles de resistina sérica en niños con normopeso (n=40), niños obesos sin resistencia a insulina ($\text{HOMA-IR} < 3,16$; n=21) y niños obesos con resistencia a insulina ($\text{HOMA-IR} > 3,16$; n=49).
- Figura 3.4.** Niveles plasmáticos y urinarios de nitrito + nitrato en niños obesos y con normopeso.
- Figura 3.5.** Niveles sanguíneos de putrescina, espermidina y espermina en niños obesos y con normopeso.
- Figura 3.6.** Niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) y nitrotirosina en niños obesos y con normopeso.
- Figura 3.7.** Niveles plasmáticos de 8-isoprostanos y AOPPs en niños obesos y con normopeso.
- Figura 3.8.** Niveles plasmáticos de hs-CRP, IL-6 y TNF- α en niños obesos y con normopeso.

Figura 3.9. Niveles plasmáticos de sE-Selectina, sICAM-1, sVCAM-1 y VEGF en niños obesos y con normopeso.

Figura 3.10. Niveles plasmáticos de leptina y resistina en niños obesos y con normopeso.

Figura 3.11. Niveles plasmáticos de vitamina D, iPTH, calcio y fósforo en niños obesos y con normopeso.

ABREVIATURAS

·OH:	radical hidroxilo
1,25(OH):	1,25-dihidroxi vitamina D o calcitriol
¹O₂:	oxígeno singlete
8-OH-dG:	8-hidroxil 2'-deoxiguanosina
ADC:	arginina decarboxilasa
Adipo R1/R2:	receptores adiponectina
ADMA:	dimetil arginina asimétrica
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AdoMet:	S-adenosil L-metionina
AdoMetDC:	S-adenosil-metionina decarboxilasa
AMPK:	proteín quinasa activada por 5' adenosina monofosfato (AMP)
ANCOVA:	análisis de la covarianza
AngII:	angiotensina II
ANOVA:	análisis de la varianza de un factor
AOPPs:	productos avanzados de oxidación protéica
ApoB:	apolipoproteína B
Arg:	arginina
ASL:	argininosuccinato liasa
ASS:	argininosuccinato sintetasa
ASVD:	enfermedad vascular aterosclerótica
ATPIII:	Adult Treatment Panel III
BH₄:	tetrahidrobiopterina
BMI:	índice de masa corporal
BP:	presión arterial
C/EBP:	CCAAT/ proteína potenciadora de unión
Ca⁺²/CaM:	calcio/calmodulina
CECs:	células endoteliales circulantes
CEH:	clamp euglucémico hiperinsulinémico
cGMP:	guanosín monofosfato cíclico
c-HDL:	colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
Cit:	citulina
c-LDL:	colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
-CO:	grupo carbonilo
CRP:	proteína C reactiva
Cu:	cobre

DAG:	diacilglicerol
DAN:	2,3-diaminonaftaleno
dcAdoMet:	S-adenosil metionina decarboxilada
DDAH:	dimetilarginina dimetil aminohidrolasa
DM:	diabetes mellitus
DM2:	diabetes mellitus tipo 2
DORICA:	estudio sobre dislipemia, obesidad y riesgo cardiovascular
DTNB:	5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
ECV:	enfermedad cardiovascular
EDRF:	factor de relajación derivado del endotelio
eGFR:	tasa de filtración glomerular estimada
EIA:	enzimoinmunoanálisis
eIF5A:	factor eucariótico de iniciación de la traducción 5A
ELISA:	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
eNOS:	óxido nítrico sintasa endotelial
EOCs:	células progenitoras vasculares
ERK ½:	quinasa regulada por señales extracelulares
ET-1:	endotelina 1
FAD:	flavín adenín dinucleótido
Fe²⁺:	hierro
FFA:	ácido graso libre
FGIR:	cociente glucosa/insulina en ayunas
FMN:	flavín mononucleótido
GC:	guanilato ciclasa
Gln:	glutamina
Glu:	ácido glutámico
Grupos SH:	grupos sulfidrilo
H₂O₂:	peróxido de hidrógeno
HC:	circunferencia de cadera
HClO₄:	ácido perclórico
HOCl:	ácido hipocloroso
HOMA:	modelo homeostático de resistencia a la insulina
HPLC:	cromatografía líquida de alta eficacia
Hs-CRP:	proteína C-reactiva de alta sensibilidad
HSL:	lipasa sensible a hormonas
HTA:	hipertensión arterial
iCAM-1:	molécula de adhesión intercelular-1

IDF:	Federación Internacional de Diabetes
IFN-γ:	interferón gamma
IL:	interleuquina
iNOS:	óxido nítrico sintasa inducible
IOTF:	International Obesity Task Force
iPF₂-α-III:	F ₂ - isoprostanos
iPTH:	hormona paratiroidea intacta
IR:	insulinorresistencia
IRS ½:	sustrato del receptor de insulina ½
JNK:	quinasa C-Jun N-terminal
LPL:	lipoprotein lipasa
LSD:	least significant difference
mAOPPs:	productos avanzados de oxidación protéica en plasma delipidado
MAPK:	proteína quinasa activada por mitógenos
MCP-1:	proteína quimioatrayente de monocitos-1
MDA:	malondialdehído
MMP:	metaloproteinasas de matriz
MPO:	mieloperoxidasa
MRF:	factor de riesgo metabólico
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
NADPH oxidasa:	oxidasa de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NADPH:	nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NEFA:	ácidos grasos no esterificados
NFκB:	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
NMMA:	monometil arginina
nNOS:	óxido nítrico sintasa neuronal
NO:	óxido nítrico
NO₂⁻:	nitrito
NO₃⁻:	nitrato
NOS:	óxido nítrico sintasa
NO_x⁻:	nitrito + nitrato
O₂⁻:	radical superóxido
ODC:	ornitina decarboxilasa
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
ONOO⁻:	peroxinitrito
Orn:	ornitina
PAI-1:	inhibidor del activador del plasminógeno-1

PAO:	poliamina oxidasa
PGI2:	prostaglandina I2 o prostaciclina
PKC:	protein quinasa C
PPAR:	receptor activado de proliferación de los peroxisomas
PTH:	hormona paratoidea
RAS:	sistema renina-angiotensina
RCV:	riesgo cardiovascular
ROC:	característica operativa del receptor
ROS:	especies reactivas de oxígeno
SD:	desviación estándar
SDMA:	dimetilarginina simétrica
SDS-BMI:	standard deviation score-body mass index
SEEDO:	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
sICAM:	molécula de adhesión intercelular soluble
SM:	síndrome metabólico
SMC:	células del músculo liso
SNS:	sistema nervioso simpático
SSAT:	espermidina/espermina N ¹ -acetiltransferasa
sVCAM:	molécula vascular soluble de adhesión celular
TA:	temperatura ambiente
TBA:	ácido tiobarbitúrico
TBARM:	material reactivo con ácido tiobarbitúrico
TG:	triglicéridos
TMP:	tetrametoxipropano
TNF-α:	factor de necrosis tumoral- α
UNO₃/UCr:	cociente nitrato/creatinina urinarios
VCAM-1:	molécula de citoadhesión vascular-1
VEGF:	factor vascular de crecimiento endotelial
VLDL:	lipoproteínas de muy baja densidad
vWF:	factor de von Willebrand
WC:	circunferencia de cintura

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OBESIDAD Y RIESGO CARDIOVASCULAR

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como «una acumulación anormal o excesiva de grasa que supone un riesgo para la salud». Se trata de una enfermedad crónica multifactorial consecuencia de una interacción entre el genotipo y el ambiente.

Podemos considerar la obesidad infantil como uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. Este es un problema mundial cuya prevalencia ha aumentado a un ritmo alarmante en los últimos años, de modo que se calcula que en 2010 había 42 millones de niños con sobrepeso en todo el mundo, de los que cerca de 35 millones viven en países en desarrollo. La epidemia global de obesidad despegó alrededor de 1980 y en la mayoría de las sociedades desarrolladas ha continuado aumentando inexorablemente hasta la actualidad. Sólo a partir de 1998 la Organización Mundial de la Salud aceptó que se trataba de un problema público de salud mayor e incluso entonces, no existía un método aceptado para monitorizar el problema en los niños (1).

La preocupación que subyace a la obesidad se debe a su asociación con patologías tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensión arterial y ciertos tipos de cáncer. A mayor obesidad, mayores cifras de morbilidad y mortalidad para estas enfermedades.

En adultos, la obesidad se asocia además a otras patologías, como enfermedades respiratorias y artrosis; pero en niños y adolescentes el problema se hace más grave puesto que de no tomar medidas a tiempo, hay una alta probabilidad de que el niño obeso se convierta en un adulto obeso y con más tiempo para que desarrolle comorbilidades.

1.1.1. Etiología y clasificación

La obesidad etiológicamente se caracteriza por un exceso de tejido graso (2). El porcentaje de masa grasa se evalúa a través del índice de masa corporal (BMI; peso en kg/talla² en metros). Aunque este índice también tiene en cuenta la masa libre de grasa, se emplea ampliamente para la evaluación de la obesidad y es recomendado por las asociaciones médicas por su facilidad de determinación y reproducibilidad.

En función del porcentaje graso corporal, podríamos definir como sujetos obesos aquellos cuyo BMI ≥ 30 kg/m². En la tabla 1.1 se adjuntan los límites de IMC para cada categoría de peso (1).

Categoría	Valores límite del BMI (kg/m ²)
Peso insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II	27,0-29,9
Obesidad tipo I	30,0-34,9
Obesidad tipo II	35,0-39,9
Obesidad tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad tipo IV (extrema)	> 50

Tabla 1.1 Criterios de la SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad) para definir la obesidad en grados según el IMC en adultos.

La prevalencia de obesidad en la población adulta española entre 25 y 64 años, de acuerdo a los resultados del estudio DORICA (3), se estima en un 15,5% con una prevalencia más elevada en mujeres (17,5%) que en hombres (13,2%), registrándose una mayor proporción de obesos en las regiones del Noroeste, Murcia, Sur y Canarias. El 0,79% de los hombres y el 3,1% de las mujeres entre 25 y 60 años presentan una obesidad tipo II (BMI 35-39,9) y el 0,3% de los varones y el 0,9% de las mujeres una obesidad mórbida (BMI ≥ 40 kg/m²). En la tabla 1.2 se muestra la prevalencia de la obesidad por grupos de edad y sexo.

Durante la infancia, debido al crecimiento, se producen una serie de cambios en el peso, la talla y la composición corporal que dificultan la medida del sobrepeso y la obesidad. Así pues, en ausencia de unos criterios establecidos que definan la obesidad infantil en base a la grasa corporal total y su relación con las consecuencias en la salud, generalmente se emplean puntos de corte basados en la distribución de medidas antropométricas (p.e. Peso, BMI) para definirla. Desde 1995 varios grupos de expertos y asesores, incluidos los de la OMS, han recomendado el BMI como la medida preferida para evaluar la obesidad entre los niños y adolescentes de 2-19 años de edad (4,5).

Población adulta^a			
Grupos de edad (años)	Hombres (%)	Mujeres (%)	Total (%)
25-34	7,1	4,8	5,9
35-44	11,7	12,2	12,0
45-54	16,9	26,4	22,0
55-64	21,5	34,2	28,5
Población mayor de 65 años^b			
	Hombres (%)	Mujeres (%)	Total (%)
Ancianos no institucionalizados¹	31,5	40,8	36
Ancianos institucionalizados²	20,5	21,7	21

Tabla 1.2. Prevalencia de obesidad en la población adulta española por grupos de edad y sexo. Modificado de (1).
^aResultados del estudio DORICA. Obesidad definida por valores de BMI > 30 kg/m²; ^bObesidad definida por valores de BMI > 30 kg/m²; ¹Ancianos no institucionalizados (6); ²Ancianos institucionalizados (7).

En 1994 en Estados Unidos, el Expert Committee on Clinical Guidelines for Overweight in Adolescent Preventive Services recomendaba que aquellos niños cuyo BMI excediera de 30 kg/m² o fuese \geq al percentil 95 (p95) para edad y sexo, fuesen considerados afectados de sobrepeso, mientras que aquellos cuyo BMI estuviese entre el p85 y el p95 fuesen considerados “en riesgo de sobrepeso”. En el año 2005, el Institute of Medicine se apartó a conciencia de la terminología previamente descrita acuñando el vocablo obeso para aquellos niños con un BMI \geq p95 para edad y sexo. El cambio se justificaba por la naturaleza de la actual epidemia y la necesidad de dirigir el problema activamente. Así mismo se recomendaba considerar sobrepeso en aquellos niños con un BMI entre p85 y p95 (8). Esta nueva terminología permitía además establecer un paralelismo con las recomendaciones de la International Obesity Task Force (IOTF) que, a principio de este milenio, estableció un esquema razonable para comparar los puntos de corte del índice de Masa Corporal en niños (ajustados según edad y sexo) con los aceptados en adultos de 25 y 30 para sobrepeso y obesidad, respectivamente (9). Cole et al. Basaron dichos puntos de corte en los datos obtenidos de seis países. Debido al cambio continuo en la prevalencia de la obesidad, los percentiles son dependientes del año en que se recopilan los datos de estudio, mientras que los puntos de corte del IOTF están basados en una construcción estadística que es independiente del nivel de sobrepeso y obesidad de la población de referencia. Sin embargo, las definiciones de sobrepeso y obesidad del IOTF tienden a proporcionar prevalencias más conservadoras, y por carecer de percentiles precisos, no son útiles para estudios longitudinales de seguimiento individual. Posteriormente algunos investigadores presentaron desacuerdo en el uso de esta referencia internacional. Se ha argumentado que deberían utilizarse estándares específicos para cada población debido a las diferencias biológicas entre poblaciones (10). La evidencia

para el uso de tablas de referencia de IMC nacionales es suficientemente fuerte para su adopción en la práctica clínica y en el cribado de la obesidad (11). La elección de unos puntos de corte determinados permite la evaluación del aumento en la morbimortalidad por encima de esos valores prefijados y su comparación en diferentes fases.

Existe poca evidencia disponible acerca del modo más efectivo para evaluar la severidad de la obesidad en niños con BMI > p95. En entornos de investigación se utiliza el z-score: porcentaje del IMC ideal de un niño para una misma edad, peso y talla en el percentil 50, $((\text{BMI niño}/\text{BMI p50}) \times 100)$ para valores extremos de medidas antropométricas. Algunos datos sugieren que valores de BMI \geq p99 (que equivale aproximadamente a +3 desviaciones estándar (SD)) para edad y sexo están fuertemente asociados con la presencia de comorbilidades, exceso de adiposidad y persistencia de la obesidad en el adulto (12).

1.1.2. Prevalencia de la obesidad infantil

En los últimos años se ha producido un aumento en el p95 del IMC indicando un aumento del porcentaje de obesidad infantil, así como también del grado de obesidad (13). Una revisión de 21 estudios realizados en varios países europeos indica una mayor prevalencia de obesidad en el sur y oeste de Europa, siendo los países que rodean el Mediterráneo los más afectados (14).

Wang y colaboradores revisaron la tendencia mundial de obesidad infantil en 25 países para niños en edad escolar y 42 países para población preescolar; observaron que la prevalencia de obesidad infantil ha aumentado en ambos sexos, en todas las etnias y en todos los grupos socioeconómicos, en casi todos los países para los que existían datos disponibles, y de forma más dramática, en países desarrollados y en población urbana (15). Los autores destacaban que el exceso de peso corporal es el sexto factor más importante de la carga global de enfermedad a nivel mundial y que aproximadamente 110 millones de niños están afectados de sobrepeso u obesidad.

En nuestro país la prevalencia de obesidad infanto-juvenil para edades comprendidas entre 2-24 años se estima en un 13,9%, y para el sobrepeso se estima en un 12,4%, según el estudio enKid. En conjunto, sobrepeso y obesidad suponen el 26,3%. La obesidad es significativamente más elevada en los varones (15,6%) que en las mujeres (12%). En el subgrupo de varones, las tasas más elevadas se observaron entre los 6 y los 13 años de edad.

En las chicas, las tasas de prevalencia más elevadas se observaron entre los 6 y los 9 años. En los niños de 6-9 años, la prevalencia de obesidad infanto-juvenil ha aumentado progresivamente en el curso de las últimas décadas, con un incremento del 4,9% en 1984 al 15,9% en el año 2000, según muestra el estudio enKid. En este mismo grupo de edad, el sobrepeso afecta al 14,5% de los niños, suponiendo sobrepeso y obesidad un 30,4% (16,17)

La prevalencia de obesidad infantil en Europa continúa aumentando. Un análisis de 45 estudios procedentes de 11 países europeos estimó que, en el año 2010, 26,7 millones de niños europeos de 5 - 17,9 años de edad tendrían sobrepeso (BMI > p85 según Cole) con un incremento anual de 1,3 millones, de los cuales 6,4 millones serían obesos (BMI > p95 según Cole) con un incremento anual de 0,35 millones, lo que supone una prevalencia de 36,7% de sobrepeso y 8,8% de obesidad, respectivamente. Para España se estimó una prevalencia de sobrepeso del 41,4% (11,1% de obesidad) para varones y del 30,8% (7,4% de obesidad) en niñas según los criterios de Cole (18).

Hasta ahora todos los esfuerzos se han dirigido a tratar la obesidad, pero el porcentaje de éxito a largo plazo es muy bajo y, a menudo, el peso perdido se recupera en un corto plazo de tiempo, con lo que reaparecen las comorbilidades asociadas a la misma. La magnitud del problema es tal que, de seguir aumentando la prevalencia de la obesidad, se puede estar seguro de que en unos pocos años no habrá ningún país, por rico que sea, que pueda hacer frente económicamente a esta epidemia (19).

1.1.3. Comorbilidades de la obesidad

La importancia del sobrepeso y la obesidad como problema socio-sanitario es debida a la multitud de alteraciones de la salud que a ellos se asocian. Entre ellas la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la dislipemia, la hipertensión, la enfermedad coronaria y cerebrovascular, la colelitiasis, la osteoartritis, la insuficiencia cardíaca, el síndrome de apnea del sueño, algunos tipos de cáncer, alteraciones menstruales, esterilidad y alteraciones psicológicas. Todas estas patologías están ligadas a alteraciones metabólicas que tienen lugar en el sujeto obeso (17,20) y que se resumen en la Tabla 1.3.

Incremento de Colesterol Total	Hipertrigliceridemia
Aumento de c-LDL y descenso de c-HDL	Elevación de la actividad triglicérido lipasa hepática
Escasa respuesta antilipolítica en el tejido adiposo visceral	Elevación del cociente colesterol total/c-HDL
Elevación de los ácidos grasos libres	Incremento de los triglicéridos en HDL y LDL
Hiperinsulinemia e insulinoresistencia	Presencia de LDL pequeñas y densas
Disminución de la captación hepática de insulina	Exacerbación de la hiperlipemia postprandial
Aumento de la síntesis de VLDL	Incremento de la oxidación de lipoproteínas
Aumento plasmático de Apo B	Alteración en la secreción de glucocorticoides
Disminución de la actividad lipoproteinlipasa	Trastornos en la secreción de esteroides sexuales
Hiperuricemia	

Tabla 1.3. Principales alteraciones metabólicas en la obesidad. Modificado de Aranceta et al, 2003 (17).

1.1.4. Síndrome metabólico (SM)

Cuando la obesidad se presenta en la infancia o en la adolescencia, conlleva a importantes riesgos y comorbilidades en la edad adulta. Con frecuencia ya desde edades tempranas aparecen complicaciones como hipertensión arterial, hiperlipemia o hiperinsulinemia, constituyendo el inicio del desarrollo del conocido Síndrome Metabólico (SM). El SM consiste en la asociación de varios factores como la alteración del metabolismo de la glucosa, obesidad abdominal, dislipemia, hipertensión, etc. Todos estos factores contribuyen a la aparición de la enfermedad cardiovascular y a la diabetes (21–23)

Para el diagnóstico del SM se tienen en cuenta una serie de criterios que varían ligeramente en función de la sociedad científica que los propone. Entre los más utilizados están los propuestos por la OMS en 1998 (24,25), y los del informe de la National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III, 2001; ATP III) (26). Esta última clasificación es más simple pues, a diferencia de la definición del grupo de trabajo de la OMS, no necesita demostrar directamente la resistencia a la insulina. En la tabla 1.4 se muestran los criterios propuestos por estas dos sociedades.

Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999)	Panel III del National Cholesterol Education Program (ATPIII, Revisados en 2005)
<ul style="list-style-type: none"> - Diabetes mellitus, glucemia basal alterada, intolerancia glucídica o insulinoresistencia. - Además, dos o más de estos factores: BMI >30 kg/m² y/o índice cintura cadera: >0,90 (varones) >0,85 (mujeres) Triglicéridos ≥ 150 mg/dL y/o c-HDL: <35 mg/dL (varones) < 39 mg/dL (mujeres) Presión arterial ≥ 140/90 mmHg Microalbuminuria ≥ 20 µg/min o albúmina/creatinina ≥ 30 mg/g 	<ul style="list-style-type: none"> - Presencia de tres o más de estos factores: Perímetro de cintura abdominal >102 cm (varones) >88 cm (mujeres) Triglicéridos ≥ 150 mg/dL c-HDL <40 mg/dL (varones) <50 mg/dL (mujeres) Presión arterial ≥ 130/85 mmHg Glucemia basal ≥ 100 mg/dL

Tabla 1.4. Criterios diagnósticos del Síndrome Metabólico. Tomado de Crepaldi , 2006 (27).

Más recientemente están tomando fuerza los criterios establecidos por la International Diabetes Federation (28) que introducen dos cambios importantes en la ATP III. Consideran la obesidad central como criterio diagnóstico imprescindible más dos de los criterios de la ATP. Además introduce criterios más estrictos en cuanto al diámetro de la cintura (>94 en varones y >80 en mujeres).

A diferencia de lo que ocurre en adultos, hasta no hace mucho, existía una falta de consenso en la definición del SM en niños y adolescentes. Trasladar la definición de adultos a estos grupos de edad es complicado ya que la presión sanguínea, los niveles lipídicos y variables antropométricas cambian con la edad y el desarrollo puberal. Por ejemplo, la pubertad afecta la distribución de grasa corporal y, además, causa una disminución en la sensibilidad a la insulina (aproximadamente un 30%) que se acompaña de un aumento en la secreción de insulina y en los niveles de adiponectina. Finalmente la IDF (International Diabetes Federation) ante la necesidad de realizar una identificación precoz en niños del riesgo de desarrollar un SM, diabetes (DM), o enfermedad cardiovascular (ECV) ha propuesto los criterios definitorios del SM en niños y adolescentes que se indican en la Tabla 1.5 (29).

Grupo de Edad	Obesidad (WC)	Triglicéridos	c-HDL	Presión sanguínea	Glucosa
6-10 años	El SM no puede ser diagnosticado, pero deberían realizarse nuevas determinaciones si existe una historia familiar de SM, DM2, dislipemia, enfermedad cardiovascular, hipertensión y/u obesidad.				
10-16 años	>Percentil 90	>150 mg/dL	<40 mg/dL	Sistólica > 130 mm Hg ó Diastólica > 85 mm Hg	> 100 mg/dL
>16 años	Utilizar los criterios de adultos				

Tabla 1.5. Criterios diagnósticos del Síndrome Metabólico en niños y adolescentes. Tomado de Zimmet et al, 2007 (29). WC: Circunferencia de la cintura.

Los cambios en el desarrollo están relacionados con la edad. Por ello, en la definición, se distinguen grupos de edades (6 a 10 años, 10 a 16 años y mayores de 16 años). En los tres grupos de edad la obesidad abdominal es un factor importante. En los casos de niños menores de 10 años el SM es una entidad que ni debería diagnosticarse, aunque se debería aconsejar pérdida de peso en estos niños. A partir de los 10 años es posible diagnosticar SM, para ello se requiere la presencia de obesidad, medida a través de la circunferencia de la cintura (WC):

WC > percentil 90 para la edad y sexo correspondiente

Más la presencia de dos o más de los siguientes factores:

- Tensión arterial elevada: Presión sistólica > 130 mm Hg o diastólica > 85 mm Hg.
- Triglicéridos >150 mg/dL o hipertrigliceridemia tratada.
- Colesterol HDL < 40 mg/dL.
- Glucemia > 100 mg/dL.

A partir de los 16 años se pueden aplicar los criterios de los adultos. En el caso de niños, la obesidad abdominal puede ser fácilmente estimada usando la medida de WC, la cual se correlaciona más fuertemente con el tejido adiposo visceral que el IMC en niños, y es un fuerte predictor de riesgo cardiovascular (RCV) en niños.

1.1.5. Insulinorresistencia (IR)

La insulinorresistencia (IR) es una condición inherente a la obesidad y constituye la expresión fisiopatológica del SM. Se define como la disminución en la respuesta a

concentraciones normales de insulina, que altera la disponibilidad y utilización de la glucosa (30). Los mecanismos implicados en la IR son la alteración de la secreción de insulina por las células β pancreáticas, elevación de los niveles circulantes de antagonistas de la insulina y disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos diana. Su consecuencia más directa es la disminución de la capacidad de utilización de la glucosa en los tejidos periféricos, especialmente en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (31).

Es decir, la IR es una condición patológica por la cual la insulina, la principal hormona anabólica, ve dificultada su actuación para que las células transformen la glucosa en energía, de manera que el páncreas comienza a producir más insulina para compensar la disminución de su actividad y, en personas genéticamente predispuestas, este cuadro de hiperinsulinemia hace que las células β comiencen a agotarse y claudicar, apareciendo las distintas alteraciones del metabolismo de la glucosa (32,33).

En los estadios iniciales, la tolerancia a la glucosa es normal a pesar de la IR por la función compensadora de las células β . Según progresa la IR y la hiperinsulinemia compensadora, las células β de los islotes pancreáticos se vuelven incapaces de sostener el estado de hiperinsulinemia, lo que conduce a la intolerancia a la glucosa con elevación de la glucosa postprandial y posterior disminución en la secreción de la insulina con aumento en la producción hepática de glucosa y aparición de diabetes; paralelamente, la IR conduce a disminución en la utilización de glucosa por los tejidos sensibles a la insulina (hiperglucemia postprandial) y al aumento en la producción hepática de glucosa (hiperglucemia en ayunas) (33).

Existen diferentes metodologías para el diagnóstico de la IR. La técnica del Clamp Euglucémico Hiperinsulinémico (CEH) es el estándar de oro de los métodos que cuantifican la sensibilidad a la insulina in vivo. Se basa en la infusión endovenosa de una cantidad creciente y previamente establecida de insulina y una cantidad variable de glucosa para mantener la glucosa a un nivel prefijado. Sin embargo, a nivel práctico, los métodos más utilizados para determinar la IR son el test de tolerancia oral a la glucosa y el índice HOMA. El HOMA (Homeostasis Model Assessment) se basa en modelos matemáticos y aporta una medida semicuantitativa de la sensibilidad insulínica (34). Sólo requiere de la determinación de los niveles de insulina y glucosa en ayunas, los cuales se integran en el índice HOMA mediante la fórmula:

$$\text{HOMA} = \text{Insulinemia (mU/mL)} \times \text{Glucemia (mmol/L)} / 22,5$$

El incremento en la incidencia de la IR y la DM tipo 2 en niños aumenta paralelamente con la prevalencia y severidad de la obesidad infantil (35). La relación entre obesidad e IR fue explicada originalmente por la lipotoxicidad (36). Esta teoría propone que la acumulación de grasa en las células musculares y en los hepatocitos interfiere con la señalización de la insulina, generándose un estado de hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. Es bien conocido que el tejido adiposo segrega adipoquinas, algunas de las cuales, como veremos más adelante, actúan inhibiendo la acción de la insulina, mientras que otras como la adiponectina aumentan la sensibilidad a la insulina.

1.1.6. Dislipemia

Se ha descrito que la dislipemia asociada a la obesidad es un predictor del aumento en los factores de riesgo cardiovascular observados en los sujetos obesos. El fenotipo observado en estos pacientes está caracterizado por un aumento en los niveles de TG, un descenso en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un cambio en la composición de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) hacia un fenotipo más pro-aterogénico. Estas alteraciones en el perfil lipoproteico están muy relacionadas con los desequilibrios en el metabolismo de la glucosa y la insulina comentados anteriormente (37,38).

Hemos de tener en cuenta que los triglicéridos y el colesterol además de ser los pilares estructurales que mantienen la integridad de las membranas, son también empleados como fuente de energía y como moléculas de señalización. Al tratarse de moléculas insolubles en agua, se transportan por el torrente sanguíneo unidas a lipoproteínas. La densidad de cada lipoproteína depende de la relación de lípidos y proteínas que esta presenta. Dentro de los distintos tipos de lipoproteínas podemos encontrar las ricas en triglicéridos que incluyen a los quilomicrones que son liberados a la circulación por parte del intestino, o las VLDL, que son secretadas a la circulación desde el hígado. La función de ambas partículas es el transporte y suministro de los triglicéridos (en forma de ácidos grasos) a los tejidos muscular y adiposo (39).

Cuando nos alimentamos, los triglicéridos que ingerimos son digeridos por la lipasa pancreática como paso previo a su absorción en el intestino y su transporte a la circulación en forma de quilomicrones. Estos quilomicrones son los encargados de transportar los TG al tejido

adiposo y muscular, donde serán hidrolizados por la lipoprotein lipasa (LPL) endotelial. Los ácidos grasos no esterificados (NEFA) que se liberan de la hidrólisis de los triglicéridos son almacenados en el tejido adiposo o son usados como fuente de energía por parte del músculo. En este proceso de captación está implicada una LPL que se encuentra en el tejido adiposo y en el músculo, y que está regulada por la acción de la insulina, la cual activa la LPL del tejido adiposo y disminuye la actividad de la LPL muscular durante la alimentación (40,41).

Cuando ayunamos, los ácidos grasos acumulados constituyen la principal fuente de energía y entonces el descenso del cociente insulina/glucagón se encarga de regular la descomposición de los TG por la acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL), liberando ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo (42,43)(Figura 1.1).

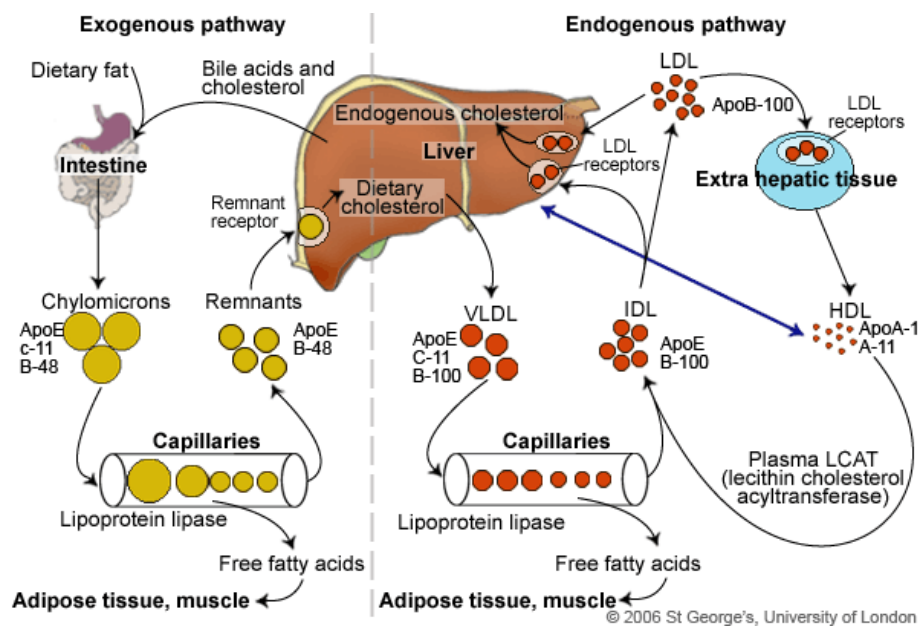


Figura 1.1 Dinámica del metabolismo lipídico. Tomado de

http://www.elu.sgu.ac.uk/rehash/guest/scorm/294/package/content/liver_lipoprotein.html

Los triglicéridos producidos a partir de los ácidos grasos y glicerol también pueden provenir del hígado, con lo cual son liberados al torrente sanguíneo como partículas VLDL. Estos ácidos grasos empleados en el hígado para la formación de triglicéridos pueden poseer un origen plasmático o ser producidos en el propio hígado mediante lipogénesis de novo. Los niveles de ácidos grasos libres en el plasma son los que regulan su captación en el hígado, de modo que si estos son muy abundantes, el hígado no puede incorporarlos a la formación de

VLDL y se acumulan en el hígado como gotas lipídicas (42), consideradas como un orgánulo subcelular activo con múltiples funciones (44).

Los cambios lipídicos asociados con la obesidad son similares a los observados en pacientes con DM2 o IR. De hecho se ha observado que la IR precede al comienzo de la dislipemia en muchos individuos obesos (45). En el estado de IR, se produce una reducción en la eficiencia de la insulina para inhibir la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis) y estimular la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y el tejido adiposo, de modo que se produce una hiperglicemia y una hiperinsulinemia compensatoria. En la IR, la insulina tampoco es capaz de inhibir la lipólisis de triglicéridos por la lipasa sensible a hormonas (HSL) en los depósitos grasos. Como consecuencia, el flujo de ácidos grasos libres (FFAs) al hígado se eleva considerablemente, contribuyendo al aumento de la acumulación grasa dentro del hígado. A su vez, la IR repercute sobre la actividad de la LPL a nivel del árbol vascular, contribuyendo así a aumentar los niveles circulantes de triglicéridos (46).

La obesidad aumenta el riesgo cardiovascular mediante factores como un aumento en los triglicéridos, una disminución en los niveles de c-HDL y elevación de los niveles de c-LDL, así como una elevación en los niveles de glucosa en sangre e insulina. La relación entre los niveles de ácidos grasos libres (FFAs) y la IR, viene dada porque esta IR repercute sobre la actividad de la LPL a nivel vascular, contribuyendo a aumentar los niveles circulantes de triglicéridos (46). Así pues las anormalidades lipídicas presentes en la obesidad y que forman también parte del síndrome metabólico, las unen al proceso de IR provocando que el tejido adiposo sea resistente a los efectos antilipolíticos de la insulina (47).

Estos cambios descritos tienen un gran impacto en el perfil lipídico afectando tanto a los niveles como a la composición de las partículas lipoproteicas. Por ejemplo, las partículas HDL están comúnmente disminuidas tanto en la obesidad como en la hiperinsulinemia (48). Las modificaciones del perfil lipídico son importantes, habiéndose encontrado evidencia de que el proceso de daño aterosclerótico ya está presente en edades tempranas, relacionándose este hecho con los niveles de lipoproteínas, presión sanguínea y obesidad en la infancia y la adolescencia (49,50). Los mecanismos propuestos para relacionar las alteraciones lipídicas, concretamente el papel de los ácidos grasos libres (FFAs), con la instauración y desarrollo del proceso aterosclerótico se resumen en la Figura 1.2 (51).

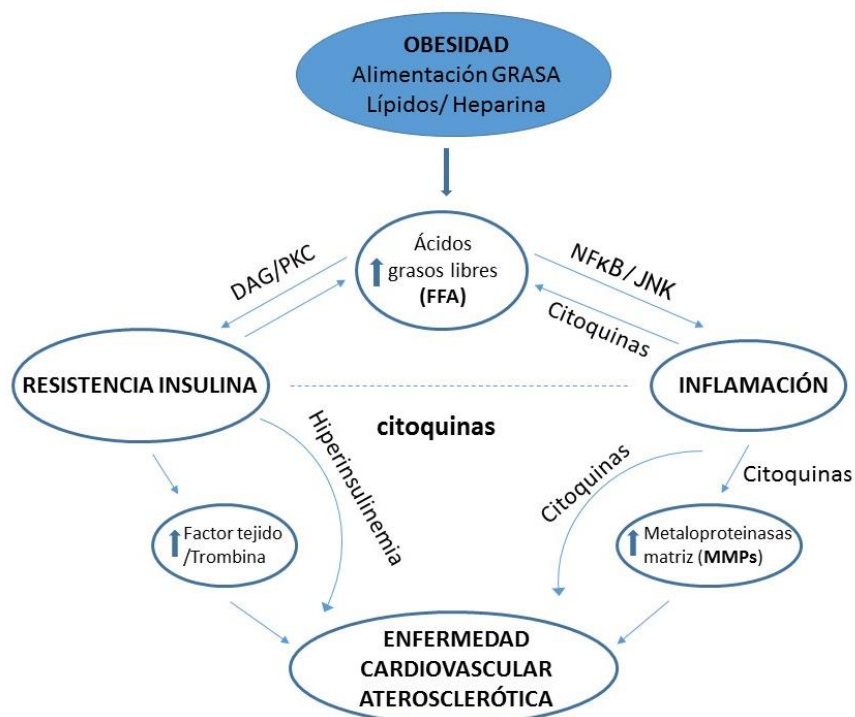


Figura 1.2. Relación entre obesidad, ácidos grasos libres y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. La obesidad, la alimentación grasa así como la infusión de lípidos o heparina elevan los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (FFAs). Esta elevación produce resistencia a insulina (IR) a través de la vía diacilglicerol/protein quinasa C (DAG/PKC), disminuyendo la señalización de la insulina a nivel de sus sustratos receptores (IRS 1/2). La IR promueve enfermedad cardiovascular aterosclerótica al favorecer la hiperinsulinemia crónica, aumento de la tendencia procoagulante y disminución de la fibrinólisis, entre otros mecanismos no mostrados aquí, incluyendo hipertensión y dislipemia aterogénica. La elevación de FFAs también provoca inflamación mediante la activación de las rutas NFκB y JNK. Esta inflamación puede promover enfermedad aterosclerótica cardiovascular al aumentar la producción de citoquinas inflamatorias y activación de las metaloproteinasas de matriz (MMPs). Modificado de Franssen, 2008 (51).

1.1.7. Hipertensión Arterial (HTA)

Hay varios estudios que muestran una relación entre la presencia de obesidad y el desarrollo de HTA (52). Los mecanismos fisiopatológicos que relacionan la obesidad con la HTA son múltiples y entre ellos se encuentran la hiperinsulinemia, IR, aumento de la actividad adrenérgica y de la concentración plasmática de aldosterona, retención de sodio y agua, incremento del gasto cardiaco, alteración de la función endotelial a través de moléculas como leptina y adiponectina, y factores genéticos (53) (Tabla 1.6).

1.1.8. Inflamación y sus indicadores.

Como ya se ha comentado, la obesidad se asocia muy frecuentemente con IR y ésta, a su vez, es la alteración central del Síndrome Metabólico. Esta alteración de la función de la insulina parece ser consecuencia de un estado de inflamación sistémica de bajo grado (57).

El tejido adiposo no tiene únicamente la función de reservorio de energía, sino que además de sus funciones metabólicas es un activo órgano endocrino capaz de sintetizar y secretar enzimas, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. Durante la obesidad se ha observado un cambio importante en el tejido adiposo como es el aumento de macrófagos residentes y que contribuyen a la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de este tejido. Estas moléculas, conocidas como adipocitoquinas o adipoquinas, pueden mediar muchos de los cambios metabólicos del SM, modulando la biología local del adipocito y la del organismo en general (58).

Los adipocitos, estimulados por señales inflamatorias, producen reactantes de fase aguda y mediadores de inflamación. Entre los factores de inflamación expresados se incluyen el TNF- α , IL-6, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), moduladores inflamatorios potentes como leptina, adiponectina y resistina, así como la proteína C reactiva. La determinación de los niveles circulantes de estas moléculas permite evaluar el grado de inflamación (59,60). Aunque el número y tipo de biomarcadores de inflamación se eleva continuamente, nos centraremos brevemente en el papel y mecanismo de acción de los evaluados en el presente estudio.

Las adipoquinas son citoquinas secretadas por el tejido adiposo que participan en la regulación del consumo de energía, en el metabolismo de lípidos y proteínas, el equilibrio glucosa/insulina, el estrés oxidativo, la aterosclerosis, la inflamación y la integridad cardiovascular. Durante la obesidad se produce una expansión del tejido adiposo y una infiltración de macrófagos, produciéndose así una grasa “disfuncional”, caracterizada por alteraciones en la producción y liberación de adipoquinas. Entre las principales y más estudiadas adipoquinas involucradas en la regulación de la homeostasis de la glucosa se encuentran la leptina, adiponectina y resistina (61).

La **leptina** es una hormona proteica de 163 aminoácidos que se produce tanto en los adipocitos como en el hipotálamo, ovarios y placenta y que es un regulador de la homeostasis

de energía del organismo (62). En las personas delgadas cerca del 50% de la leptina está unida a proteínas, mientras que en las personas obesas la mayoría se encuentra en su forma libre (63). Estudios *in vitro* han demostrado que la leptina puede unirse a su receptor expresado en células del sistema inmune, por lo que ocurre la activación, proliferación, maduración y producción de mediadores inflamatorios. Se ha observado que los niveles circulantes de leptina (64) y la expresión de su mRNA (65) están aumentados en el tejido adiposo de sujetos obesos, probablemente debido a la existencia de resistencia a la leptina (62).

La leptina no sólo promueve la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-2 e IFN- γ , sino que también inhibe la producción de citoquinas antiinflamatorias. Además, los niveles circulantes de leptina y su expresión en el tejido adiposo están aumentados en respuesta a citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1). Así pues las interacciones entre la leptina y la inflamación son bidireccionales: las citoquinas proinflamatorias incrementan la síntesis y liberación de leptina, que a su vez contribuye a mantener el estado inflamatorio crónico en la obesidad. A nivel metabólico la leptina está relacionada con la señalización de la insulina, y estudios recientes sugieren que el nivel de leptina en el sujeto diabético obeso, está en relación con el estrés oxidativo (66).

La **adiponectina** es una proteína de 244 aminoácidos que se sintetiza exclusivamente en el tejido adiposo. Su principal función es regular la utilización de la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos, si bien al igual que la leptina es un regulador a largo plazo del apetito y del metabolismo, además de presentar un efecto antiinflamatorio inhibiendo la producción de TNF- α por los macrófagos. A su vez, el TNF- α inhibe su expresión y secreción directamente y posiblemente también al estimular la producción de IL-6, que también inhibe su secreción. Existen evidencias de que está involucrada en la modulación de la sensibilidad a la insulina (67) y que tiene propiedades antiaterogénicas (68).

La expresión y liberación de la adiponectina está estimulada por la insulina y es inhibido por el TNF- α , si bien la adiponectina ejerce su modulación inflamatoria mediante la reducción de la producción y la actividad del TNF- α e IL-6. La adiponectina interviene también en la supresión de las alteraciones inflamatorias mediadas por el TNF- α en la respuesta de las células endoteliales y en la inhibición de la proliferación del músculo liso vascular (69).

Se ha descrito que la adiponectina en cultivos murinos y macrófagos humanos promueve la diferenciación de estos al fenotipo M2 antiinflamatorio.

Varios factores de transcripción implicados en la adipogénesis son capaces de estimular la transcripción del gen de la adiponectina como PPARs, C/EBPs (factores de transcripción críticos para la regulación de la expresión de la adiponectina en respuesta a los nutrientes y durante la diferenciación de los adipocitos). A su vez, esta transcripción puede ser suprimida por la hipoxia, inflamación y represores de transcripción, o puede regularse negativamente por citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-18 al activar varias rutas como la JNK y ERK1/2 (70).

Los niveles de adiponectina se correlacionan inversamente con los valores plasmáticos de triglicéridos y positivamente con los de c-HDL. En estudios recientes se ha visto que en ratones la adiponectina media la supresión de estrés oxidativo y la producción de lípidos (71). La adiponectina ejerce efectos de sensibilización a la insulina vía activación de la AMPK, y facilita la oxidación de los ácidos grasos a través de la activación del PPAR α . Esos efectos están mediados por las proteínas receptoras de membrana AdipoR1 y AdipoR2, que se unen específicamente a la adiponectina y que tienen un papel esencial en la mediación de los efectos de la adiponectina con respecto a la sensibilización a insulina y la supresión de la inflamación o el estrés oxidativo (72).

Los niveles de adiponectina se encuentran disminuidos en situaciones de una mayor cantidad de tejido graso, si bien su descenso no se correlaciona con el grado y la severidad de la resistencia a insulina (73).

La **resistina** es una proteína rica en cisteínas que en roedores juega un papel importante en la obesidad y la IR. Mientras que en roedores el tejido adiposo es la mayor fuente de resistina, en humanos esta molécula es principalmente secretada por monocitos y macrófagos. La resistina fue descrita originalmente como una adipoquina capaz de inducir IR o dañar la sensibilidad a insulina del hígado (74). Es una molécula asociada con la activación de procesos inflamatorios (75) y se sugiere que puede actuar como una molécula efectora que lleva a un estado aterosclerótico, posiblemente a través de varios mecanismos. Se ha visto que tiene efectos directos en la activación de las células endoteliales induciendo la expresión de moléculas de adhesión celular como ICAM-1 y VCAM-1, así como aumentando la adhesión de los leucocitos (76,77). Se ha observado que en cultivos de células endoteliales de arteria coronaria humana, un aumento en la concentración de resistina disminuye la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la producción de óxido nítrico (NO), e incrementa el

estrés oxidativo, sugiriendo que los efectos de la resistina pueden ser mediados por el estrés oxidativo (78).

El **TNF- α** es una molécula directamente implicada en la inflamación sistémica y un inhibidor del apetito. Se produce por una variedad de células entre la que se encuentran macrófagos, linfocitos, células endoteliales, miocitos, fibroblastos, células neuronales y adipocitos.

El TNF- α inhibe la expresión génica de la eNOs de manera tanto transcripcional como post-transcripcional, efecto que puede explicar la disfunción endotelial. Inhibe el incremento de la expresión de eNOS inducido por la insulina contribuyendo a la incapacidad de la insulina de producir vasodilatación en la obesidad y en la DM2. Parece también tener un papel importante en las alteraciones lipídicas asociadas a la IR, de modo que en situaciones de infección/inflamación, incrementa la concentración de triglicéridos mediante la estimulación de la producción de lipoproteínas VLDL (79).

Se ha observado que la producción de TNF- α aumenta a medida que se incrementa la masa de tejido adiposo, y este aumento se correlaciona con el grado de IR (73).

La **Interleuquina-6 (IL-6)** es una citoquina multifuncional producida por diferentes tipos celulares, como células inmunitarias, células endoteliales, fibroblastos, miocitos y tejido adiposo, siendo intermediaria en la respuesta inflamatoria y de estrés.

Es una citoquina que presenta tanto funciones proinflamatorias como antiinflamatorias. Actualmente es considerada el principal factor estimulador de la producción hepática de proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva y el fibrinógeno (80). Su liberación está inducida por IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF- α , además posee efectos antiinflamatorios al ejercer un control parcial sobre la producción de estas moléculas (IL-1 y TNF- α) tanto inhibiendo su secreción como induciendo la liberación del antagonista del receptor de la IL-1 y del receptor soluble del TNF- α . A diferencia de estas moléculas, los efectos de IL-6 en la inmunidad dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble.

Al igual que el TNF- α , la IL-6 reduce la expresión de LPL, efecto importante en la regulación de la captación por parte del tejido adiposo de ácidos grasos libres. Su producción

está aumentada en relación a un incremento del tejido graso, y este aumento está correlacionado con la IR al igual que el TNF- α (73). Esta molécula es producida por las células grasas, si bien la mayor parte de ella deriva de los macrófagos localizados dentro del tejido adiposo, activamente reclutados por la expresión local de la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) (51).

Además de las citoquinas, otra molécula que se relaciona actualmente con el estado de inflamación es la **vitamina D** que puede tener diversos efectos en las células inflamatorias (81). La vitamina D es una vitamina liposoluble, que en un 80-90% se origina en humanos por síntesis en la piel con activación por la luz solar, mientras que el resto es aportado por la alimentación o suplementos alimenticios (82).

En su forma mayoritaria circulante (1,25-dihydroxyvitamina D; 1,25(OH)₂D o calcitriol), además de ser esencial para el desarrollo y mantenimiento del tejido óseo, es responsable de la homeostasis normal del calcio y el fósforo (83,84). También se ha observado que los niveles de vitamina D están relacionados con la diferenciación y proliferación celular y la secreción hormonal al actuar sobre sus receptores que se han encontrado en varios tejidos como cerebro, colon, páncreas, células inmunitarias, entre otros. Además se ha visto que la suficiencia de vitamina D en adultos está asociada con una reducción en el riesgo de ocurrencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes y SM (85), considerándose su deficiencia (definida como concentración sérica de 25-hidroxivitamina D inferior a 50 nmol/L (86)) como un factor importante en la fisiopatología del SM respecto a la afectación del sistema cardiovascular, aumento de la IR y obesidad (87).

El mecanismo por el que la deficiencia en vitamina D afecta a la salud cardiovascular permanece sin esclarecer, principalmente porque está acompañado de cambios en los niveles de la hormona paratiroidea (PTH), calcio y fósforo, que pueden contribuir a las complicaciones vasculares, incluso cuando ocurren dentro de unos valores normales (88).

1.2. ENDOTELIO VASCULAR Y ATEROGÉNESIS

1.2.1. Características y funciones del endotelio vascular

El endotelio vascular desempeña una gran variedad de funciones homeostáticas presentando tanto capacidades sensoriales como efectoras. Las células del endotelio vascular

forman una superficie de comunicación entre el flujo sanguíneo y la pared de los vasos, ejecutando funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis corporal. Este endotelio no sólo proporciona una barrera física no adhesiva y altamente selectiva para controlar la permeabilidad vascular, sino que también produce un gran número de sustancias vasoactivas para regular el tono vascular y la remodelación de la pared de los vasos (89).

El papel del endotelio se ejerce mediante la presencia en sus células de receptores de membrana para diversas moléculas entre las que se incluyen proteínas, partículas transportadoras de lípidos, metabolitos y hormonas; así como a través de proteínas específicas de unión y receptores que activan las interacciones célula-célula y célula-matriz (90). La secreción y captación de sustancias vasoactivas por parte del endotelio ejercen su acción sobre el flujo sanguíneo. Las alteraciones en este endotelio, como las provocadas por focos de inflamación o por un estrés de cizallamiento hidrodinámico elevado, interrumpen esas actividades e inducen a las células endoteliales a producir un microambiente protrombótico y antifibrinolítico. Las funciones homeostáticas del endotelio implican la colaboración de diferentes mecanismos (91).

Una de las funciones del endotelio es la regulación del equilibrio hemostático entre trombosis y trombolisis. En condiciones fisiológicas, el endotelio previene la trombosis mediante mecanismos anticoagulantes y antiplaquetarios. Las células endoteliales presentan fenotipos heterogéneos dependiendo del ambiente o necesidades locales, lo que podría explicar las diferencias en las respuestas patológicas del endotelio a las alteraciones en la integridad vascular (91–93).

Entre los mecanismos por los que las células endoteliales controlan la coagulación se encuentra la regulación de la expresión de receptores de unión para factores anticoagulantes y procoagulantes en la superficie celular. En condiciones normales se mantiene la fluidez sanguínea mediante la actividad de las rutas anticoagulantes, pero tras la activación de las células endoteliales, que puede producirse mediante citoquinas, el balance de las propiedades endoteliales puede desplazarse a favor de la formación del coágulo mediante la inducción de mecanismos procoagulantes y la inhibición de los anticoagulantes. Algunos estudios han sugerido que los productos finales de glicosilación pueden inducir cambios similares en las propiedades coagulantes del endotelio (94).

El endotelio también desempeña un papel importante en la regulación de la interacción con plaquetas y leucocitos. La adhesión de plaquetas y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio son un paso inicial en el proceso que conduce a la extravasación de las células sanguíneas blancas en los sitios de inflamación o infección, la interacción plaquetas-leucocitos y la agregación en la superficie trombogénica para provocar la oclusión vascular. El reclutamiento de plaquetas y leucocitos es una respuesta muy rápida que está mediada por la liberación de componentes preformados en el endotelio entre los que destaca la P-selectina (95).

Los macrófagos pueden caracterizarse como tipo M1 (implicados en procesos proinflamatorios; liberadores de TNF- α , IL-6 e IL-12) o inmunomoduladores y remodeladores del tejido (M2). Estos últimos pueden producir IL-10, citoquina anti-inflamatoria y disminuyen las citoquinas proinflamatorias. En la obesidad inducida por la dieta, al producirse una mayor infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, se produce un cambio en el estado de activación de los mismos de un tipo M2 a un tipo M1 proinflamatorio que contribuye a la IR (70).

Otra de las funciones principales del endotelio es la regulación del tono vascular y crecimiento. La circulación está regulada por las células endoteliales al ejercer éstas de barrera física y de fuente de varias sustancias reguladoras. En este sentido tanto el óxido nítrico (NO) derivado del endotelio como las prostaciclina son liberadas en respuesta a estímulos físicos, hormonas y sustancias derivadas de las plaquetas, todas ellas induciendo la relajación vascular e inhibiendo la función plaquetaria (96). El crecimiento vascular puede estar inhibido por ciertas sustancias liberadas por el endotelio vascular, si bien este endotelio también puede dar lugar a sustancias vasoactivas como el NO, la endotelina y la angiotensina que a su vez pueden participar en la regulación del crecimiento vascular. La alteración de esos sistemas reguladores dependientes del endotelio es un rasgo inherente a las enfermedades cardiovasculares y al síndrome metabólico (97).

El endotelio también está implicado en la formación de vasos sanguíneos regulando la proliferación celular y la angiogénesis. En este punto cabe destacar el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) que es un factor de crecimiento específico del endotelio vascular y que es el conductor crítico de la neo-formación vascular (98).

1.2.2. Disfunción endotelial

El término disfunción endotelial hace referencia a la pérdida de las propiedades reguladoras del endotelio en los procesos anteriormente mencionados. Se caracteriza por un cambio en las propiedades del endotelio que provoca un descenso en la vasodilatación, un estado proinflamatorio y propiedades protrombóticas (99).

El estrés oxidativo, la inflamación y el descenso de la biodisponibilidad de óxido nítrico son las principales rutas mediante las cuales los factores de riesgo ejercen sus efectos deletéreos sobre los vasos sanguíneos y promueven la disfunción endotelial (Figura 1.4). En condiciones fisiológicas los niveles corporales de antioxidantes (endógenos y exógenos) resultan suficientes para mantener el nivel de radicales libres dentro su rango adecuado de actuación. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, como pueden ser la obesidad, las defensas antioxidantes pueden resultar insuficientes y los radicales libres pueden provocar un desequilibrio en los niveles y acción del NO, dañar el endotelio y dejarlo permeable. Una de esas proteínas puede ser la proteína C-reactiva, que es producida por el hígado y que está relacionada con la inflamación. En este punto en el que se produce la disfunción endotelial las funciones normales del endotelio están reducidas (100).

Las principales fuentes vasculares generadoras de especies reactivas del oxígeno (ROS) son la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y los enzimas mitocondriales, así como la óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada, estado en el que el enzima produce superóxido en lugar de óxido nítrico. El cambio en el fenotipo vascular hacia un estado inflamatorio y protrombótico(90) se postula que es debido a un descenso en el óxido nítrico biodisponible, aumentándose así la producción de moléculas de adhesión de leucocitos como VCAM-1 y citoquinas como la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) (90).

El aumento de la proteína C-reactiva producida en condiciones inflamatorias disminuye la producción de NO mediada por eNOS, al disminuir la estabilidad de su mensajero (101). Además de esta proteína, también las LDL oxidadas disminuyen la expresión de la eNOS, así como los lípidos y oxidantes disminuyen la biodisponibilidad de NO dañando la estructura de la caveola y activando rutas proinflamatorias como las mediadas por NfκB. Además, en respuesta a la inflamación, se liberan mediadores como IL-1 y TNF-α por los monocitos y células endoteliales contribuyendo al proceso aterogénico (90).

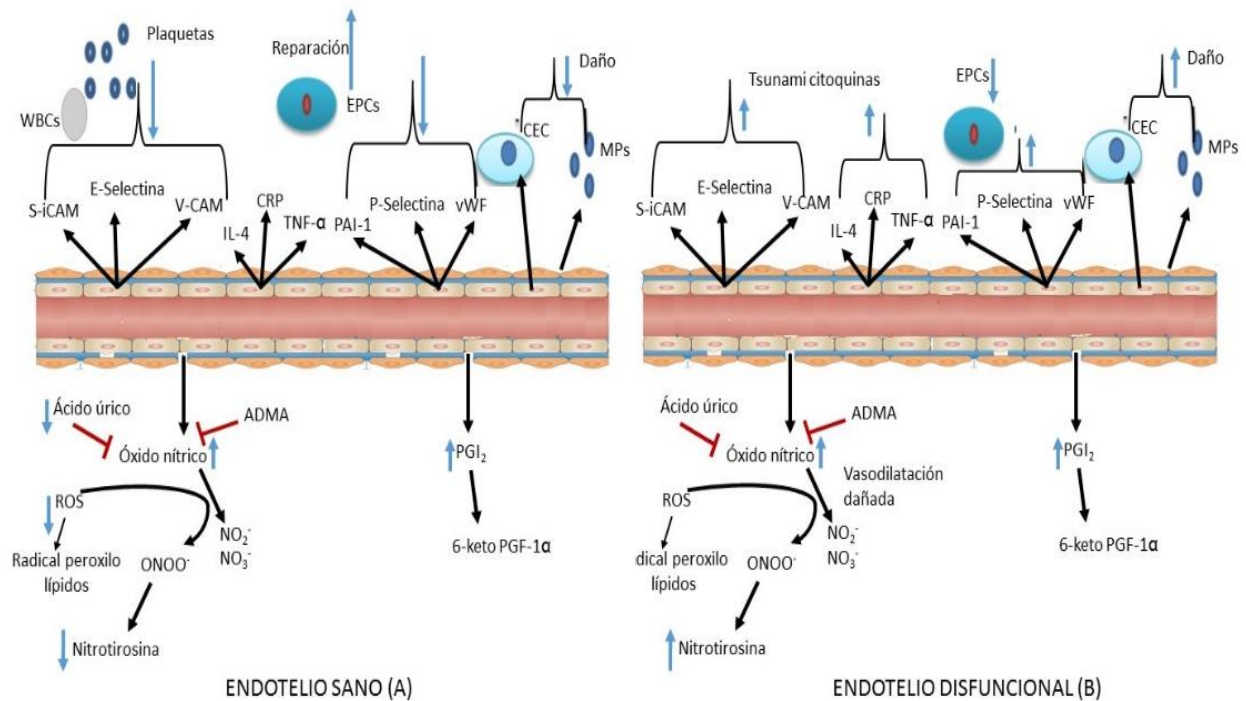


Figura 1.4. Endotelio y disfunción endotelial. El endotelio sano media la vasodilatación, y suprime activamente la trombosis, la inflamación vascular y la hipertrofia. El esquema representa las diferencias entre un endotelio sano (A) y uno disfuncional (B). El endotelio sano presenta un fenotipo vasodilatador caracterizado por altos niveles de vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI_2) y bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido úrico. Un endotelio sano también presenta un fenotipo anticoagulante consistente en niveles bajos de PAI-1, factor de von Willebrand (vWF) y P-selectina. Puede presentar un bajo grado de inflamación, como se indica por bajos niveles de molécula vascular soluble de adhesión celular (sVCAM), molécula de adhesión intercelular soluble (sICAM), E-selectina, proteína C-reactiva (CRP), factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), e interleuquina-6 (IL-6). Finalmente, la población de células progenitoras vasculares es alta (EOCs, indicadoras de la capacidad de reparación vascular), mientras que los niveles de micropartículas endoteliales (EMPs) y células endoteliales circulantes (CECs), indicativas del estrés/daño endotelial, son bajas. En el caso del endotelio disfuncional, las características fenotípicas incluyen una vasodilatación dañada, un aumento tanto del estrés oxidativo como del ácido úrico, de los radicales de peróxido lipídicos, de nitrotirosina y óxido nítrico y un fenotipo procoagulante y proinflamatorio con un descenso de la capacidad de reparación vascular y un aumento del número de EMPs y CECs. Modificado de Rajendran, 2013 (90).

La producción de NO puede también estar reducida por inhibidores endógenos. De hecho, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo endógeno de la unión de L-arginina a la eNOS y, por lo tanto, puede tener un papel en la desregulación de la ruta L-arginina/NO. Un aumento en los niveles de TNF- α se ha visto que inhibe la degradación de ADMA, lo que puede representar un mecanismo importante por el que la obesidad puede alterar la biología del NO (102).

1.3. METABOLISMO DE LA ARGININA

Entre los componentes de la dieta cuya ingesta parece afectar el riesgo cardiovascular se encuentra el aminoácido arginina. En los últimos años, numerosos artículos relacionan a la arginina y sus metabolitos con el desarrollo, aparición y progresión de la enfermedad cardiovascular, tanto en humanos como en animales de experimentación. De hecho, uno de sus metabolitos biológicamente activos es el óxido nítrico cuya relevancia en la funcionalidad vascular ya sido reseñada. La relación entre disponibilidad de arginina y producción de óxido nítrico aumenta la importancia de este aminoácido (103).

La arginina es un aminoácido semiesencial o condicionalmente esencial que puede provenir tanto de la ingesta dietaria, como de la ruptura de las proteínas corporales o de la producción endógena de novo. Esta producción de novo implica la conversión dentro del denominado eje intestino-renal de citrulina en arginina (producción intestinal de citrulina y síntesis renal de arginina) catalizada por los enzimas argininosuccinato sintasa (ASS) y argininosuccinato liasa (ASL) (Figura 1.5).

La arginina es un aminoácido constituyente de las proteínas y, como tal, es requerida en la síntesis proteica, principalmente a partir de aminoácidos reciclados de la ruptura proteolítica. Además, la arginina tiene un papel importante en otras rutas metabólicas catalizadas por varios sistemas enzimáticos (Figura 1.6).

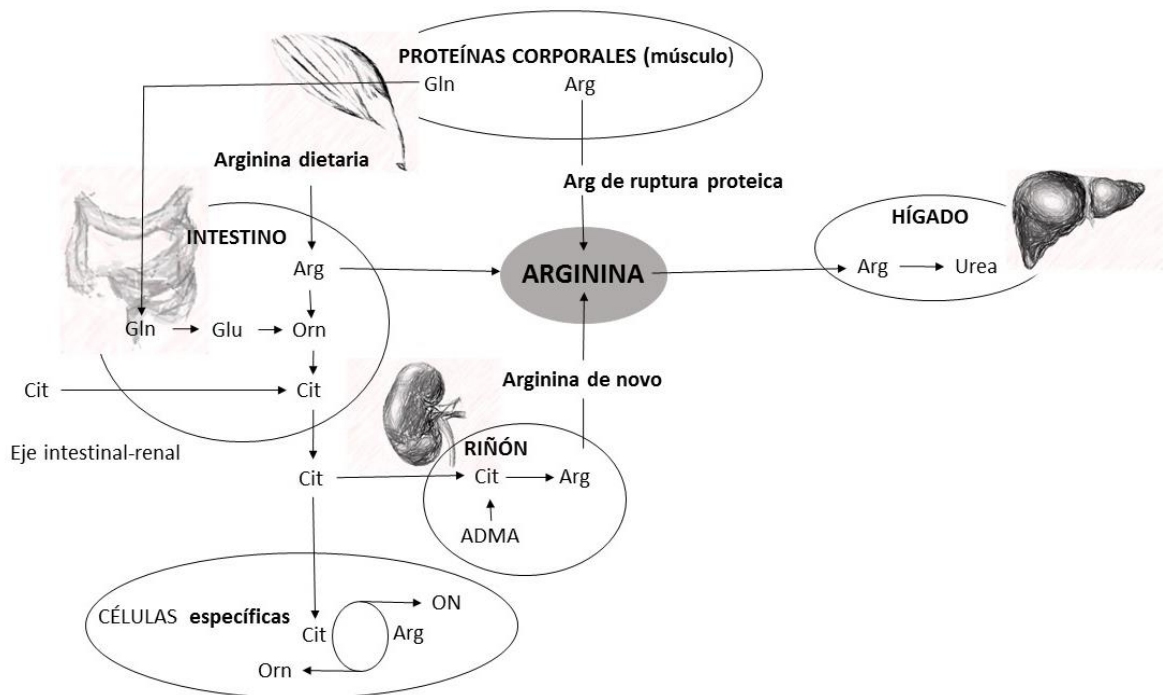


Figura 1.5. Orígenes y destinos de la arginina. Tomada de Luiking, 2012 (103).

La arginina es transportada dentro de las células endoteliales por un transporte facilitado mediado por el sistema γ^+ (104). El rango de concentraciones intracelulares de arginina en las células endoteliales está entre 0,1 y 0,8 mM (105). En las células endoteliales la arginina puede convertirse en citrulina y óxido nítrico, o en L-ornitina y urea. Ciertas evidencias sugieren que hay una compleja compartimentalización de la arginina dentro de las células endoteliales: un compartimento es accesible para las óxido nítrico sintasas (NOS); en otro compartimento tiene lugar el reciclaje de citrulina a arginina y, en un compartimento adicional, la arginina deriva de la ruptura de las proteínas. Su metabolismo está muy compartimentalizado pues los enzimas implicados se expresan en diferentes órganos, aunque en diferentes cantidades, a excepción del hígado que contiene todos los enzimas necesarios para el ciclo de la urea, si bien la arginina hepática no se libera al plasma (103).

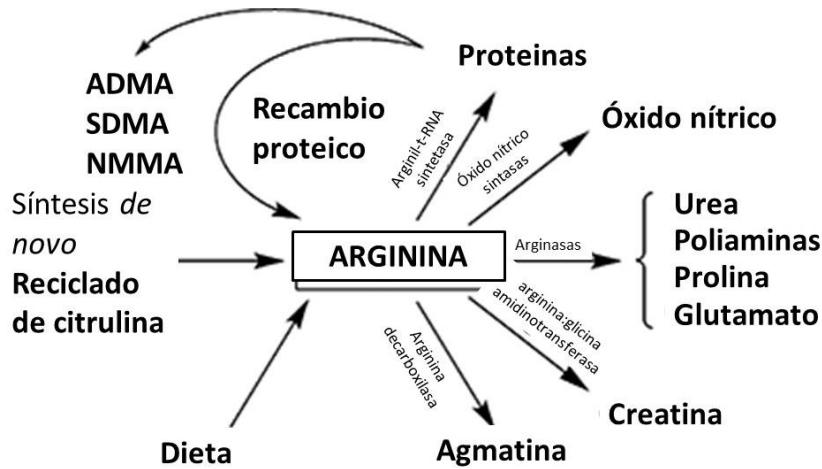


Figura 1.6. Destinos metabólicos de la arginina. Tomada de Morris, 2009 (106).

El ciclo de la urea consiste en una serie de cinco reacciones, en las que la síntesis de urea es el paso final en la detoxificación del amonio. Otros papeles de la arginina están relacionados con sus metabolitos, entre los que se incluyen la ornitina y las poliaminas derivadas (putrescina, espermidina y espermina), importantes en el crecimiento celular y diferenciación; la prolina que es hidroxilada a hidroxiprolina postranscripcionalmente y que tiene un importante papel en la formación de colágeno, en la reparación tisular y en la cicatrización de heridas; la creatinina que está implicada en el metabolismo energético en el músculo y las neuronas; el óxido nítrico que presenta varios papeles en la fisiología normal como neurotransmisor y vasodilatador, así como funciones reguladoras del sistema inmune (107,108).

Se ha observado que el metabolismo de la arginina está alterado en estados de enfermedad con respecto tanto a su síntesis como a su catabolismo. Se propone la obesidad como una enfermedad inflamatoria (109) caracterizada por la disfunción de las células endoteliales vasculares y una disminución de la producción de óxido nítrico (NO) (110–112). La arginina es la precursora de, entre otras muchas sustancias, el óxido nítrico, una molécula de señalización ampliamente distribuida en el sistema cardiovascular que protege del inicio y progresión de la arterioesclerosis mediante múltiples vías. Previene de la adhesión y agregación de las células sanguíneas y plaquetas a lo largo del endotelio (113,114). Es un potente inhibidor de la proliferación de la musculatura lisa vascular. Es un potente

antioxidante que puede tener efectos antiinflamatorios eliminando algunas especies reactivas del oxígeno y puede prevenir la oxidación del colesterol LDL y así retardar la progresión de la arterioesclerosis (115).

1.3.1. Óxido Nítrico (NO)

La conversión de arginina en óxido nítrico (NO) es catalizada por una familia de enzimas, las óxido nítrico sintasas (NOS) de las cuales se han identificado tres isoformas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y la forma inducible o inflamatoria (iNOS). Las dos primeras isoformas sintetizan NO en pequeñas cantidades en condiciones basales, si bien la isoforma inducible puede producir 1000 veces más NO que la endotelial al ser estimulada por citoquinas inflamatorias (116)

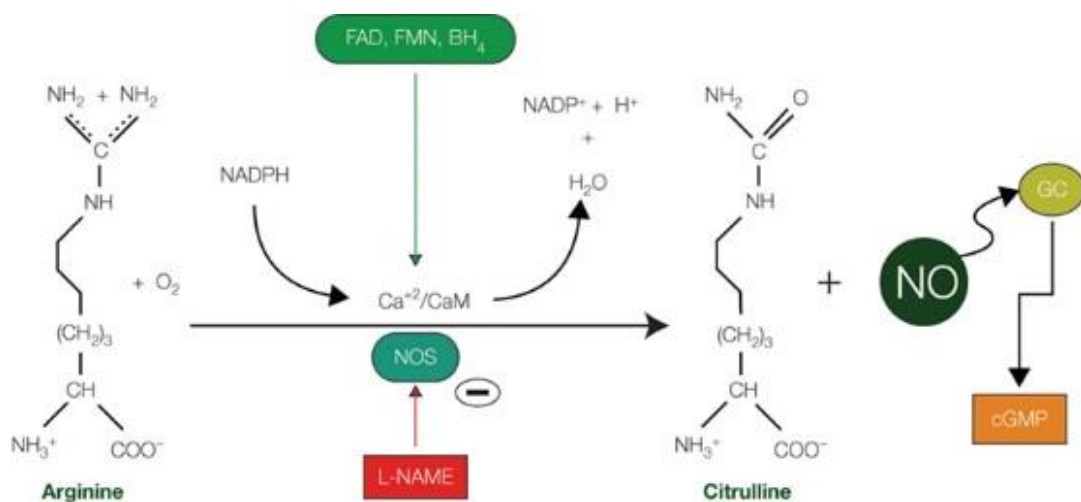


Figura 1.7. Síntesis de óxido nítrico. La figura muestra la síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de arginina y O_2 catalizada por las óxido nítrico sintasas (NOS). La reacción requiere como cofactores NADPH, FMN, FAD y tetrahidrobiopterina (BH_4). La síntesis de NO puede ser inhibida farmacológicamente por L-NAME, un inhibidor tanto de la nNOS como de la eNOS. Los efectos biológicos del NO (vasodilatación, inhibición de la proliferación del músculo liso vascular) están mediados por activación de la guanilato ciclasa soluble (GC) y consiguiente elevación de los niveles de cGMP. Abreviaturas: Ca^{+2}/CaM : Calcio/calmodulina; cGMP: guanosin monofosfato cíclico; GC: guanilato ciclasa. Modificado de Freire, 2009 (117).

Los diferentes isoenzimas de NOS presentan un 50% de homología de secuencia, y catalizan una reacción oxidativa, dependiente NADPH y O₂, mediante la cual se generan óxido nítrico y citrulina a partir de la L-arginina (Figuras 1.7 y 1.8). Estos enzimas necesitan la presencia de un cofactor esencial que es la tetrahidrobiopterina (BH₄). La actividad también es dependiente de la unión de calmodulina. Además, la actividad de eNOS puede también estar regulada por modificaciones post-traduccionales.

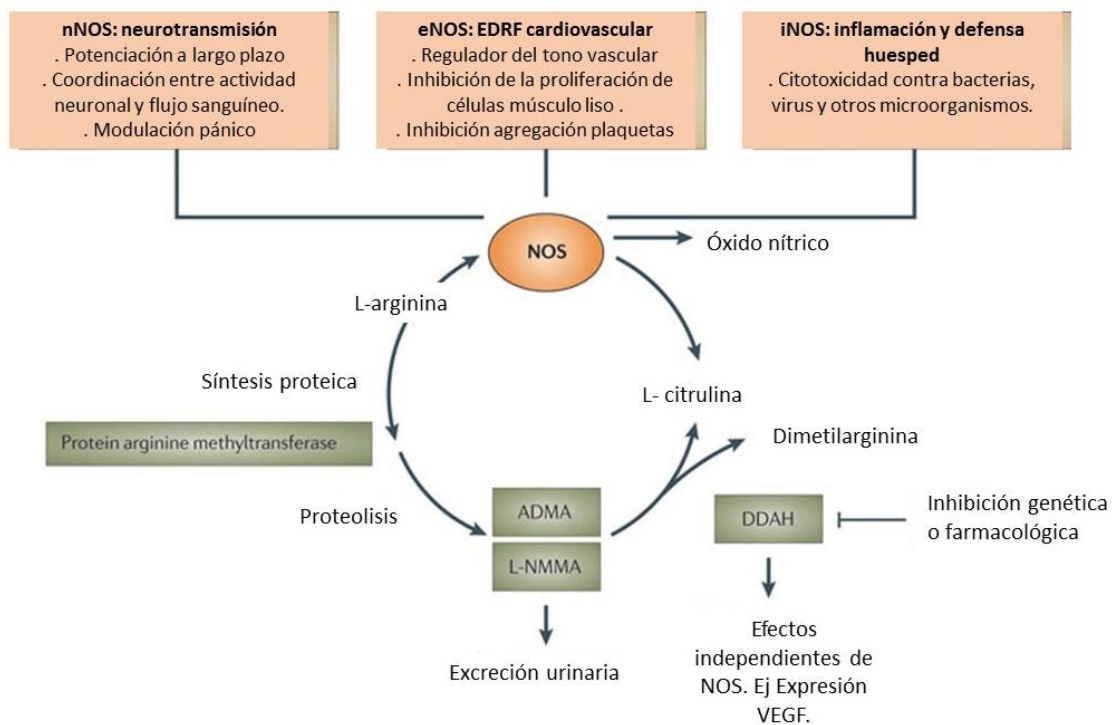


Figura 1.8. Isoformas y funciones fisiológicas de las NOS. La síntesis de óxido nítrico (NO) en mamíferos está catalizada por tres isoformas del enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que presentan diferentes distribuciones tisulares: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS). El sustrato para las tres isoformas es la L-arginina. Los residuos de arginina de las proteínas pueden ser metilados por las arginina metiltransferasas y, tras proteólisis, liberar metilargininas. Las metilargininas asimétricas (ADMA y L-NMMA) son inhibidores competitivos de todas las isoformas de NOS, y sus niveles dependen de su catabolismo por la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) y de su excreción renal. Estos enzimas pueden ejercer efectos fisiológicos mediante rutas independientes de las NOS, como la regulación de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). EDRF, factor de relajación derivado del endotelio; SMC, células de músculo liso. Modificado de Leiper, 2011 (118).

La acción del NO es muy sensible a la presencia de radicales libres, principalmente el superóxido, que se combina con el NO para dar lugar a peroxinitrito, una reacción que provoca la inhibición de los procesos mediados por el NO y aumenta el daño oxidativo (119). Esta pérdida en la biodisponibilidad del NO es un punto clave de la disfunción endotelial.

En la obesidad existe un amplio consenso sobre la importancia del estrés oxidativo como elemento favorecedor de la aterosclerosis y otros efectos metabólicos adversos a través de la desregulación de la acción de las citoquinas y la inflamación (58). Sin embargo, existen datos contradictorios en relación al metabolismo del NO y sus alteraciones en la obesidad (120). Así, Gomes et al. describen que pacientes adultos con síndrome metabólico presentan concentraciones menores de los indicadores de formación de óxido nítrico (121). Igualmente, la obesidad juvenil se ha asociado con un descenso en los metabolitos relacionados con el NO en suero (122). Sin embargo, otros autores han encontrado resultados dispares, al tiempo que evidencian asociación entre elevados niveles séricos de metabolitos del NO y el grupo de componentes del síndrome metabólico en estudios epidemiológicos tanto en adultos (123) como en niños (124). Entre los mecanismos que podrían explicar la reducción de NO bioactivo se encontrarían un aumento en la reacción entre el NO y el O_2^- , un descenso en la síntesis de NO debido a cambios en la actividad de la eNOS (por ejemplo por desacoplamiento), o descenso en la producción de NO debido a cambios en la expresión del enzima. También podría deberse a un descenso en el sustrato de las NOs, la arginina, debido a un aumento de la actividad arginasa que puede contribuir a la disfunción endotelial.

1.3.2. Poliaminas

Además de ser el sustrato para la síntesis del óxido nítrico la L-arginina, a través de la ornitina, es también precursora de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina; Figura 1.9), moléculas policatiónicas cuyas principales características son interaccionar con moléculas cargadas negativamente como el DNA, el RNA o las proteínas. Dada su gran afinidad por unirse a otras moléculas, están relacionadas con muchas funciones como son el crecimiento celular, la supervivencia y la proliferación. Niveles elevados de poliaminas se han observado en pacientes con enfermedades neoplásicas, en las que se han propuesto como marcadores de enfermedad. Debido a la importancia de sus funciones en las células, sus niveles intracelulares están altamente regulados a través de un cuidadoso entramado en el que colaboran procesos de biosíntesis, degradación, exportación y captación (125).

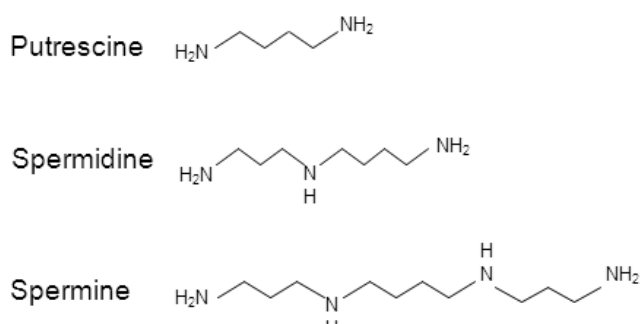


Figura 1.9: Estructura química de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina.

Las poliaminas del organismo provienen de tres fuentes primarias: ingesta de alimentos que las contienen, síntesis por la microbiota intestinal y síntesis orgánica. La biosíntesis celular las poliaminas requiere de los aminoácidos arginina, ornitina y metionina, siendo el primer paso de la vía la generación de ornitina a partir de arginina por la arginasa mitocondrial (Figura 1.10). La ornitina generada en esta reacción es decarboxilada por la ornitina decarboxilasa (ODC) para generar putrescina, la primera de las poliaminas. A continuación la espermidina y espermina sintetas convierten la putrescina en espermidina y ésta en espermina mediante la incorporación secuencial de dos grupos aminopropilo procedentes de la S-adenosil metionina decarboxilada (dcAdoMet). La síntesis de dcAdoMet requiere de metionina que, una vez convertida en S-adenosil-L-metionina (AdoMet), es decarboxilada por la AdoMet decarboxilasa (AdoMetDC).

Las poliaminas espermidina y espermina pueden de nuevo ser convertidas a putrescina (Figura 1.10). El enzima limitante en la retroconversión y catabolismo de las poliaminas es la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT), un enzima citosólico que cataliza la transferencia de grupos acetilo desde el acetil-coenzima A a la espermidina y espermina. Las poliaminas acetiladas son transportadas al peroxisoma donde son sustrato de la poliamina oxidasa (PAO) que genera, como subproductos de la oxidación, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y acetaminopropanal. La acetilación reduce la carga positiva de las poliaminas y, con ello, disminuye su capacidad de interacción electrostática con las moléculas biológicas. Al mismo tiempo las hace más susceptibles a la exportación celular y catabolismo (126).

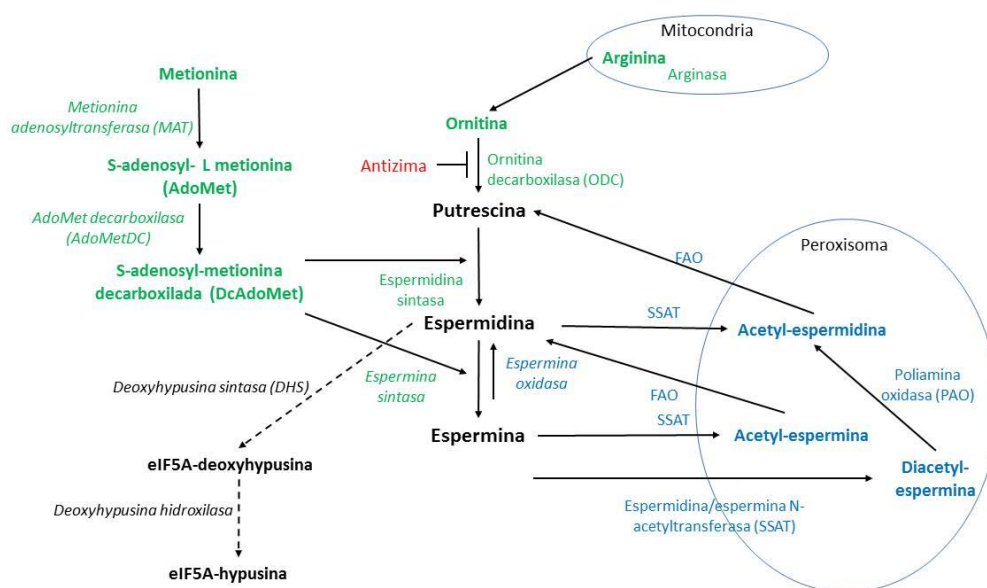


Figura 1.10. Vías de síntesis, interconversión y catabolismo de las poliaminas. Modificado de Minois, 2011 (127). Verde: biosíntesis; azul: catabolismo; rojo: proteína inhibidora; negro: síntesis de eIF5A a partir de espermidina.

Existe actualmente un renovado interés en el metabolismo de las poliaminas tras describirse su posible implicación en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adiposo. En un estudio reciente en ratones knockout para SSAT se ha observado que la delección de este enzima provoca un aumento exagerado de peso (128). Este y otros estudios muestran una clara relación entre la homeostasis de poliaminas y el metabolismo energético en el tejido graso, de modo que perturbaciones en el metabolismo de las poliaminas puede contribuir al desarrollo de obesidad.

Otra característica importante de las poliaminas es que pueden ser importadas o exportadas de las células en función de las necesidades celulares. Se ha descrito la presencia de un transportador de diaminas en las células epiteliales del colon que podría estar implicado en la exportación de putrescina y los derivados acetilados de las poliaminas. Sin embargo, no existen datos concluyentes sobre la naturaleza y características del transportador de poliaminas en mamíferos (129).

Existe una relación próxima entre el metabolismo de las poliaminas y el del óxido nítrico a través del aminoácido arginina (Figura 1.11). La arginasa es el enzima central que hidroliza la arginina a ornitina, y que compite con la NOS por la arginina, redirigiendo el

metabolismo hacia la formación de poliaminas. La regulación al alza de la arginasa podría llevar a un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (130).

Ciertos estudios en plantas y animales de experimentación han implicado a las poliaminas en la resistencia al estrés, en la regulación del crecimiento y muerte celular, así como con procesos inflamatorios. Por lo tanto, pueden estar relacionadas con multitud de procesos patológicos. Se han observado elevaciones en los niveles de poliaminas en ciertas enfermedades (particularmente en el cáncer), si bien los resultados difieren según el modelo animal estudiado y la enfermedad e, incluso en una misma patología, diferentes poliaminas pueden tener significados diferentes (127). De hecho, el potencial papel anti-inflamatorio de las poliaminas ha llevado a algunos autores a hipotetizar que la ingesta de poliaminas podría ayudar en las enfermedades cardiovasculares (131).

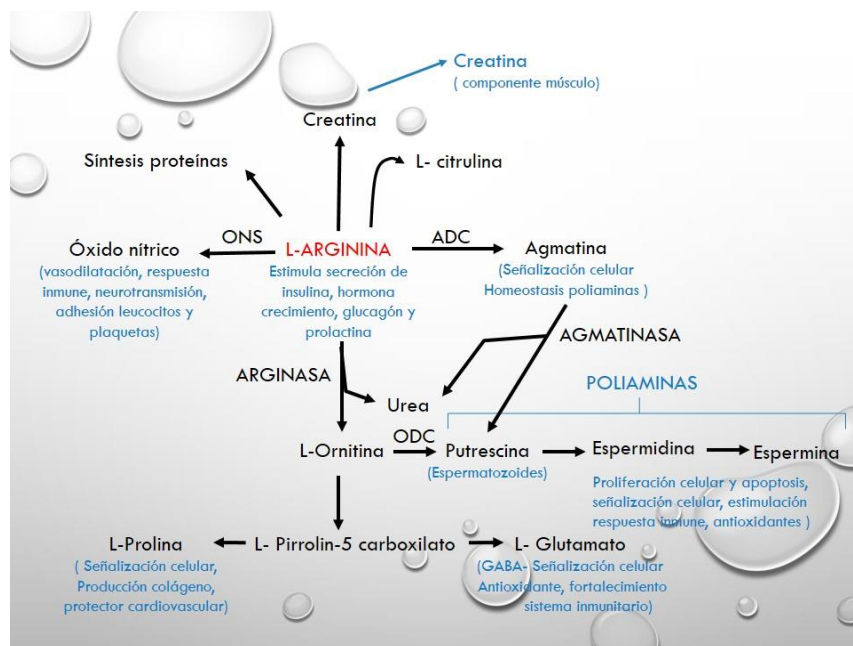


Figura 1.11. La arginina como precursora del óxido nítrico y de las poliaminas.

Los mecanismos de acción propuestos para las poliaminas son múltiples y se ilustran en la Figura 1.12. Dada su naturaleza catiónica, las poliaminas pueden unirse al DNA y cambiar su conformación, efecto que les permite modular la estructura de la cromatina y la expresión génica. También se ha descrito inducción de la autofagia por espermidina, efecto que implica a

esta poliamina en la degradación de macromoléculas intracelulares y orgánulos. Respecto al efecto de las poliaminas sobre las rutas de señalización, se ha observado que la quinasa CK2 (ubicuamente expresada) es sensible a los cambios en los niveles de las poliaminas y de transferir la información a la ruta de las MAP quinasas (MAPK) para desencadenar la respuesta celular apropiada. Otros procesos ampliamente relacionados con las poliaminas son el crecimiento celular, apoptosis y necrosis (127).

Se han descrito alteraciones en el metabolismo de las poliaminas asociadas a disfunción mitocondrial, el lugar primario en la producción de energía celular. Estas anomalías mitocondriales se han relacionado con la predisposición al desarrollo de desórdenes metabólicos comunes como la DM2 y la obesidad (132).

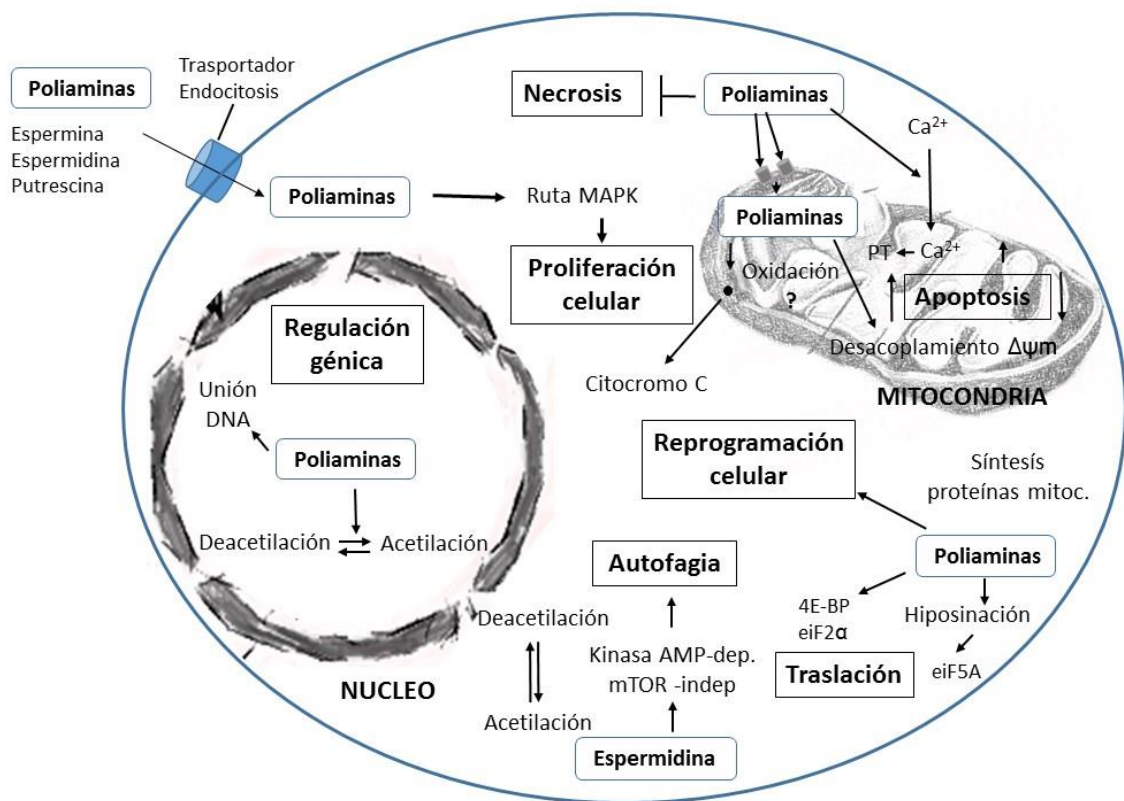


Figura 1.12. Mecanismos de acción propuestos para las poliaminas. Las acciones de las poliaminas se extienden a citoplasma, núcleo y mitocondria. Las poliaminas regulan la muerte y proliferación celular y la síntesis de proteínas a nivel transcripcional y traduccional. Datos recientes apoyan el papel de las poliaminas en la reprogramación celular y la regulación de la autofagia. Modificado de Minois, 2011 (127).

1.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El término estrés oxidativo refiere al desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad de detoxificación de las mismas o de reparar el daño resultante de su actuación sobre los componentes biológicos. Los desequilibrios en el estado redox normal de las células pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y otras especies reactivas que acaban dañando a los componentes celulares como son las proteínas, los lípidos y el DNA. Es decir, las ROS son capaces de iniciar una cadena de eventos que dan como resultado lesión celular (133,134).

Entre las ROS se encuentran radicales libres y especies del oxígeno reactivas pero no radicalarias. Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados en su orbital externo (135). Las principales especies radicalarias implicadas en el daño celular por estrés oxidativo son el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$). Entre las especies de oxígeno no radicalarias se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) (134). La generación de estas especies es acelerada por la presencia de metales de transición como el Fe y el Cu y enzimas específicas, como las monooxigenasas y ciertas oxidasas (136) (Figura 1.13).

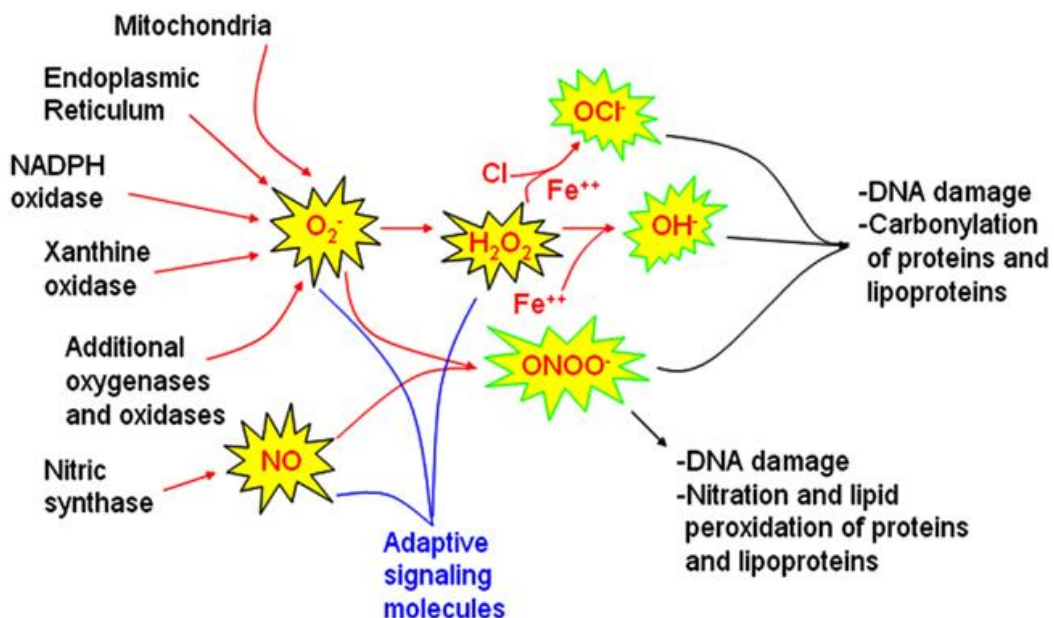


Figura 1.13. Fuentes de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno implicadas en las rutas de señalización y daño. Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO); peróxido de hidrógeno (H_2O_2); hipoclorito (OCl^-), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y peroxinitrito ($ONOO^-$). Tomado de Zhang, 2012 (137).

Las ROS se generan continuamente en el organismo en las reacciones bioquímicas de oxidorreducción (Redox) en las que participa el oxígeno, y que forman parte del metabolismo normal de las células. También son generadas por los fagocitos durante las reacciones inflamatorias controladas y, también en ocasiones, como respuesta a la exposición a radiaciones ionizantes, rayos UVA, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, hiperóxia y exceso de ejercicio e isquemia (138).

La generación controlada de ROS desempeña multitud de funciones fisiológicas a través de diferentes vías de señalización sensibles al estado redox (139). Sin embargo, su producción o eliminación incontroladas se relacionan con numerosas patologías. Por lo tanto, el estrés y el daño oxidativo subsiguiente sólo cobran significado patológico cuando la generación de ROS supera la capacidad de las defensas antioxidantes del organismo.

Tanto la obesidad como el SM son dos condiciones que se acompañan de estrés oxidativo e inflamación subclínica, ambas implicadas en el desarrollo de la aterosclerosis. Además, el estrés oxidativo tiene un papel importante en la patogénesis de las alteraciones vasculares, ya que puede detonar o exacerbar los procesos bioquímicos que acompañan al SM. La hiperglucemia y la inflamación, componentes importantes del SM, aumentan la producción de ROS a nivel vascular y generan estrés oxidativo por sobre-activación de la NADPH oxidasa. Esto provoca un descenso en los niveles disponibles de NO (140).

Bajo condiciones fisiológicas, la generación de NO excede a la producción de $O_2^{\bullet-}$ que es rápidamente neutralizado por los sistemas antioxidantes. En el caso de la disfunción endotelial, la producción de $O_2^{\bullet-}$ excede a la de NO, favoreciéndose así la reacción entre ambos para formar peroxinitrito. Ésta es una especie altamente oxidante que, junto al exceso de otras ROS, provocaran daño oxidativo generalizado a las moléculas biológicas (140).

Una de las aproximaciones más utilizadas para valorar la extensión y consecuencias del estrés oxidativo in vivo e in vitro es la cuantificación de los productos generados por el daño oxidativo de las biomoléculas, los denominados biomarcadores de estrés oxidativo (140). Entre los biomarcadores más utilizados se encuentran el malondialdehído (MDA) y la isoprostaglandina $F_2\alpha$ como indicadores de peroxidación lipídica (88,89); los grupos carbonilo y los productos avanzados de oxidación proteica (AOPPs) como indicadores del daño oxidativo inferido a las proteínas (143); y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG) como producto de oxidación de DNA (141). La evaluación de otros productos, como los resultantes de las

modificaciones de carbohidratos, tiene particular relevancia en el contexto de la patología diabética (144). La cuantificación de LDL oxidada es también un excelente biomarcador, aunque de más compleja determinación, de la peroxidación lipídica. La oxidación de las LDL se produce en el interior de las paredes de los vasos y, una vez oxidado, puede escapar al reconocimiento de los receptores y volver a la circulación haciendo posible su determinación en plasma (145,146).

Estudios realizados por el grupo de Morrow et al en la década de los 90 llevaron a la identificación de los isoprostanos como marcador de peroxidación lipídica. Éstos son una familia de isómeros tipo prostaglandinas que se generan como resultado del ataque por radicales libres del ácido araquidónico esterificado con fosfolípidos en las membranas celulares (147). Diferentes tipos de isoprostanos se generan preferentemente bajo condiciones de estrés oxidativo (148). Por ejemplo, niveles elevados de isoprostanos se han descrito en ratas deficientes en vitamina E y selenio, así como en estudios de reperfusión en sujetos tras terapia trombolítica (149). Niveles elevados de isoprostanos en plasma y orina han sido asociados con otros factores de riesgo cardiovascular como son diabetes tipo 1 y 2 e hipercolesterolemia, habiéndose encontrado también en lesiones ateroscleróticas (150). Mediante técnicas de inmunoensayo, Davi et al han referido elevaciones significativas y específicas del isoprostano $iPF_2\alpha\text{-III}$ (F_2 -isoprostano) en pacientes hipercolesterolémicos (151). Por otra parte Reilly et al (152), han descrito una fuerte relación entre hipercolesterolemia e incremento en la peroxidación lipídica (evaluada por los niveles de isoprostanos en orina y en las LDL) en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigota y con hipercolesterolemia moderada.

En la obesidad, durante la expansión de los depósitos grasos, los adipocitos generan gran cantidad de ROS que promueven un aumento en la expresión y secreción de adipoquinas inflamatorias (153–155). Tanto en el tejido adiposo como en los tejidos periféricos, el estrés oxidativo desencadena IR, una de las señas de identidad de la obesidad y muchas de sus comorbilidades, incluyendo la hipertensión.

El aumento del estrés oxidativo en el tejido adiposo es uno de los eventos más tempranos en el desarrollo del SM en la obesidad (156). Por otro lado, la pérdida de peso por restricción calórica y/o ejercicio puede mejorar el estado de estrés oxidativo (157). No obstante, no se conoce bien la relación causa-efecto entre el estrés oxidativo y la obesidad. La

activación de la NADPH oxidasa es la que más contribuye al estrés oxidativo en muchos tejidos, incluyendo el tejido adiposo y la vasculatura (156,158,159). Contrariamente, algunos factores que causan estrés oxidativo, como la angiotensina II que induce IR, no induce necesariamente ganancia de peso (160).

En base a los datos anteriormente reseñados, nos hemos planteado en este estudio profundizar en las bases bioquímicas y moleculares que conectan la obesidad con el riesgo cardiovascular en sus estadios iniciales; evaluar en la población infantil obesa la presencia de diferentes marcadores que podrían ser indicativos de alteraciones tempranas y daño precoz a distintos niveles y, particularmente, a nivel vascular. La constatación de estas alteraciones y la identificación de sus marcadores precoces podrían orientar tanto en la evaluación del ulterior riesgo cardiovascular de los pacientes, así como en la eficacia de las diferentes opciones terapéuticas. La cada vez mayor prevalencia de la obesidad infantil, el hecho de que predisponga fuertemente al desarrollo de numerosas patologías en la edad adulta, así como la escasez de estudios centrados en la población pediátrica creemos que justifican sobradamente la realización del presente estudio.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los objetivos planteados en el presente estudio han sido:

- Valorar el grado de obesidad en una muestra de niños obesos y normonutridos mediante diferentes índices de adiposidad (índice de masa corporal, índice cintura-cadera y porcentaje de masa grasa por impedanciometría bioeléctrica).
- Determinar y comparar en estos mismos pacientes, diferentes parámetros de la clínica rutinaria relacionados con el riesgo cardiovascular.
- Determinar y comparar, en niños obesos y normonutridos, la producción global de óxido nítrico a través de la medida de nitrato y nitrito, y los niveles sanguíneos de moléculas relacionadas como son las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, como parámetros indicadores del metabolismo de la arginina.
- Valorar y comparar el estrés nitrosativo mediante los niveles de nitrotirosina.
- Determinar y comparar en los mismos pacientes, el daño oxidativo a lípidos (mediante la cuantificación de malondialdehído e isoprostanos) y a proteínas (cuantificación de grupos sulfidriilo proteicos y productos avanzados de oxidación proteica (AOPPs)).
- Determinar y comparar en los pacientes los niveles de diversas citoquinas y moléculas relacionadas con los procesos de inflamación (proteína C-reactiva, adiponectina, leptina, resistina, IL-6, TNF- α y mieloperoxidasa) y funcionalidad endotelial (sICAM-1, sVCAM-1, E-selectina) y que relacionan la obesidad con la resistencia a la insulina y desarrollo de aterosclerosis.
- Determinar y comparar, en los niños obesos y normonutridos, otros parámetros que se han relacionado con el riesgo cardiovascular y el síndrome metabólico como es el caso de la vitamina D, hormona paratiroidea y niveles de calcio y fósforo séricos.
- Correlacionar los marcadores del metabolismo de la arginina, estrés oxidativo y nitrosativo, niveles de vitamina D y resistina con los parámetros antropométricos y de riesgo cardiovascular.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO: PACIENTES

El presente trabajo se basa en un estudio descriptivo observacional de casos y controles, transversal, sobre una muestra poblacional total de 110 niños con edades comprendidas entre los 7-14 años de edad. El grupo de casos ha estado constituido por niños obesos seleccionados entre los remitidos a la Unidad de Pediatría del Hospital Dr. Peset para participar en un programa de pérdida de peso para pacientes externos. El criterio para su selección fue la presencia de obesidad valorada a través del Índice de Masa Corporal (BMI) propuesto por Cole et al para niños (9) y estandarizado por el z-score o el SDS-BMI, tomando como referencia las curvas españolas de crecimiento (161). El grupo control lo constituían niños sanos que fueron reclutados por médicos de atención primaria durante chequeos médicos rutinarios. El estado puberal de los niños se valoró mediante inspección y palpación en cada paciente por el pediatra de acuerdo con los criterios de Marshall y Tanner (162). Todos los sujetos participantes en el estudio son caucásicos y descendientes de españoles.

Los criterios de exclusión utilizados en la selección de los pacientes han sido la presencia concomitante de enfermedades infecciosas agudas o inflamatorias, síndromes genéticos, alteraciones endocrinas, alergias crónicas, así como la toma de suplementos vitamínicos o antioxidantes.

Previamente a la inclusión de los pacientes en el estudio se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres, así como el consentimiento oral de los niños. Tras su inclusión en el estudio, todos los pacientes recibieron instrucciones para seguir una dieta restrictiva en nitrato (verduras de hoja verde, carnes curadas y salchichas) y poliaminas (quesos fermentados) durante los 3 días previos a la toma de muestras de sangre y orina, con el fin de evitar interferencias en las determinaciones de estos parámetros debidas a la dieta.

La realización del presente estudio ha sido aprobada por el Comité de Ética del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

2.2. MEDIDAS Y DETERMINACIONES

2.2.1. Medidas antropométricas

El día de su inclusión en el estudio se elaboró una historia clínica completa de cada paciente y se sometió a éstos a un examen físico detallado para obtener los parámetros

antropométricos. Las medidas del peso y la altura de los pacientes se obtuvieron con los niños ligeramente vestidos y descalzos, de acuerdo con un protocolo estandarizado. La circunferencia de cintura (WC) se midió en el abdomen en el punto más estrecho entre la caja torácica y el borde superior de la cresta ilíaca. La circunferencia de cadera (HC) se midió estando el niño en ropa interior al nivel del diámetro más ancho alrededor de las nalgas usando una cinta métrica flexible no elástica, redondeándose las medidas al 0,1 cm más próximo. Los valores calculados para el Índice de Masa Corporal (BMI) se han expresado mediante la puntuación z referida a edad y sexo (161), considerándose obesidad un BMI superior a 2,5 desviaciones estándar de la media para edad y sexo (161).

El porcentaje de masa grasa se valoró mediante impedancia bioeléctrica de 8 canales empleando un analizador de la composición corporal segmental Tanita BC-418MA (Tanita Europe BV, Hoofddorp, Holanda). Los valores porcentuales de masa grasa y los de circunferencia de cintura (WC; distribución de la masa grasa) se normalizaron respecto al percentil 50 estándar para edad y sexo (masa grasa relativa). Otros indicadores utilizados de la distribución de la masa grasa han sido los índices circunferencia cintura/cadera (WC/HC) y cintura (WC)/altura. Un WC \geq p90 ajustado por edad y sexo y una relación WC/altura \geq 0,5 han sido los criterios adoptados para la consideración de obesidad central (29).

La tensión arterial se midió con un esfigmomanómetro automático (Dinamp 200; Ge Medical Systems Information Technologies, Inc., Milwaukee, WI, USA) tomándose la media de tres medidas, y se expresó como la puntuación z de acuerdo con las tablas proporcionadas por el "Task Force Report". Se consideró criterio de hipertensión (HTA) un valor de presión arterial \geq p95 ajustado para la talla, edad y sexo (163).

El estadio puberal se determinó en cada paciente por inspección y palpación por el pediatra de acuerdo con los criterios de Marshall y Tanner (162).

2.2.2. Toma de muestras biológicas y procesamiento

Todas las determinaciones del presente estudio se han realizado sobre muestras de sangre y orina. Éstas se obtuvieron, simultáneamente, junto a los análisis clínicos rutinarios para las determinaciones de parámetros experimentales, por el personal especializado del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Las muestras de sangre se obtuvieron entre las 8-10 h de la mañana tras al menos 12 horas de ayuno. Las

muestras de orina se recogieron en contenedores estériles transcurridas 2 horas de la primera micción matutina. En todos los casos, las muestras de sangre y orina fueron inmediatamente procesadas en función de los análisis y parámetros a determinar. Las muestras para la determinación de los parámetros clínicos se derivaron inmediatamente al Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset.

Para la determinación de los parámetros experimentales, las muestras de sangre total heparinizada se centrifugaron inmediatamente (600 x g durante 10 min) para la obtención del plasma, el cual fue rápidamente transferido a tubos eppendorf en pequeñas alícuotas (200-500 μ L) que se mantuvieron a -80°C hasta los correspondientes análisis. Paralelamente, 500 μ L de sangre total se mezclaron en un tubo eppendorf con 50 μ L de HClO_4 4 mol/L y 10 μ L de 1 mmol/L 1,6-diaminohexano (estándar interno). La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex y, tras 15 minutos a $0-4^{\circ}\text{C}$ para precipitar las proteínas, se centrifugó a 15000 x g 10 min. El sobrenadante ácido así obtenido se transfirió a otro tubo eppendorf que se mantuvo a -80°C hasta la determinación de poliaminas. Las muestras de orina se centrifugaron (600 x g; 10 min) y el sobrenadante se alicuotó (500 μ L/tubo) en tubos eppendorf que se conservaron a -80°C hasta las correspondientes determinaciones. Las muestras finales obtenidas se trasladaron y mantuvieron a -80°C en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular hasta su utilización (\leq 6 meses). En todos los casos, la determinación de los diferentes parámetros experimentales se realizó por suplicado en muestras descongeladas una sola vez.

2.2.3. Determinaciones clínicas y criterios de riesgo metabólico

La mayor parte de los parámetros clínicos se determinaron y valoraron mediante procedimientos rutinarios estandarizados en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset. Nuestro perfil de bioquímica sanguínea incluyó la determinación de glucosa, colesterol total, c-LDL, c-HDL, triglicéridos, creatinina, calcio, fósforo, ácido úrico y apoproteínas A1 y B mediante métodos rutinarios automatizados para el Aeroset System[®] (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania). La insulina, homocisteína y ácido fólico se cuantificaron mediante inmunoensayos de electroquimioluminiscencia automatizados para el sistema Architect c800[®] (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania). La determinación de la proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) se realizó mediante nefelometría cinética (Image Nephelometer[®], Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA).

Las determinaciones de los niveles séricos de 25(OH)-vitamina D (25(OH)D) y hormona paratiroidea “intacta” (iPTH) se realizaron en el Laboratorio de Patología Molecular y Bioquímica Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Su cuantificación se realizó mediante inmunoensayos electroquimioluminiscentes automatizados en un analizador Modular Analytics E170. Tanto los reactivos como el analizador fueron suministrados por Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania). En la determinación de vitamina D se utilizó el ensayo Elecsys de cuantificación total y su correspondiente sistema de calibración CalSet. El coeficiente de variación entre ensayos, estimado a través de los controles de calidad suministrados por el fabricante (PreciControl Bone; Elecsys Systems, Roche Diagnostics GmbH) estuvo entre el 8,7 y el 11,4%. De acuerdo con los valores totales de 25(OH)D obtenidos, el nivel de vitamina D de los pacientes se consideró como suficiente (>20 ng/mL) o insuficiente (<20 ng/mL) (163).

La resistencia a la insulina se valoró a través del cociente glucosa/insulina ($[\text{mg/dL}]/[\mu\text{U/mL}]$) en ayunas (FGIR) o, más habitualmente, mediante el índice HOMA calculado matemáticamente a través de la fórmula $\text{HOMA-IR} = \text{niveles de insulina en ayunas (IU/L)} \times \text{glucosa en ayunas (mmol/L)} / 22.5$. La tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) se calculó a partir de la creatinina plasmática de acuerdo con la fórmula de Léger ($\text{eGFR (mL/min)} = [56,7 \times \text{peso corporal (kg)} + 0,142 \times \text{altura}^2 \text{ (cm)}] / \text{creatinina } (\mu\text{M})$), y corregido por la superficie corporal $\times 1,73 \text{ m}^2$.

Ante la falta de criterios universalmente aceptados para estimar el riesgo metabólico en niños, en este trabajo se han considerado las mismas variables de factores de riesgo definidas para adultos, y que están basadas en criterios análogos a los del consenso de la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) (29). Así, las siguientes variables (factores de riesgo metabólico; MRF) han sido consideradas en nuestros análisis.

1. La adiposidad central: $\text{WC} \geq \text{p90}$ para edad y sexo y relación $\text{WC/altura} \geq 0,5$.
2. Alteración del metabolismo de la glucosa: glucosa en ayunas $\geq 5,55$ mmol/L [100 mg/dL] o resistencia insulínica definida por un índice $\text{HOMA-IR} \geq 3,16$ o un valor de FGIR ≤ 6 .
3. Dislipemia: $\text{c-HDL} \leq 1,03$ mmol/L [40 mg/dL] o $\text{TG} \geq 1,24$ mmol/L [110 mg/dL].
4. Hipertensión: presión arterial sistólica o diastólica $>\text{p95}$ para edad y sexo.

Se ha considerado que los niños obesos presentaban un riesgo metabólico elevado cuando coincidían en ellos al menos cuatro de los factores anteriormente indicados (MRFs \geq 4).

2.2.4. Determinaciones experimentales

La cuantificación de todos los parámetros relacionados con el metabolismo de la arginina y el estrés oxidativo y nitrosativo se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Salvo que se indique expresamente, todos los reactivos usados en las determinaciones fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA) y Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania).

2.2.4.1. Parámetros del metabolismo de la arginina

Los parámetros del metabolismo de la arginina evaluados en este estudio han sido la producción de óxido nítrico y los niveles circulantes de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina.

Evaluación de la producción de Óxido Nítrico (NO): Las características de reactividad y labilidad del óxido nítrico prácticamente imposibilitan su cuantificación directa en los sistemas biológicos con fines rutinarios. En solución acuosa, el NO reacciona rápidamente con el oxígeno molecular generando nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) como productos finales estables que se acumulan en plasma y se excretan finalmente por la orina. Salvo en casos de infección, la práctica totalidad del NO urinario se encuentra en forma de NO_3^- . Sin embargo, en el plasma, NO_2^- y NO_3^- se encuentran en proporciones variables, y los niveles de nitrato exceden a los de nitrito en, al menos, un orden de magnitud. Este hecho dificulta considerablemente la determinación de nitrito por lo que, a fines prácticos, se recurre habitualmente a la determinación conjunta de ambos metabolitos (NOx) como indicador global de la producción de NO. Resaltar, en este sentido, que los procedimientos para determinar nitrato se basan en su conversión previa a nitrito (reducción química o enzimática) que es el producto finalmente cuantificado (164). En nuestro estudio hemos cuantificado separadamente los niveles de nitrato y nitrito en plasma, y los niveles urinarios conjuntos de ambos productos finales de excreción del NO.

Los niveles plasmáticos y urinarios de NO_x (nitrito + nitrato) se han cuantificado en nuestro estudio utilizando una modificación en placa del clásico ensayo de Griess. Brevemente, el ensayo implica la conversión enzimática del nitrato en nitrito con nitrato reductasa de *Aspergillus spp*, seguido de la cuantificación colorimétrica del nitrito mediante el reactivo de Griess (1 g/L de sulfanilamida, 0,1 g/L de N-(1-naftil)etilendiamina y 25 g/L de ácido fosfórico). El cromóforo formado entre el nitrito y los componentes del reactivo presenta una fuerte absorción a 540 nm ($\epsilon = 39,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que fue cuantificada mediante un lector de placas Multiskan EX (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finlandia). Las condiciones del ensayo fueron esencialmente las descritas por Moshage et al (164) que, en nuestro estudio, tuvo un límite de detección del orden de 1,5 μM . Todas las muestras se ensayaron por duplicado, estableciéndose su nivel de NO_x mediante interpolación de los valores de absorbancia en una curva patrón construida con cantidades conocidas de nitrato (0-300 μM). Puesto que los valores obtenidos representan la suma total de nitrato + nitrito (NO_x), de ellos deberán sustraerse los de nitrito para establecer los de nitrato en plasma. Dado que nuestras muestras de orina no provienen de recogida de 24 h, los niveles urinarios de NO_x se expresan relativos a los de creatinina ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina) (UNO_3/UCr).

Debido a su baja concentración respecto al nitrato, los niveles plasmáticos de nitrito se cuantificaron mediante un ensayo fluorescente, de mayor sensibilidad, basado en el uso del reactivo 2,3-diaminonaftaleno (DAN) (kit No 780051; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). El DAN, bajo condiciones ácidas, forma con el nitrito un producto fluorescente (2,3-naftotriazole) cuya intensidad se ve muy incrementada bajo las condiciones alcalinas finales del ensayo (165). La fluorescencia se cuantificó mediante el lector de placas Spectra MAX Plus 384 GEMINI XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) funcionando a longitudes de onda de excitación y emisión de, respectivamente, 375 y 415 nm. Para eliminar interferencias, las muestras de plasma se ultrafiltraron previamente mediante filtros de corte para 10 kDa de peso molecular (Microcon Ultracel YM-10; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) bajo centrifugación (14,000 x g, 120 min, 15°C); el volumen de plasma ultrafiltrado en el ensayo final nunca superó los 10 μL ; y, además, en todo el procedimiento sólo se utilizó material de plástico previamente lavado con agua ultrapura (Milli-Q). Bajo estas condiciones, nuestro ensayo resultó lineal en el rango de concentraciones de nitrito entre 0–3,85 $\mu\text{mol}/\text{L}$, con un límite de detección de 0,05 $\mu\text{mol}/\text{L}$.

Determinación de poliaminas: Los niveles de putrescina, espermidina y espermina se cuantificaron en los extractos ácidos de sangre total (véase apartado 2.2.2) de acuerdo con el procedimiento previamente descrito (166). En esencia, se trata de la separación y cuantificación mediante HPLC de los derivados fluorescentes generados por reacción de las poliaminas con cloruro de dansilo.

Para la obtención de los derivados dansilados de las poliaminas se mezclaron 100 µL de los sobrenadantes ácidos con 400 µL de cloruro de dansilo (10 g/L en acetona) y 200 µL de una solución saturada de carbonato sódico. Las mezclas se dejaron reaccionar en oscuridad a 55°C durante 90 min con agitación ocasional. Transcurrido este tiempo, se añadieron a cada mezcla 100 µL de una solución de L-prolina (100 g/L) y se continuó con la incubación en las condiciones descritas durante 30 min adicionales para eliminar el exceso de cloruro de dansilo. A continuación, los derivados dansilados de las poliaminas se extrajeron con tolueno (700 µL), se concentraron mediante evaporación bajo vacío hasta sequedad, y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su cuantificación cromatográfica mediante HPLC. En el momento del análisis, los residuos se disolvieron en 100 µL de acetonitrilo, se centrifugaron (15000 x g, 3 min), y se inyectaron 20 µL del sobrenadante en el sistema cromatográfico. Todos los análisis se realizaron por duplicado y se acompañaron del procesamiento paralelo de una muestra patrón con cantidades conocidas de las tres poliaminas a determinar.

En el análisis por HPLC de los derivados dansilados de las poliaminas se utilizó un sistema cromatográfico Waters (Milford, MA, USA) equipado con una columna de fase reversa (Nova-Pak C₁₈; 3,9 x 150 mm; 4 µm de tamaño de partícula; Waters) y precolumna de las mismas características (Nova-Pak C₁₈; 3,9 x 20 mm; 4 µm; Waters). En este sistema, la separación de las poliaminas se realizó mediante un gradiente lineal de 50 min entre una mezcla de acetonitrilo/agua (60:40) y 100% acetonitrilo a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y TA. La detección de la fluorescencia se realizó a longitudes de onda de excitación y emisión fijadas a 338 y 510 nm, respectivamente. La identificación de los derivados dansilados de la putrescina, espermidina y espermina se realizó por los tiempos de retención y su cuantificación por comparación con las muestras patrón procesadas en paralelo con las muestras experimentales de sangre. El nivel de poliaminas en cada muestra individual se corrigió para la recuperación estimada por el patrón interno añadido de 1,6-diaminohexano. Habitualmente esta recuperación fue superior al 90%. En la **Figura 2.1.** se muestran

cromatogramas representativos de una muestra patrón y extractos de sangre total procesados por el procedimiento descrito.

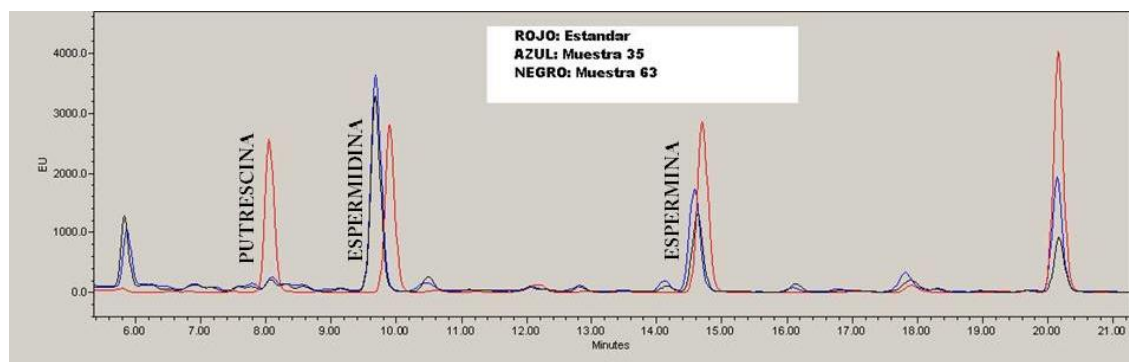


Figura 2.1. Cromatogramas ilustrativos de muestra patrón y de sangre total. Se indican los tiempos de retención (min) de cada poliamina y su nombre correspondiente. La cantidad de putrescina, espermidina y espermina inyectadas en la muestra patrón fue de 0,25 nmoles.

2.2.4.2. Parámetros de estrés oxidativo y nitrosativo

El estrés oxidativo se ha valorado en nuestro estudio cuantificando diferentes productos resultantes del daño oxidativo inferido a las moléculas biológicas por los radicales libres. Los denominados biomarcadores de daño oxidativo. En este estudio hemos valorado los niveles de TBARM, MDA y 8-isoprostanos como marcadores de peroxidación lipídica. Los de AOPPs, mAOPPs y grupos SH como indicadores del daño oxidativo a proteínas. La nitrotirosina como indicador de estrés nitrosativo, y la MPO como indicador general de estrés vascular. Todos los marcadores se han determinado en las muestras de plasma procesadas inmediatamente tras la obtención de la sangre, mantenidas a -80°C durante un periodo máximo de 6 meses, sometidas a una única descongelación (véase apartado 2.2.2), y clarificadas por centrifugación ($15000 \times g$, 2 min, TA).

Determinación de TBARM y MDA: El MDA es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y uno de los marcadores de daño oxidativo más fiables y ampliamente utilizados. Su cuantificación está basada en su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido, mediante la que se genera un complejo coloreado cuantificable por espectrofotometría a 532 nm ($\epsilon=1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Sin embargo, la reacción con TBA no es específica para el MDA y, a no ser que se proceda a la separación ulterior de los productos de la reacción, lo que se cuantifica es el material reactivo con TBA (TBARM). La cuantificación específica del MDA puede

realizarse mediante la separación ulterior del aducto MDA-TBA por HPLC. En nuestro estudio hemos utilizado ambas aproximaciones experimentales.

La cuantificación plasmática de MDA como TBARM se realizó espectrofotométricamente a 532 nm tras reacción con TBA bajo condiciones ácidas de acuerdo con las condiciones descritas por Santos et al (167). En los ensayos se utilizaron 50 μ L de plasma o patrón (Tetrametoxipropano, TMP; 0-200 μ M) en un volumen total de ensayo de 1 mL. Para la cuantificación, los valores de absorbancia a 532 nm de las muestras se interpolaron en la curva patrón de TMP realizada paralelamente.

La determinación específica de MDA mediante HPLC se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en Wong et al (168). En esencia, para la obtención del complejo TBA₂-MDA se mezclaron 50 μ L de plasma o estándar (1-50 μ M TMP) con 500 μ L de tampón acetato sódico 2 M pH 3,5 conteniendo TBA 0,2% (p/v). Las mezclas se incubaron 60 min a 95°C para hidrolizar los lipoperóxidos, liberar el MDA, y favorecer su conjugación con el TBA. A continuación las muestras se clarificaron por precipitación y centrifugación, y 25 μ L del sobrenadante obtenido se inyectaron en el sistema cromatográfico para la cuantificación del complejo TBA₂-MDA por HPLC. Ésta se realizó en un sistema Waters provisto una columna de fase reversa Spherisorb C₁₈ (4,6 \times 250 mm, 5 μ m) lavada y acondicionada con acetonitrilo/agua (80/20). El complejo TBA₂-MDA se eluyó isocráticamente de la columna con una mezcla de tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.8/acetonitrilo (90/10) a 1,2 mL/min y TA. Su detección se realizó espectrofotométricamente a 532 nm y se identificó por su tiempo de retención (2-2,2 min) determinado en las muestras patrón procesadas paralelamente. Para la cuantificación se relativizó el área del pico a la de los patrones. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Determinación de 8-isoprostanos: Los isoprostanos son una familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación aleatoria de fosfolípidos tisulares por ROS. Son moléculas habituales en plasma y orina en condiciones fisiológicas pero sus niveles se elevan considerablemente por el estrés oxidativo. Uno de los isoprostanos, 8-iso-prostaglandina F_{2 α} (8-isoprostano), se ha visto que presenta actividad biológica, y ha sido propuesto como marcador de la deficiencia antioxidante y el estrés oxidativo.

Los niveles de 8-isoprostaglandina F_{2 α} (8-isoprostanos) se analizaron en muestras de plasma clarificadas por centrifugación mediante enzoinmunoensayo competitivo utilizando

el kit comercial Nº 516351 8-isoprostane EIA de Cayman (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Se trata de un EIA diseñado para placas basado en la competición entre los 8-isoprostanos de la muestra y un conjugado de 8-isoprostano-acetilcolinesterasa (utilizado como trazador) por un número limitado de sitios de unión presentes en un antisuero de conejo específico frente a 8-isoprostanos. La cantidad de 8-isoprostano-acetilcolinesterasa unido se visualiza al añadir a los pocillos el reactivo de Ellman (Figura 2.2) que contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa. El producto de esta reacción enzimática absorbe fuertemente a 412 nm, longitud de onda que se utilizó para su cuantificación espectrofotométrica en un lector Multiskan EX (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finlandia). Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos siguiendo estrictamente las condiciones del fabricante.

Determinación de Productos Avanzados de Oxidación Proteica (AOPPs): Witko-Sarsat en 1996 (169) introdujeron el término “productos avanzados de oxidación proteica” (AOPPs), para referir a la mezcla de productos de agregación, fragmentación y oxidación generados en las proteínas como consecuencia de la actuación sobre éstas de las ROS. Su componente mayoritario son proteínas con un alto contenido en grupos carbonilo (-CO), uno de los parámetros más ampliamente utilizados de oxidación proteica (170). Sin embargo, a diferencia de la complejidad práctica que supone la cuantificación de los grupos carbonilo proteicos, los AOPPs pueden ser fácilmente valorados gracias a su capacidad de reacción con el yoduro potásico en medio ácido para generar yodo diatómico. Esta reacción va acompañada de un aumento de la absorción a 340 nm que puede ser utilizado para su cuantificación espectrofotométrica, procedimiento que ha sido utilizado en el presente estudio (169).

De forma simplificada, 1 mL de plasma diluido 1:5 en tampón fosfato (10 mmol/L, pH 7.4) o soluciones estándar de cloramina-T (0-100 $\mu\text{mol/L}$) se mezclaron directamente en cubetas de espectrofotómetro con 50 μL de yoduro potásico (1,16 mol/L) y, tras agitación vigorosa, se determinó su absorbancia a 340 nm. A continuación se añadieron a la cubeta 100 μL de ácido acético glacial y, tras agitación, se hizo un nuevo registro inmediato de la absorbancia a la misma longitud de onda. La diferencia de absorbancia se utilizó para cuantificar la concentración de AOPPs por interpolación en la curva patrón de cloramina T realizada paralelamente al desarrollo de las muestras y en las mismas condiciones. Las concentraciones de AOPPs se expresan en $\mu\text{mol/L}$ equivalentes de cloramina-T.

Con el fin de estimar las interferencias en el ensayo debidas a la presencia de lípidos, 500 μL de plasma se delipidaron utilizando 50 μL de una mezcla de 10 g/L de sulfato de dextrano (Dextralipid 50; Sigma-Aldrich Química S.A, Madrid, España) y 1 mol/L de sulfato magnésico (Sigma-Aldrich Química S.A, Madrid, España). La mezcla se centrifugó durante 20 min a 1000 x g (171) y el sobrenadante se utilizó para la determinación de AOPPs por el procedimiento indicado previamente. Salvo que se indique expresamente, los valores de AOPPs del presente estudio refieren a los obtenidos en muestras delipidadas y se identifican como mAOPPs.

Determinación de grupos –SH proteicos: Otra de las consecuencias del ataque de las proteínas por ROS es la pérdida (oxidación) de grupos –SH libres. Al margen de sus efectos sobre la actividad proteica, la cuantificación de estos grupos es considerada un marcador general de daño oxidativo a proteínas.

La concentración de grupos sulfidrilo (grupos -SH) se ha determinado en nuestro estudio por el procedimiento espectrofotométrico clásico de Ellman (172). Éste se basa en la capacidad del ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB; reactivo de Ellman; Figura 2.2) de reaccionar con los grupos SH generando un cromóforo (TNB) con una fuerte absorción a 412 nm ($\epsilon=13'6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; a pH=8,0).

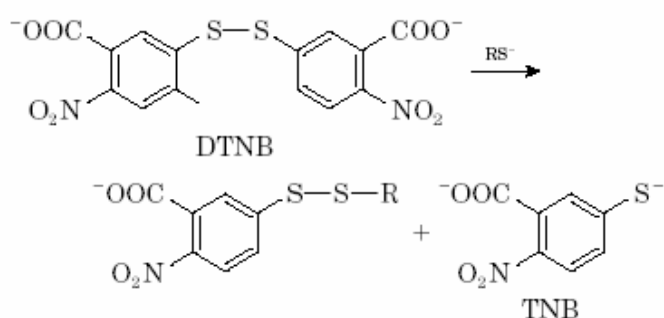


Figura 2.2. Fórmula química del reactivo de Ellman: 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB).

Las determinaciones se realizaron en 50 μL de plasma llevado a un volumen final de 1 mL con tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, y una concentración final de DTNB de 0,25 mmol/L. Tras 30 min a TA, y se determinó la absorbancia a 412 nm frente a al tampón de ensayo. La absorción inespecífica de las muestras de plasma se estimó procesando paralelamente

duplicados sin DTNB. Una muestra adicional conteniendo sólo tampón de ensayo y 0,25 mmol/L DTNB nos permitió valorar la absorción a 412 nm del propio reactivo. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, directamente en cubetas de espectrofotómetro de 1 mL, y con soluciones de DTNB preparadas diariamente en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Para los cálculos se utilizó directamente el coeficiente de extinción molar del TNB a 412 nm y pH.8, 0 (173).

Determinación de nitrotirosina: La nitrotirosina ha sido identificada como un marcador de inflamación y de generación de peroxinitrito por reacción entre el óxido nítrico (NO) y el superóxido. Varias rutas que incluyen la formación de peroxinitrito llevan a la producción de nitrotirosina. Puesto que la nitrotirosina es un producto final estable de la oxidación de peroxinitrito, la valoración de su concentración plasmática puede ser empleada como marcador del daño dependiente de NO *in vivo*. Puesto que el NOx es sólo un indicador del aumento en la producción de NO, la nitrotirosina asociada a proteínas puede ser un marcador más adecuado para evaluar el daño inducido por intermediarios de nitrógeno reactivos derivados del NO. La presencia de nitrotirosina se ha detectado en varios procesos inflamatorios incluyendo placas ateroscleróticas, enfermedad celíaca, artritis reumatoide, fallo renal crónico y shock séptico. En plasma normal los niveles de nitrotirosina son bajos o indetectables. La nitrotirosina puede generarse tanto a partir de tirosina libre como de la incorporada a proteínas (174).

Los niveles plasmáticos de nitrotirosina se cuantificaron en nuestro estudio mediante enzoinmunoensayo (ELISA) (175) utilizando el kit comercial HK501 de Hycult (Hycult Biotec BV, Uden, Holanda). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos que se procesaron siguiendo estrictamente las condiciones del fabricante. La lectura final de la absorbancia a 450 nm se realizó en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finlandia).

Determinación de mieloperoxidasa: La mieloperoxidasa (MPO, peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una hemoproteína abundante en neutrófilos y monocitos y que cataliza la conversión del peróxido de hidrogeno y cloruro a ácido hipocloroso (HOCl) (176,177). La reacción de esos compuestos con macromoléculas resulta en nitrosilación, clorinación y oxidación de residuos de tirosina, lípidos y colesterol y la rotura intermolecular de proteínas y DNA (176,178–181). La mieloperoxidasa interacciona con diversas moléculas como albúmina, receptor de manosa de los macrófagos, etc, y esas interacciones promueven la eliminación de

MPO, una reducción de los niveles de NO y bradiquinina, reducción de la vasodilatación, y una activación neutrofílica continuada (182–184). Los niveles de mieloperoxidasa elevados se han asociado a condiciones clínicas variadas incluyendo inflamación sistémica, riesgo de eventos cardiovasculares y disfunción endotelial vascular. Además, es incorporada a las placas ateroscleróticas y sirve como indicador de la infiltración neutrofílica de tejidos inflamados o dañados (185–188).

Los niveles plasmáticos de MPO se han determinado en nuestro estudio mediante ensayo inmunoenzimático utilizando el Human Quantikine® Myeloperoxidase ELISA kit #DMYEOO (R&D Systems Europe, Abingdon, Reino Unido). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos siguiendo meticulosamente las condiciones del fabricante. El lector de placas Multiskan EX (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finlandia) se utilizó para la cuantificación final de la absorbancia a 450 nm.

2.2.4.3. Citoquinas, adipoquinas y parámetros de inflamación

Las citoquinas se producen por una gran variedad de tipos celulares diferentes en los procesos de inflamación, hematopoyesis y cicatrización de heridas. Individualmente las citoquinas pueden tener múltiples efectos en el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares y se pueden superponer a los efectos biológicos de otras citoquinas. El análisis y la cuantificación de citoquinas en fluidos biológicos están en aumento y constituye un campo emergente de interés en la medicina clínica de laboratorio, y claramente es importante en promover nuestro entendimiento de muchos desórdenes inflamatorios e inmunológicos.

Los niveles de citoquinas en nuestro estudio se han evaluado mediante ensayos Milliplex Map. Éstos se basan en la tecnología Luminex® xMAP®, una de las tecnologías multiplex más respetadas y en más rápida expansión por sus múltiples aplicaciones. Entre las ventajas de las microesferas magnéticas que utiliza esta tecnología (microesferas MagPlex™), destacan su alta sensibilidad (permite utilizar cantidades muy pequeñas de muestra) y la posibilidad de cuantificar simultáneamente multitud de moléculas (analitos) en un único ensayo.

En nuestro estudio se han utilizado kits de microesferas magnéticas diseñados y suministrados por Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para la cuantificación en plasma humano (MILLIPLEX Map Human Kits) de las diferentes citoquinas. Adiponectina y

resistina se cuantificaron mediante el panel “Human Serum Adipokine Panel A”, # HADK1-61K-A); IL-6, leptina, y TNF- α se cuantificaron mediante el “Human Serum Adipokine Panel B”, # HADK2-61K-B; para sE-selectina, sICAM-1 y sVCAM-1 se utilizó el “Human cardiovascular Disease Panel 1”, # HCVD1-67AK; el VEGF se cuantificó mediante el “Human cardiovascular Disease Panel 3”, # HCVD3-67CK;

Los análisis se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando 25 μ L de muestra, y siguiendo estrictamente las condiciones del fabricante (Procedimiento esquematizado en la Figura 2.3). La cuantificación se realizó en un citómetro Luminex 100TM IS (Luminex Corp, Austin, TX, USA) y los resultados se analizaron con el software Luminex 100 IS 2.3. Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de Valencia.

Procedimiento

Añadir 200 μ L de tampón de lavado en cada pocillo

Agitar 10 minutos y aspirar

- Añadir 25 μ L de microesferas a cada pocillo y aspirar
- Añadir 25 μ L de calibrador o control en sus correspondientes posiciones
- Añadir 25 μ L de tampón de ensayo a los pocillos de blanco y muestras
- Añadir 25 μ L de matriz sérica a los pocillos de blanco, calibradores y controles
- Añadir 25 μ L de muestra en sus correspondientes pocillos

Tapar la placa e incubar agitando durante 16-20h a 4°C

Aspirar y lavar 3 veces con 200 μ L tampón de lavado

Añadir 50 μ L de anticuerpo de detección a cada pocillo

Incubar 1h a TA

Añadir 50 μ L de estreptavidina-ficoeritrina en cada pocillo

Incubar 30 min a TA

Aspirar y lavar 3x con 200 μ L de tampón de lavado

Añadir 100 μ L de líquido envolvente en cada pocillo

Lectura en el citómetro. Condiciones:

Volumen de aspiración	50 μ L
Nº microesferas por lectura	50
Tiempo de lectura	60 s

Figura 2.3. Procedimiento esquemático de cuantificación de citoquinas mediante el sistema MULTIPLEX.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis generales: El tamaño muestral requerido para alcanzar una potencia estadística del 90% a nivel de significación $p < 0,05$ se calculó a partir de nuestros datos previos (189). El ajuste de las variables a la normalidad se verificó con el test de Kolmogorov Smirnov con las correcciones de Lilliefors. Los datos de las variables continuas con distribución normal se expresan como media \pm desviación estándar (SD) y los de variables no distribuidas normalmente como mediana (rango intercuartil; p25-p75). En este último caso se transformaron logarítmicamente previamente a los análisis paramétricos. En el análisis de las diferencias entre dos grupos para variables continuas se utilizó el test de Student para datos no apareados. Los datos para las variables categóricas se expresan como frecuencias (n) y porcentajes (%), utilizándose para su comparación el test χ^2 . Las diferencias entre más de dos grupos se analizaron mediante ANOVA de una vía (variables con distribución normal) o ANCOVA (variables no estandarizadas) seguidas del test LSD (Least Significant Difference) para asignar las diferencias estadísticas inter-grupos. La correlación entre diferentes variables se estableció mediante el coeficiente de Pearson. Para analizar la relación entre varios parámetros se utilizó la regresión lineal múltiple por pasos. Los análisis se han realizado con los paquetes estadísticos SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) y GStat 2.0 (GlaxoSmithKline S.A.). En todos los casos se consideró una $p < 0,05$ como el límite de significación estadística.

Análisis particulares: El valor del punto de corte para los mAOPPs se calculó a partir de la curva ROC (Receiver-Operating Characteristic).

El análisis de todos los datos relativos al NO, así como su relación con el resto de parámetros del estudio, se realizó sobre las variables estandarizadas para edad y sexo.

En el análisis de los niveles de poliaminas, la identificación de la poliamina más apropiada para realizar los subsiguientes análisis se estableció mediante curvas ROC individuales para putrescina, espermidina y espermina como predictoras de obesidad. Los factores relacionados con los niveles de poliaminas (variable dependiente) en la población global y en el grupo obeso se identificaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson tras ajustar las variables por sexo y estadio de desarrollo puberal (estadio Tanner). Las variables independientes consideradas para estos análisis fueron los diferentes indicadores de adiposidad, estrés oxidativo y nitrosativo, inflamación, moléculas de adhesión y adipoquinas.

En el análisis de los datos de la resistina, el ANCOVA se realizó sobre variables ajustadas por sexo y estadio Tanner. En la comparación mediante ANCOVA de los niveles de resistina entre el grupo control y el obeso con o sin resistencia insulínica se consideraron como covariables el sexo, el estadio Tanner y el BMI, realizándose el análisis post-hoc mediante el test de Bonferroni. Las variables asociadas significativamente con los niveles de resistina se identificaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson tras ajustar por sexo, estadio Tanner y BMI. Las variables predictoras ($p < 0,01$) así identificadas se incluyeron en un análisis de regresión lineal múltiple inicial que, sometido a eliminación secuencial retrospectiva por pasos, permitió determinar la contribución de los factores que afectan los niveles de resistina tras ajustar para las variables potenciales de confusión.

En el análisis de los niveles de vitamina D, los datos antropométricos correspondientes al SDS-BMI, peso, altura, WC y masa grasa se ajustaron previamente por edad y sexo. El resto de variables cuantitativas se analizaron mediante ANCOVA ajustado para edad, sexo y estadio Tanner. Las correlaciones parciales de Pearson se realizaron sobre variables ajustadas para edad, sexo, estadio Tanner y SDS-BMI, y se utilizaron para determinar la asociación entre variables en el grupo obeso.

3. RESULTADOS

3.1. ESTRÉS OXIDATIVO

Los datos clínicos y antropométricos, así como las características bioquímicas de los niños que participaron en el estudio de parámetros relacionados con el estrés oxidativo se resumen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Datos clínicos, antropométricos y bioquímicos de los niños controles y obesos incluidos en el estudio.

	Control (n=44)	Obeso (n=54)	P
Sexo (F/M)	19/25	21/33	0,667
Edad (años)	11 (9-13)	12 (9-13)	0,615
Puntuación z BMI	-0,4 ± 0,9	4,1 ± 1,3	<0,0001
Masa grasa relativa (%)	105 ± 28	198 ± 43	<0,0001
WC relativa (%)	101 ± 10	145 ± 17	<0,0001
WC /HC	0,87± 0,06	0,93 ± 0,06	<0,0001
WC / altura	0,45 ± 0,04	0,62 ± 0,06	<0,0001
Puntuación z BP sistólica	-0.16 ± 1,16	1,31 ± 1,13	<0,0001
Puntuación z BP diastólica	-0,06 (-0,64-0,34)	0,66 (0,26-1,55)	<0,0001
Colesterol total (mmol/L)	4,04 ± 0,83	4,40 ± 0,90	0,040
c-HDL (mmol/L)	1,31 (1,17-1,58)	1,03 (0,93-1,22)	<0,0001
c-LDL (mmol/L)	2,36 ± 0,62	2,69 ± 0,75	0,023
TG (mmol/L)	0,68 (0,47-0,85)	1,05 (0,79-1,62)	<0,0001
Apoprotein A1 (g/L)	1,26 (1,14 – 1,52)	1,18 (1,05 – 1,30)	<0,001
Apoprotein B (g/L)	0,65 ± 0,17	0,79 ± 0,23	0,001
Glucosa ayunas (mmol/L)	5,12 ± 0,44	5,37 ± 0,34	0,010
Insulina ayunas (pmol/L)	60,4 (44,4 – 74,3)	135,7 (95,0- 193,0)	<0,0001
HOMA-IR	2,0 (1,3 – 2,5)	4,7 (3,2 – 6,6)	<0,0001
FGIR	11,2 (9,2 – 14,3)	4,9 (3,5 – 7,3)	<0,0001
hs-CRP (mg/L)	0,4 (0,2 – 0,9)	2,7 (0,8 – 4,0)	<0,0001
Homocisteína (μmol/L)	6,6 (5,8 – 7,0)	7,8 (5,9 – 8,6)	0,024
Ácido fólico (nmol/L)	17,7 (13,1 – 24,7)	16,8 (10,6 – 22,6)	0,060
Ácido úrico (μmol/L)	190 ± 59	270 ± 62	<0,0001

Valores de variables continuas expresados como media ± desviación estándar (SD) o mediana (rango intercuartil) para datos sesgados. Las variables categóricas se expresan como frecuencias (n). Valores de p referidos al análisis mediante t-Student de las variables continuas, previa transformación logarítmica de los datos sesgados, o al análisis mediante la prueba χ^2 de las variables categóricas. **Abreviaturas:** BMI: índice de masa corporal; WC: Circunferencia de cintura; HC: Circunferencia de cadera; BP: Presión arterial; c-HDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; TG: Triglicéridos; HOMA-IR: Modelo homeostático de resistencia a la insulina; FGIR: cociente glucosa/insulina en ayunas; hs-CRP, Proteína C-reactiva de alta sensibilidad. **Conversiones:** Para convertir el colesterol total, c-HDL y c-LDL a mg/dL, dividir por 0,0259; TG, dividir por 0,0113; apoproteínas A1 y B dividir por 0,01; glucosa, dividir por 0,0555; para convertir la insulina a mU/mL, dividir por 6,945; para convertir la homocisteína a mg/L, dividir por 7,397; para convertir el ácido fólico a ng/mL, dividir por 2,266; para convertir el ácido úrico a mg/dL, dividir por 59,48.

Como puede observarse, las diferencias en cuanto a edad y sexo entre los niños obesos y controles no son significativas. Todos los niños obesos presentaban obesidad

abdominal con una circunferencia de cintura (WC) superior al percentil 90 (para su edad y sexo) y una relación WC /altura superior a 0,5. Además, el 80% de ellos presentaban un Z-score para el índice de masa corporal (BMI) superior a 3. Sólo el 26% de los niños obesos presentaban valores de glucosa en ayunas superiores a 100 mg/dL. Sin embargo, los valores del índice HOMA-IR fueron superiores a 3,16 en el 76% de los participantes y la relación glucosa/insulina en ayunas (FGIR) fué inferior a 6 en el 68% de los participantes en el estudio.

Los resultados acumulativos respecto a los biomarcadores de estrés oxidativo en nuestra muestra poblacional, tanto para el grupo control como para el grupo de pacientes obesos, se muestran en la tabla 3.2. En ella se indica también la significación estadística de las diferencias. Como puede observarse, todos los biomarcadores de estrés oxidativo valorados en este estudio se encuentran significativamente elevados en los pacientes obesos respecto a los controles. Indicar que los niveles de los grupos sulfidrilo (-SH) fueron significativamente menores en el grupo obeso, reflejando así el grado de consumo antioxidante. Independientemente de la delipidación de las muestras de plasma, no se observan correlaciones entre los niveles de productos avanzados de oxidación protéica (AOPPs) y el resto de los biomarcadores de peroxidación lipídica o estatus antioxidante.

Tabla 3.2. Biomarcadores de estrés oxidativo determinados en plasma de niños control y con obesidad severa.

	Control (n=44)	Obeso (n=54)	p
AOPPs ($\mu\text{mol/L}$)	53,2 \pm 14,5	72,7 \pm 16,6	<0,0001
mAOPPs ($\mu\text{mol/L}$)	44,3 \pm 13,9	56,1 \pm 15,9	<0,001
TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	21,3 \pm 2,6	22,7 \pm 3,0	0,028
Malondialdehído ($\mu\text{mol/L}$)	0,35 (0,22-0,44)	0,67 (0,31-1,16)	<0,001
8-isoprostaglandina F _{2α} (pg/mL)	27,0 (17,9-34,9)	35,8 (25,0-49,5)	<0,001
Grupos sulfidrilo ($\mu\text{mol/L}$)	428 \pm 43	411 \pm 37	0,030

Valores expresados como media \pm Desviación Estándar (SD) o mediana (rango intercuartil) para datos sesgados. Valores de p referidos al análisis mediante t-Student de las variables, previa transformación logarítmica de los datos sesgados. **Abreviaturas:** AOPPs: productos avanzados de oxidación proteica; mAOPPs: AOPPs en plasma delipidado; TBARMs: sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico.

Tal y como era de esperar, la delipidación del plasma redujo los niveles de AOPPs (entre el 23% y 16%) y de triglicéridos (entre el 88% y 86%) en los grupos obeso y control, respectivamente. Sin embargo, los niveles de AOPPs continuaron siendo significativamente

más elevados en el grupo obeso tras la delipidación del plasma. Por lo tanto, sólo los valores de AOPPs obtenidos en el plasma delipidado (mAOPPs) fueron utilizados en los análisis posteriores.

La relación entre los niveles de AOPPs y el riesgo metabólico se evaluó subdividiendo el grupo de niños obesos de acuerdo con el punto de corte obtenido para sus valores de mAOPPs a partir de la curva ROC, con un área bajo la curva (AUC) de 0,76. El valor de mAOPPs usado en el fraccionamiento ha sido 53,2 $\mu\text{mol/L}$, punto para el cual los grados de sensibilidad (67%) y especificidad (71%) son los más altos. Los resultados se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Factores de riesgo metabólico de acuerdo con los puntos de corte para AOPPs en los niños obesos.

	AOPPs <53,2 $\mu\text{mol/L}$ (n=29)	AOPPs >53,2 $\mu\text{mol/L}$ (n=25)	P
Puntuación z BMI	4,3 \pm 1,3	3,9 \pm 1,4	0,275
WC relativa (%)	144 \pm 15	145 \pm 19	0,868
WC/ altura	0,62 \pm 0,05	0,62 \pm 0,07	0,893
Puntuación z BP sistólica	1,01 \pm 1,26	1,66 \pm 0,85	0,033
Puntuación z BP diastólica	0,64 (0,18-1,19)	0,69 (0,35-1,55)	0,393
Hipertensión	12 (41,4)	14 (56,0)	0,284
c-HDL (mmol/L)	1,09 (0,98-1,32)	0,96 (0,88-1,06)	0,009
c-HDL \leq 1,04 mmol/L	9 (31)	16 (64,0)	0,015
TG (mmol/L)	0,87 (0,76-1,03)	1,32 (1,06-1,93)	0,020
TG \geq 1,24 mmol/L	7 (24,1)	15 (60,0)	0,007
TG/c-HDL	1,83 (1,39-2,50)	3,32 (2,13-5,23)	0,002
TG/c-HDL \geq 3,5	4 (13,8)	12 (48,0)	0,006
Glucosa ayunas (mmol/L)	5,36 \pm 0,30	5,39 \pm 0,38	0,738
Glucosa ayunas \geq 5,55 mmol/L	7 (24,1)	7 (28)	0,747
Insulina ayunas (pmol/L)	135,1 \pm 74,9	171,3 \pm 77,6	0,088
Insulina ayunas \geq 96,9 pmol/L	16 (55,2)	23 (92)	0,003
HOMA-IR	4,21 (2,50-6,11)	5,07 (3,91-7,58)	0,045
HOMA-IR \geq 3,16	18 (62,1)	23 (92,0)	0,010
FGIR	5,55 (3,90-8,44)	4,68 (3,26-5,64)	0,031
FGIR \leq 6	15 (51,7)	22 (88,0)	0,004
MRFs \geq 3	12 (41,4)	18 (72,0)	0,024
MRFs \geq 4	7 (24,1)	16 (64,0)	0,003

Para convertir el colesterol total y el c-HDL a mg/dL, dividir por 0,0259; TG, dividir por 0,0113; glucosa, dividir por 0,0555; insulina a $\mu\text{U/mL}$, dividir por 6,945. MRFs: Factores de riesgo metabólico. Los valores están expresados como media \pm desviación estándar, mediana (rango intercuartil) para datos sesgados, y como n (porcentaje) para variables categóricas. Valores de p referidos al análisis mediante t-Student de las variables continuas, previa transformación logarítmica de los datos sesgados, o al análisis mediante la prueba χ^2 de las variables categóricas.

Como puede observarse, las medidas antropométricas y la presencia de hipertensión no difieren entre los grupos de niños obesos estratificados según los niveles de mAOPPs. Sin embargo, en los niños obesos con niveles más altos de mAOPPs, se observó un perfil lipídico

más aterogénico y una mayor resistencia a la insulina. De forma global, la presencia de 3 o más factores de riesgo metabólico (MRFs) se observó con mayor frecuencia en el grupo de niños obesos definido por niveles mayores de AOPPs. Así, los niños con obesidad severa con 3 o más MRFs presentaban unos valores de mAOPPs de $62,7 \pm 14,2 \mu\text{mol/L}$, frente a los $47,9 \pm 14,3 \mu\text{mol/L}$ de los niños con uno o dos factores de riesgo metabólico ($p < 0,001$).

No se observó ninguna correlación entre los niveles de mAOPPs y las medidas antropométricas (peso, talla, WC, HC), el BMI z-score o la masa grasa relativa en niños obesos. Sin embargo, los niveles de mAOPPs se correlacionaron positivamente con los TG ($r = 0,29$, $p = 0,031$) y el índice TG/c-HDL ($r = 0,35$, $p = 0,009$), y negativamente con el c-HDL ($r = -0,33$, $p = 0,014$). No se observaron otras correlaciones con parámetros bioquímicos.

Para investigar el efecto independiente de los factores de riesgo metabólico (MRFs) en los niveles de mAOPPs, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple por pasos hacia atrás de los datos obtenidos para los niños obesos. El modelo inicial incluyó la puntuación z del BMI, la puntuación z de la presión arterial sistólica, el c-HDL, los TG, y el índice HOMA-IR como variables independientes. De estos factores, sólo la puntuación z de la presión arterial y el c-HDL generaron un modelo que fue débilmente predictivo sobre los niveles de mAOPPs; el resto de variables fueron excluidas ($R^2 = 0,18$, $p = 0,007$).

No se observó correlación entre los niveles de mAOPPs y AOPPs normalizados por los valores de triglicéridos (relación AOPPs/TG). Sin embargo, sí se observó una correlación positiva entre los niveles de AOPPs determinados por el procedimiento original y el modificado ($r = 0,71$, $p < 0,0001$).

3.2. METABOLISMO DE LA ARGININA

Los aspectos del metabolismo de la arginina considerados en nuestro estudio han sido los niveles circulantes de poliaminas y la producción de óxido nítrico, ésta última evaluada por los niveles de nitrito y nitrato en plasma y los urinarios de nitrato. Como parámetro de estrés nitrosativo se han analizado los niveles de nitrotirosina en plasma. Los análisis se han realizado sobre una muestra poblacional 60 pacientes obesos y un número mínimo de 42 controles sanos no obesos. Los datos correspondientes a los parámetros clínicos, antropométricos y

bioquímicos de la población global de estudio y del grupo de pacientes obesos se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros clínicos y bioquímicos de la población infantil de estudio.

	Todos los pacientes (n= 102)	Pacientes obesos (n= 60)
Género (F/M)	42/60	23/37
Edad (Años)	11 (9-13)	12 (9-13)
Estadio Tanner (1/2/3)	38/25/39	18/17/25
Puntuación z BMI	2,8 ± 2,6	4,2 ± 1,4
Masa grasa relativa (%)	159 ± 59	198 ± 43
WC relativa (%)	126 ± 26	145 ± 17
WC/HC	0,91 ± 0,07	0,94 ± 0,06
WC/altura	0,55 ± 0,09	0,62 ± 0,06
Puntuación z BP sistólica	0,67 ± 1,32	1,28 ± 1,11
Puntuación z BP diastólica	0,34 ± 0,97	0,69 (0,26-1,47)
HOMA-IR	2,8 (1,9-5,2)	4,6 (3,0-6,5)
Colesterol total (mmol/L)	4,27 ± 0,88	4,43 ± 0,91
c-HDL (mmol/L)	1,19 (0,98-1,45)	1,06 (0,93-1,27)
c-LDL (mmol/L)	2,58 ± 0,71	2,72 ± 0,75
Triglicéridos (mmol/L)	0,85 (0,63-1,25)	1,02 (0,77-1,55)
Homocisteína (μmol/L)	6,9 (5,9-8,3)	7,7 (5,9-8,7)

Valores de variables continuas expresados como media ± desviación estándar (SD) o mediana (rango intercuartil) para datos sesgados. Las variables categóricas se expresan como frecuencias (n). **Abreviaturas:** BMI: índice de masa corporal; WC: Circunferencia de cintura; HC: Circunferencia de cadera; BP: Presión arterial; c-HDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; HOMA-IR: Modelo homeostático de resistencia a la insulina

La tabla 3.5 resume los valores obtenidos para los diferentes parámetros del metabolismo del óxido nítrico y poliaminas en la población global y en la obesa. En ella se incluyen también, a título orientativo, los valores de los diferentes parámetros de estrés oxidativo, adipocitoquinas, marcadores de inflamación y moléculas de adhesión valoradas en este estudio y consideradas en el análisis ulterior de los resultados.

Tabla 3.5. Parámetros del metabolismo del óxido nítrico, poliaminas, estrés oxidativo y nitrosativo, adipocitoquinas, marcadores de inflamación y moléculas de adhesión en la población de estudio.

	Todos pacientes (n= 102)	Obesos (n=60)
Marcadores estrés nitrosativo		
Nitrito plasma ($\mu\text{mol/L}$)	1,43 (0,80-2,62)	1,60 (0,97-2,89)
Nitrato plasma ($\mu\text{mol/L}$)	27,5 (22,6-33,5)	31,7 (27,5-37,4)
UNO ₃ /UCr ($\mu\text{mol/mmol}$)	91,3 (59,8-107,0)	98,5 (64,3-118,0)
3-nitrotirosina ($\mu\text{mol/L}$)	0,37 (0,18-0,57)	0,42 (0,25-0,73)
Niveles de poliaminas		
Putrescina ($\mu\text{mol/L}$)	1,17 (0,73-1,35)	1,34 (0,97-1,48)
Espemidina ($\mu\text{mol/L}$)	7,69 (6,16-8,94)	8,47 (7,28-9,32)
Espermina ($\mu\text{mol/L}$)	5,32 (4,04-6,29)	5,97 (4,71-7,04)
Marcadores estrés oxidativo		
Malondialdehído ($\mu\text{mol/L}$)	0,40 (0,25-0,91)	0,64 (0,27-1,18)
8-isoprostaglandina F ₂ α (pg/mL)	29,2 (21,4-41,2)	34,3 (24,5-50,6)
Grupos sulfidrilo ($\mu\text{mol/L}$)	421 (397-445)	410 (395-431)
Adipocitoquinas		
Leptina (ng/mL)	89,9 (32,6-134,7)	130,4 (96,2-181,1)
Adiponectina (($\mu\text{g/mL}$)	0,52 (0,49-0,56)	0,51 (0,49-0,55)
Resistina (ng/mL)	14,2 (13,5-14,6)	14,3 (13,7-14,6)
Marcadores inflamación		
hs-CRP (mg/L)	1,18 (0,36-3,69)	2,81 (0,82-4,31)
TNF- α (pg/mL)	32,2 \pm 10,7	35,0 \pm 11,6
IL-6 (pg/mL)	12,2 (9,2-18,0)	14,4 (10,7-20,0)
Moléculas de adhesión		
sE-selectina (ng/mL)	13,0 (6,9-26,9)	18,3 (8,2-31,8)
VEGF (pg/mL)	88,0 (58,3-165,0)	91,2 (60,5-171,3)
sVCAM-1 (ng/mL)	379,9 \pm 69,1	387,7 \pm 60,5
sICAM-1 (ng/mL)	78,8 (50,9-137,5)	105 (72,150)

Valores expresados como media \pm desviación estándar o como mediana (rango intercuartil) para datos sesgados. **Abreviaturas:** UNO₃/UCr, cociente nitrato/creatinina en orina; hs-CRP, proteína C-reactiva de alta sensibilidad; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; IL-6, interleuquina 6; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; sVCAM-1, proteína 1 de adhesión celular vascular soluble; sICAM-1, molécula-1 de adhesión intercelular soluble.

Respecto a las poliaminas, los niveles sanguíneos de putrescina, espermidina y espermina fueron significativamente más altos en el grupo obeso que en control (figura 3.1A). Así, los valores para putrescina del grupo control fueron de 0,78 (0,64-1,03) frente a los 1,14 (0,88-1,48) del grupo obeso; los de espermidina de 4,14 (3,34-4,77) frente a los 5,74 (4,71-7,10); y los de espermina de 6,65 (5,88-7,64) frente a los 8,47 (7,27-9,50). Todos los valores están expresados como mediana (rango intercuartil) y en $\mu\text{mol/L}$.

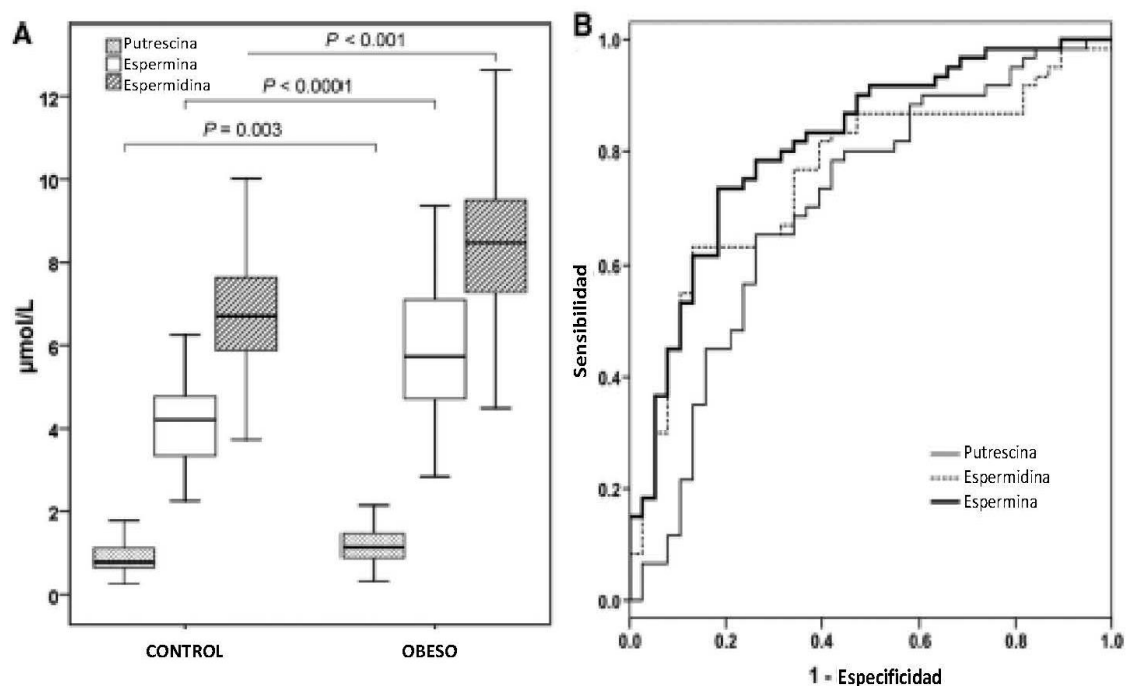


Figura 3.1. A: Niveles sanguíneos de putrescina, espermidina y espermina en los grupos obeso y control. Valores expresados como mediana (rango intercuartil), y analizados mediante ANCOVA tras ajustar para sexo y estadio Tanner. **B: Curvas ROC para las tres poliaminas.**

La comparación del área bajo la curva ROC para las tres poliaminas (figura 3.1B) permitió establecer una mayor precisión para la espermina (0,82) que para la espermidina (0,76) o la putrescina (0,70), a pesar de que las diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas. En el punto de corte de 4,86 $\mu\text{mol/L}$, los grados de sensibilidad (73,3%) y especificidad (81%) de la espermina fueron los más altos. Por ello, los subsiguientes análisis de correlación se realizaron con esta poliamina.

El análisis de correlaciones parciales (coeficiente de Pearson) en la población total de estudio mostró asociaciones significativas de los niveles de espermina con la mayoría de

parámetros evaluados (tabla 3.6). Así, los niveles sanguíneos de espermina se correlacionaron positivamente con las medidas antropométricas indicativas de obesidad así como con los marcadores de estrés nitrosativo/oxidativo (nitrito plasma, malondialdeído). También se observó una asociación positiva con marcadores de inflamación, leptina y moléculas de adhesión, E-selectina soluble, y sICAM-1.

Tabla 3.6. Coeficientes parciales de correlación de Pearson entre los niveles de espermina y los datos clínicos y experimentales en la población global y en la obesa, ajustada por sexo y estadio Tanner.

	Todos pacientes (n= 102)	Obesos (n=60)
Puntuación z BMI	0,458 ^a	0,274 ^b
Masa grasa relativa	0,420 ^a	0,269 ^b
WC/HC	0,263 ^c	0,107
WC/altura	0,460 ^a	0,265 ^b
WC relative	0,412 ^a	0,202
Log Homocisteína	0,133	0,053
Log Nitrito	0,272 ^a	0,236
Log Nitrato	0,163	-0,110
Log 3'-Nitrotirosina	-0,061	-0,340 ^c
Log Malondialdeído	0,303 ^c	0,260 ^b
Log 8-isoprostaglandina F_{2α}	0,134	-0,177
Log grupos sulfidriilo	-0,056	0,073
Log Leptina	0,320 ^d	0,049
Log Adiponectina	0,156	0,217
Log Resistina	0,150	0,154
Log hs-CRP	0,329 ^d	0,224
TNF-α	0,314 ^d	0,218
Log IL-6	0,215 ^b	0,039
Log sE-Selectina	0,250 ^b	0,148
Log VEGF	0,128	0,279 ^b
sVCAM-1	0,030	0,002
Log sICAM-1	0,277 ^b	0,098

Datos de las variables sesgadas transformados logarítmicamente para el análisis. **Abreviaturas:** BMI: índice de masa corporal; WC: Circunferencia de cintura; HC: Circunferencia de cadera; hs-CRP, proteína C-reactiva de alta sensibilidad; TNF-α, factor de necrosis tumoral α; IL-6, interleuquina 6; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; sVCAM-1, proteína 1 de adhesión celular vascular soluble; sICAM-1, molécula-1 de adhesión intercelular soluble. ^ap<0,0001; ^bp<0,05. ^cp<0,01; ^dp<0,001.

Sin embargo, cuando sólo se consideraron los pacientes obesos, algunas de estas correlaciones se perdieron, al tiempo que emergían otras asociaciones significativas. En particular, se encontró una asociación negativa con la 3'-nitrotirosina y una asociación positiva con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En el análisis de regresión múltiple de los factores relacionados con los niveles de espermina, sólo el malondialdehído y el VEGF dieron un modelo predictivo (R^2 ajustado = 0,26, $p=0,047$ y $p=0,004$, respectivamente), por lo que el resto de variables fueron excluidas.

En el contexto del metabolismo de la arginina, hemos evaluado en nuestro estudio la producción de óxido nítrico (NO). La tabla 3.7 muestra las características clínicas, parámetros antropométricos y datos bioquímicos de los niños controles y obesos clasificados, estos últimos, de acuerdo al número de los factores de riesgo metabólico (MRFs) presentes.

Tabla 3.7. Datos clínicos, antropométricos y bioquímicos de los niños de estudio divididos de acuerdo a su estado nutricional y al número de factores de riesgo metabólico (MRFs).

	Controles No obesos (n = 50)	Obesidad severa con < 4 MRFs (n = 32)	Obesidad severa con ≥ 4 MRFs (n = 28)	P
Sexo (F/M) ^a	27/23	11/21	12/16	0,210
Edad (años) ^b	11 (9–13)	11 (8–12)	12 (10–13)†	0,036
eGFR (mL/min/1,73m ²) ^c	136±21	130±14	123±17*	0,040
Antropometría^b				
Puntuación z BMI	-0,4 (-1,1–0,2)	3,9 (2,9–5,5)*	3,9 (3,3–5,0)*	<0,0001
Masa grasa relativa (%)	106±26	199±40*	199±45*	<0,0001
WC relativa (%)	100±10	143±17*	146±17*	<0,0001
WC/ altura	0,45±0,04	0,62±0,06*	0,62±0,07*	<0,0001
MRFs tradicionales^c				
Puntuación z BP sistólica	-0,13±1,09	0,83±1,09*	1,71±0,95‡	<0,0001
Puntuación z BP diastólica	0,00 (-0,60–0,18)	0,52 (0,22–1,19)*	1,06 (0,27–1,68)‡	<0,0001
c-HDL (mg/dL)	52 (44–61)	47 (41–53)	37 (32–41)‡	<0,0001
Triglicéridos (mg/dL)	62 (42–79)	73 (61–83)	140 (98–212)‡	<0,0001
Glucosa (mg/dL)	93±7	95±5	98±7‡	0,001
Insulina (μU/mL)	9,1±5,1	15,0±7,1*	28,0±10,8‡	<0,0001
HOMA-IR	2,0 (1,3–2,5)	3,2 (2,4–4,2)*	6,1 (4,8–8,9)‡	<0,0001
FGIR	11,2 (8,8–14,5)	7,0 (5,1–9,6)*	3,9 (2,9–4,9)‡	<0,0001
Otros factores de riesgo cardiovascular				
Ácido úrico (mg/dL)	3,3±1,1	4,0±0,7	5,0±1,1‡	<0,0001
Homocisteína (μmol/L)	6,5 (5,7–7,0)	7,2 (5,9–8,6)	7,9 (6,8–9,0)*	0,003

Valores expresados como media ± desviación estándar, como mediana (rango intercuartil) para datos sesgados, o como n para las variables categóricas. **Abreviaturas:** eGFR: tasa de filtración glomerular estimada; BMI: Índice de masa corporal; WC: circunferencia de cintura; BP: presión arterial; c-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina; FGIR: relación glucosa/insulina en ayunas. **Valores de “p” referidos a:** ^a test χ^2 ; ^b test ANOVA; ^c test ANCOVA ajustado por edad y género.

* Estadísticamente diferente frente al grupo control; † frente a sujetos con obesidad severa y con < 4 MRFs; ‡ frente a sujetos control y sujetos con obesidad severa y < 4 MRFs.

La comparación a nivel global entre el grupo control (n=50 niños) y el obeso (n=60 niños) mostró diferencias estadísticamente para todos los factores estudiados. Destacar que los niños obesos con alto riesgo metabólico (≥ 4 MRFs) presentaron una edad ligeramente mayor, niveles más altos de ácido úrico y homocisteína, así como menor tasa de filtración glomerular (eGFR) que los niños controles, si bien estos valores se encontraban dentro de la normalidad.

Los resultados de los diferentes marcadores evaluados del metabolismo del NO, estrés oxidativo e inflamación en los niños control y obesos, de acuerdo con los factores de riesgo metabólico se presentan en la tabla 3.8.

Tabla 3.8. Parámetros del metabolismo del óxido nítrico, estrés oxidativo e inflamación de los niños de estudio clasificados de acuerdo a su estado nutricional y al número de factores de riesgo metabólico (MRFs).

	Controles No obesos (n = 50)	Obesidad severa con < 4 MRFs (n = 32)	Obesidad severa con ≥ 4 MRFs (n = 28)	P
Nitrito ($\mu\text{mol/L}$)	1,07 (0,60–1,60)	1,43 (0,80–2,0)*	2,61 (1,37–3,90)‡	0,005
Nitrato ($\mu\text{mol/L}$)	23,0 (21,4–25,8)	31,1 (27,3–41,4)*	31,9 (27,5–35,6)*	0,002
Nitrotirosina ($\mu\text{mol/L}$)	0,29 (0,14–0,47)	0,42 (0,24–0,78)*	0,42 (0,27–0,72)*	0,028
UNO ₃ /UCr ($\mu\text{mol/mmol}$)	71,8 (58,8–84,0)	99,9 (71,1–128,6)*	92,1 (63,6–106,7)†	0,002
8-isoprostanos F2 α (pg/mL)	24,8 (18,4–30,1)	33,9 (23,8–54,9)*	35,2 (26,2–47,4)*	<0,001
Malondialdehído ($\mu\text{mol/L}$)	0,36 (0,22–0,47)	0,41 (0,27–1,19)*	0,82 (0,28–1,16)*	0,008
AOPPs ($\mu\text{mol/L}$)	47,7 \pm 15,6	51,1 \pm 16,0	63,5 \pm 14,3‡	<0,001
Leptina (ng/mL)	21,5 (8,2–50,6)	113,7 (85,5–130,8)*	168,6 (130,3–193,3)‡	<0,0001
TNF- α (pg/mL)	28,0 \pm 8,5	37,5 \pm 11,3*	34,1 \pm 9,9*	<0,0001
IL-6 (pg/mL)	9,2 (7,6–12,2)	15,1 (12,2–20,7)*	13,7 (10,7–19,3)*	<0,0001
hs-CRP (mg/L)	0,43 (0,21–0,96)	3,08 (0,88–4,53)*	2,40 (0,89–4,56)*	<0,0001

Valores expresados como media \pm desviación estándar o como mediana (rango intercuartil) para datos sesgados. **Abreviaturas:** UNO₃/UCr: cociente nitrato/creatinina urinario; AOPPs: productos avanzados de oxidación proteica; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; IL-6: interleuquina 6; hs-CRP: proteína-C reactiva de alta sensibilidad. Valores de "p" referidos a ANCOVA ajustado por edad y género.

* Estadísticamente diferente frente a los sujetos no obesos.

† Frente a los sujetos con obesidad severa y <4 MRFs.

‡ Frente a los pacientes no obesos y con obesidad severa y <4 MRFs.

El análisis de los datos del metabolismo del NO mostró alteraciones significativas en el grupo obeso comparado con el grupo de niños con normopeso. Así, los niveles de nitrito, nitrato y nitrotirosina en plasma se encontraron significativamente aumentados en el grupo obeso. Además, los niveles plasmáticos de nitrito fueron significativamente superiores en el grupo de pacientes obesos con MRFs \geq 4 frente a los niños que presentan menos de 4 MRFs. El cociente UNO₃/UCr también mostró valores mayores en el grupo obeso que en el control, si bien en este caso los valores obtenidos para los pacientes con MRFs \geq 4 fueron menores a los que mostraron los pacientes con MRFs $<$ 4. Este hecho no puede atribuirse a una función glomerular alterada pues ésta se encontró dentro de los límites de la normalidad en todos los casos. Además, no se observó correlación entre UNO₃/UCr y eGFR ($r=0,174$; $p=0,192$).

Los niveles de leptina en el grupo de pacientes pediátricos obesos fueron significativamente más altos que en el grupo control, y se incrementaron paralelamente al riesgo metabólico. Igualmente, los marcadores de inflamación (IL-6 y hs-CRP) presentaron niveles superiores en el grupo obeso que en el control pero, en este caso, no se observaron diferencias en función del número de MRFs presentado por los pacientes obesos. Respecto a los indicadores de peroxidación lipídica (malondialdehído y 8-isoprostanos), ambos presentaron valores significativamente más altos en el grupo obeso, y se elevaron en función del riesgo metabólico. Sin embargo, el aumento en los niveles de AOPPs únicamente se observó en el grupo obeso con mayor riesgo metabólico.

El análisis de las correlaciones entre los parámetros del metabolismo del NO y los marcadores de estrés oxidativo en el grupo obeso, ajustados por edad y género, mostró una correlación significativa entre ambos procesos. Así los niveles plasmáticos de nitrito y nitrato se correlacionaron significativa y positivamente con los de 8-isoprostanos $F_{2\alpha}$ ($r=0,386$, $p=0,003$; y $r=0,320$, $p=0,014$, respectivamente), y los de nitrito con los de malondialdehído ($r=0,275$; $p=0,036$). Sin embargo, estas correlaciones no se observaron para el nitrato urinario a pesar de la excelente correlación entre los niveles de nitrato en plasma y orina ($r=0,649$, $p<0,0001$). En nuestro estudio, los niveles de nitrotirosina no se correlacionaron ni con los niveles de nitrato y nitrito ni con los parámetros de estrés oxidativo.

El análisis de las correlaciones entre los parámetros del metabolismo del NO y el estrés nitrosativo con los factores de riesgo cardiometabólico y adipocinas se realizó también considerando por una parte a todos los niños implicados en el estudio y, por otra, a niños

obesos. En todos los casos los datos se ajustaron previamente para edad y género con el fin de eliminar los efectos de estas variables. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Coeficientes de correlación parcial de Pearson ajustados por edad y sexo en todos los niños del estudio (n=110) y en los niños con obesidad severa (n=60).

	Log nitrito		Log nitrato		Log UNO ₃ /UCr		Log nitrotirosina	
	Todos los sujetos	Sujetos obesos	Todos los sujetos	Sujetos obesos	Todos los sujetos	Sujetos obesos	Todos los sujetos	Sujetos obesos
Log puntuación z BMI	0,233*	0,125	0,381§	0,192	0,180	0,098	0,199*	-0,145
WC Relativa	0,246†	0,098	0,452§	0,388†	0,227*	0,191	0,237*	0,061
WC/ altura	0,292†	0,103	0,414§	0,286*	0,227*	0,205	0,250†	0,129
Puntuación z BP sistólica	0,277†	0,236	0,128	-0,019	0,006	-0,081	0,225*	0,133
Log puntuación z BP diastólica	0,233*	-0,072	0,080	-0,100	-0,076	-0,157	0,168	-0,047
Log c-HDL	-0,287†	-0,245	-0,237*	-0,052	0,045	0,211	-0,148	-0,031
Log triglicéridos	0,367§	0,432‡	0,076	-0,014	-0,024	0,008	-0,002	-0,029
Log HOMA-IR	0,194*	0,153	0,175	-0,185	-0,015	-0,217	0,220*	0,100
Ácido Úrico	0,155	0,217	0,359§	0,404‡	0,068	0,109	-0,043	-0,234
Log homocisteína	0,038	0,141	-0,015	-0,233	-0,202*	-0,314*	-0,123	-0,103
Log Leptina	0,041	0,113	0,279†	-0,203	0,146	-0,215	0,150	-0,199
TNF- α	0,049	0,145	0,249†	0,302*	0,237*	0,251	0,158	0,094
Log Interleuquina-6	0,073	0,005	0,089	-0,180	-0,056	-0,198	0,269†	0,138
Log hs-CRP	0,025	0,013	0,195*	-0,220	0,154	-0,155	0,237*	-0,168

Abreviaturas: UNO₃/UCr: cociente nitrato/creatinina urinario; BMI: Índice de masa corporal; WC: circunferencia de cintura; BP: presión arterial; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; hs-CRP: Proteína C-reactiva de alta sensibilidad. *p < 0,05; †p < 0,01; ‡p < 0,001; §p < 0,0001.

Tal y como puede observarse en la tabla, encontramos asociaciones positivas entre los parámetros antropométricos indicativos de adiposidad abdominal, como la circunferencia de cintura relativa (WC relativa) y WC/altura, con el nitrato en plasma en los niños obesos. Sin embargo, no se observaron correlaciones con otros parámetros antropométricos como la puntuación z o el BMI o el porcentaje de masa grasa, ni con la presión arterial. Respecto a los niveles de lípidos en suero, sólo los niveles de triglicéridos se correlacionaron con el nitrito en plasma en niños obesos. Entre los MRFs no tradicionales analizados, se observó una

correlación positiva entre los niveles plasmáticos de nitrato y el ácido úrico, y una relación inversa entre el nitrato urinario (UNO_3/UCr) y la homocisteína. De los marcadores de inflamación estudiados, sólo los valores de $\text{TNF-}\alpha$ se correlacionaron positivamente con el nitrato plasmático en niños obesos.

3.3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE VITAMINA D

Evidencias recientes relacionan los niveles de vitamina D con el riesgo cardiovascular (54,56). Por ello hemos incluido en nuestro estudio la determinación de los niveles de esta vitamina y de otros parámetros relacionados con el metabolismo fosfo-cálcico. La ingesta energética, de vitamina D y calcio se estableció a partir de los datos dietarios suministrados por los participantes en el estudio, recogidos por un nutricionista, y calculados utilizando la base de datos nutricionales Alimentación y Salud, BitASDE (General Médica Farmacéutica, Granada, España). En el estudio participaron 66 niños obesos y 39 niños control cuyos datos clínicos, antropométricos, nutricionales y bioquímicos se resumen en la tabla 3.10.

Tabla 3.10. Datos clínicos, antropométricos, nutricionales y bioquímicos para los 66 niños obesos y los 39 niños control que participaron en el estudio.

	Obesos (n = 66)	BMI normal (n = 39)	P
Sexo (chicos)	41	19	0,180*
Edad (años)	12 (9-13)	11 (8-13)	0,208†
Estadio Tanner	2,2 (0,8)	2,0 (0,9)	0,326†
Ingesta energética (kcal/d)	1937 (517)	1880 (371)	0,500z
Ingesta Vitamina D ($\mu\text{g}/\text{d}$)	5,2 (1,4)	5,0 (1,5)	0,227z
Ingesta Calcio (mg/d)	794 (177)	787 (185)	0,854z
BMI (kg/m^2)	29,4 (26,8-33,5)	17,7 (16,1-19,9)	<,0001z
Puntuación z BMI	3,9 (2,9-5,1)	0,4 (1-0,5)	<,0001†
25(OH)D (ng/mL)	24,3 (7,7)	30,0 (8,0)	0,002z
iPTH (pg/mL)	29,6 (25,6-39,4)	28,3 (21,1-32,5)	0,011z
iPTH/25(OH)D (pg/ng)	1,32 (0,97-1,84)	0,88 (0,71-1,34)	0,001z
Calcio (mg/dL)	9,8 (0,5)	10,0 (0,4)	0,223z
Fósforo (mg/dL)	4,9 (0,6)	4,3 (0,5)	<,0001z
Calcio \times Fósforo (mg^2/dL^2)	48,7 (6,0)	42,5 (5,9)	<,0001z

Valores expresados como media (desviación estándar), mediana (rango intercuartil) para datos sesgados, o como "n" para las variables categóricas. **Abreviaturas:** BMI: índice de masa corporal; 25(OH)D: vitamina D total; iPTH: hormona paratiroidea intacta. Valores de "p" referidos a: * χ^2 -test; † tStudent-test; Z: ANCOVA ajustada por sexo, edad y estadio Tanner.

Como puede observarse en la tabla, los niveles medios de 25(OH)D fueron significativamente inferiores en los niños obesos que en los niños con un BMI normal. Por el contrario, los niveles de iPTH estuvieron significativamente más elevados en el grupo obeso. Los niveles séricos de fósforo y el calcio se encontraron siempre dentro de los rangos de normalidad en ambos grupos de estudio. Sin embargo, su producto (fósforo x calcio) fue significativamente más alto en el grupo obeso que en el control (Tabla 3.10).

Con el fin de analizar la relación entre los niveles de vitamina D (y parámetros relacionados) con el grado de obesidad, el grupo de niños obesos se subdividió en dos grupos atendiendo al SDS-BMI: un grupo integrado por niños con un SDS-BMI entre 2 y 4 (n=33) y otro formado por niños con un SDS-BMI>4 (n=33), considerados como extremadamente obesos. Los niveles de vitamina D, de iPTH y las concentraciones de calcio y fósforo séricos en los niños con un índice de masa corporal normal y en los dos grupos de niños obesos se muestran en la figura 3.2.

De acuerdo con nuestros resultados, el grupo de niños extremadamente obeso presenta, respecto al grupo de niños con índice de masa corporal normal, niveles significativamente menores de 25(OH)D y niveles significativamente mayores de iPTH. Los niveles séricos de fósforo fueron superiores en los dos grupos obesos que en el grupo normal, sin diferencias apreciables en los niveles de calcio.

En el grupo obeso, aproximadamente el 30% de los pacientes (n=20) presentó concentraciones séricas de 25(OH)D <20 ng/mL (considerado como insuficiencia de vitamina D), mientras que el 70% restante (n=46) presentó valores de 25(OH)D \geq 20 ng/mL (suficiencia de vitamina D). En ningún caso se detectaron en nuestro estudio niños con un valor inferior a <5 ng/mL (rango de deficiencia severa). Dentro del grupo de niños controles sólo el 5% presentó niveles de vitamina D considerados como insuficientes.

La evaluación de la relación entre el estatus de vitamina D y los factores de riesgo cardiovascular se realizó únicamente en el grupo de niños obesos, mostrándose los resultados en la tabla 3.11. Como puede observarse, las características clínicas y antropométricas de los niños obesos no difirieron significativamente según su estatus de 25(OH)D. El grado de filtración glomerular sugirió una ligera hiperfiltración. Los valores de presión sanguínea fueron similares en ambos grupos; además, la actividad física, ingesta de energía y nutrientes tampoco fue diferente entre ambos grupos. Sin embargo, el grupo con insuficiencia de

vitamina D presentaba valores mayores de iPTH y niveles menores de c-HDL y apoproteína A1 comparado con los niños con suficiencia de vitamina D. Otros factores individuales de riesgo metabólico no difirieron según el estado de suficiencia o insuficiencia de vitamina D.

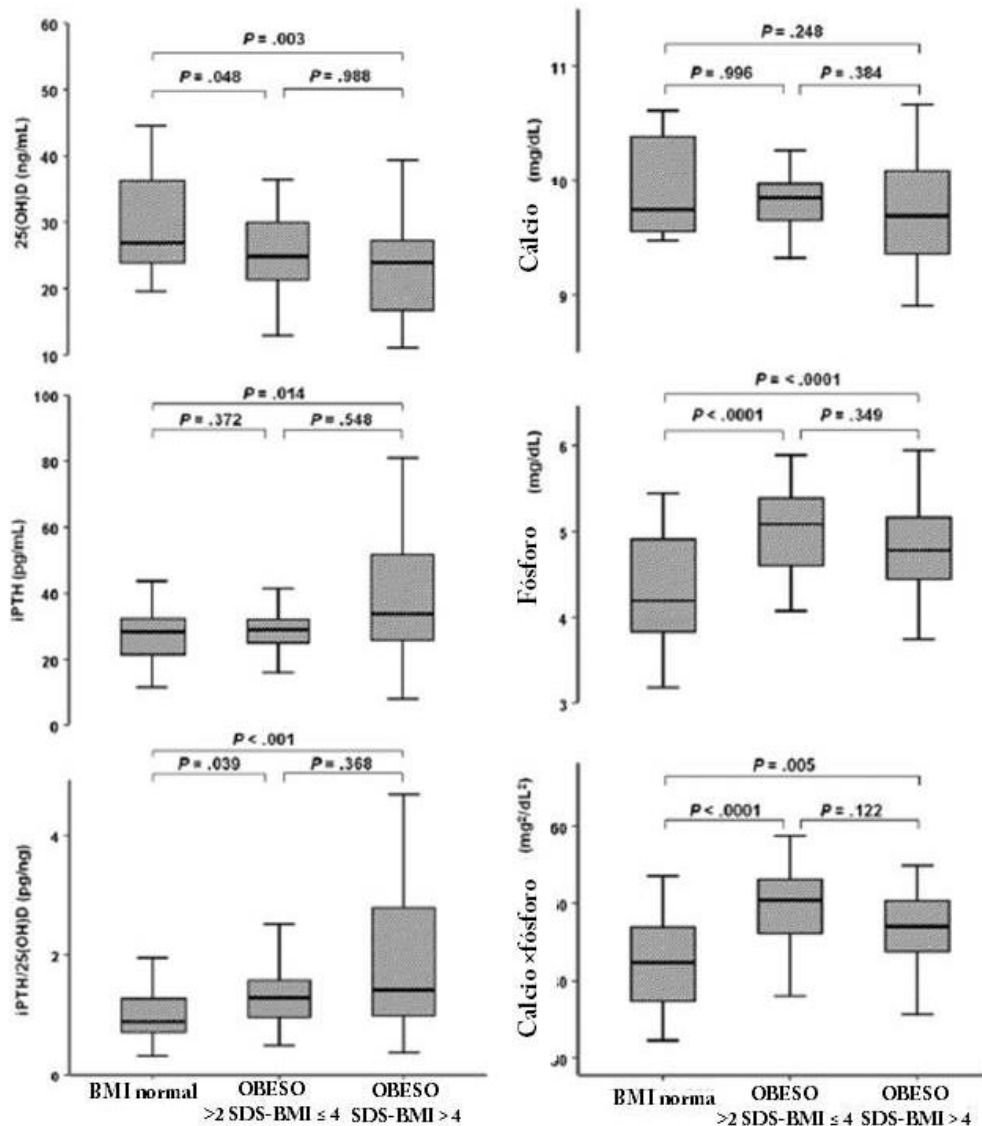


Figura 3.2. Niveles séricos de 25(OH)D, iPTH, relación 25(OH)D/iPTH, calcio, fósforo, y producto calcio x fósforo, en niños con BMI normal (n=39), niños obesos con $2 < \text{SDS-BMI} \leq 4$ (n = 33), y niños extremadamente obesos con $\text{SDS-BMI} > 4$ (n = 33). Los datos se muestran como medianas y rangos intercuartiles.

Tabla 3.11. Datos clínicos, antropométricos y bioquímicos para los 66 niños obesos divididos según los valores de 25(OH)D

	25(OH)D <20 ng/mL (n = 20)	25(OH)D ≥20 ng/mL (n = 46)	p
Sexo (chicos)	14	27	0,384 [*]
Edad (años)	12 (10-13)	11 (8-13)	0,206 [†]
Estadio Tanner	2,3 (0,8)	2,2 (0,9)	0,435 [†]
SDS-BMI	4,5 (3,2-5,3)	3,8 (2,9-5,0)	0,351 [†]
Masa grasa relativa (%)	210 (30)	196 (46)	0,225 [†]
WC relativa (%)	148 (16)	143 (17)	0,285 [†]
SDS BP – sistólica	1,15 (1,1)	1,2 (1,1)	0,762 [†]
SDS BP - diastólica	0,73 (0,43-1,55)	0,53 (0,17-1,21)	0,201 [†]
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	125 (19)	127 (21)	0,643 ^z
Ingesta energética (kcal/d)	1964 (460)	1913 (544)	0,638 ^z
Ingesta vitamina D (mg/d)	5,0 (1,6)	5,2 (1,3)	0,488 ^z
Ingesta calcio (mg/d)	816 (189)	784 (176)	0,556 ^z
Colesterol total (mg/dL)	162 (37)	174 (33)	0,279 ^z
c-HDL (mg/dL)	35 (31-43)	44 (38-51)	0,004 ^z
Triglicéridos (mg/dL)	94 (62-157)	83 (66-119)	0,779 ^z
Apoproteína A1 (mg/dL)	103 (93-124)	121 (111-139)	0,009 ^z
Apoproteína B (mg/dL)	74 (25)	81 (22)	0,300 ^z
Ácido úrico (mg/dL)	4,4 (0,9)	4,5 (1,1)	0,112 ^z
HOMA-IR	3,9 (2,8-7,01)	4,2 (2,8-6,2)	0,978 ^z
25(OH)D (ng/mL)	15,7 (3,0)	28,0 (5,5)	<,0001 ^z
iPTH (pg/mL)	39 (26-52)	29 (26-36)	0,007 ^z
Calcio(mg/dL)	9,7 (9,4-10,0)	9,8 (9,5-10,2)	0,091 ^z
Fósforo (mg/dL)	5,0 (0,5)	4,9 (0,5)	0,698 ^z

Valores expresados como medias (desviación estándar), medianas (rango intercuartil) para datos sesgados, o como frecuencias (n). **Abreviaturas:** BMI: índice de masa corporal; WC: circunferencia de cintura; BP: presión arterial; eGFR: tasa de filtración glomerular estimada; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina; 25(OH)D: vitamina D total; iPTH: hormona paratiroidea intacta.

*Analizados mediante test χ^2 .

†Analizado mediante test t-Student.

Z Analizado usando ANCOVA ajustado por sexo, edad y estado Tanner.

Respecto a los parámetros de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación, y daño endotelial en los niños obesos subdivididos de acuerdo a su estatus de vitamina D se resumen en tabla 3.12. En ella puede observarse la elevación significativa de los marcadores de estrés oxidativo (malondialdehído y mieloperoxidasa), estrés nitrosativo (3-nitrotirosina), inflamación (IL-6) y activación endotelial (sVCAM-1) en el grupo de pacientes obesos con niveles de vitamina D considerados como insuficientes (25(OH)D <20 ng/mL).

Tabla 3.12. Adipocitoquinas, marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación y moléculas de activación endotelial para los 66 niños obesos del estudio divididos de acuerdo a sus niveles de 25(OH)D.

	25(OH)D <20 ng/mL (n = 20)	25(OH)D ≥20 ng/mL (n = 46)	p *
Adiponectina (µg/mL)	0,52 (0,04)	0,51 (0,05)	0,526
Leptina (ng/mL)	132 (50)	133 (46) ,583	0,583
Malondialdehído (µmol/L)	0,91 (0,71-1,22)	0,40 (0,22-1,13)	0,015
Mieloperoxidasa (ng/mL)	60 (40-85)	41 (26-68)	0,027
UNO ₃ /UCr (µmol/mmol)	94 (61-101)	97 (65-128)	0,681
NOx plasma (µmol/L)	32,3 (28,2-36,6)	31,5 (27,5-38,8)	0,958
3-Nitrotirosina (µmol/L)	0,65 (0,37-0,99)	0,42 (0,25-0,57)	0,037
hs-CRP (mg/L)	2,24 (0,8-5,8)	3,0 (1,1-4,3)	0,667
IL-6 (pg/mL)	18,0 (12,2-25,7)	13,7 (10,7-19,3)	0,036
TNF-α (pg/mL)	36,1 (12,5)	33,9 (11,3)	0,409
sICAM-1 (ng/mL)	118 (85-150)	98 (69-147)	0,983
sVCAM-1 (ng/mL)	412 (52)	372 (60)	0,040
sE-Selectina (ng/mL)	14,3 (6,2-30,0)	21,5 (10,5-33,2)	0,275
VEGF (pg/mL)	72 (42-149)	84 (58-166)	0,142

Valores expresados como medias (desviación estándar) o como medianas (rango intercuartil) para datos sesgados.

Abreviaturas: UNO₃/UCr: cociente nitrato/creatinina urinario; NOx: niveles plasmáticos de nitrato + nitrito; hs-CRP, proteína C-reactiva de alta sensibilidad; IL-6: interleuquina-6; TNF-α, factor de necrosis tumoral α; sICAM-1, molécula de adhesión intercelular soluble tipo 1; sVCAM-1, molécula de adhesión celular vascular soluble tipo 1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. *valores de "p" obtenidos mediante ANCOVA ajustado por sexo, edad y estadio Tanner.

En el análisis de correlaciones parciales, corregido por sexo, edad, estado puberal y SDS-BMI, realizado sobre los pacientes del grupo obeso, los niveles de 25(OH)D se relacionaron negativamente con los de 3-nitrotirosina ($r = -0,424$, $p = 0,001$) y los de sVCAM-1 ($r = -0,272$, $p = 0,032$). Los niveles de calcio se asociaron positivamente con los de TNF-α ($r = 0,279$, $p = 0,028$). Las concentraciones séricas de fósforo se correlacionaron directamente con los niveles plasmáticos de nitrito + nitrato ($r = 0,293$, $p = 0,021$) y negativamente con los de hs-CRP ($r = -0,317$, $P = 0,012$).

Señalar, finalmente, que no se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de 25(OH)D, o las concentraciones de calcio y fósforo, con ningún otro marcador de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación, adipocitoquinas o moléculas de adhesión evaluadas en nuestro estudio.

3.4. RESISTINA

Otro de los parámetros incluidos en nuestro estudio es la resistina, una adipocitoquina largamente relacionada con la resistencia insulínica y el riesgo cardiovascular (74,75,78). Las características antropométricas, clínicas y experimentales de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla 3.13.

Tabla 3.13. Características demográficas, clínicas y de laboratorio de la población de estudio.

	Obesos (n = 70)	Normopeso (n = 40)	P
Edad (años)	12 (8–13)	11 (8–13)	0,686 ^b
Género (F/M)	27/43	20/20	0,244 ^a
SDS-BMI	4,2 (2,9–5,0)	-0,45 (-1 to 0,37)	<0,0001 ^c
WC relativa (%)	144 (131–151)	99 (95–107)	<0,0001 ^c
Relación WC/altura	0,63 (0,57–0,65)	0,44 (0,42–0,47)	<0,0001 ^c
Índice masa grasa (kg/m ²)	10,9 (9,2–12,7) 3	3,5 (2,3–5,0)	<0,0001 ^c
c-HDL (mmol/L)	1,07 (0,93–1,27)	1,34 (1,17–1,58)	<0,0001 ^c
Triglicéridos (mmol/L)	0,94 (0,76–1,55)	0,62 (0,47–0,85)	<0,0001 ^c
HOMA-IR	4,1 (2,8–6,5)	1,9 (1,1–2,5)	<0,0001 ^c
SDS BP sistólica	1,12 (0,47–2,24)	-0,01 (-0,7 to 0,56)	<0,0001 ^c
SDS BP diastólica	0,64 (0,18–1,38)	0,0 (-0,46 to 0,27)	<0,0001 ^c
Homocisteína (μmol/L)	7,8 (6,8–8,6)	6,6 (5,9–7,0)	0,014 ^c
hs-CRP (mg/L)	2,8 (0,9–4,4)	0,4 (0,2–0,7)	<0,0001 ^c
sVCAM-1 (ng/mL)	384 (353–425)	372 (332–414)	0,139 ^c
sICAM-1 (ng/mL)	100 (68–150)	61 (36–95)	0,006 ^c
UNO ₃ /UCr (μmol/mmol)	96 (65–113)	67 (55–89)	0,035 ^c
Malondialdehído (μmol/L)	0,81 (0,31–0,89)	0,32 (0,22–0,43)	<0,0001 ^c
Leptina (ng/mL)	130 (95–177)	14 (8–41)	<0,0001 ^c
Adiponectina (μg/mL)	0,52 (0,49–0,55)	0,54 (0,51–0,57)	0,620 ^c
Resistina (ng/mL)	14,3 (13,7–4,7)	14,1 (11,9–14,6)	0,089 ^c

Valores expresados como medias (desviación estándar), medianas (rango intercuartil) para datos sesgados, o como frecuencias para variables categóricas. **Abreviaturas:** BMI: índice de masa corporal; WC: circunferencia de cintura; HDL lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina; BP: presión arterial; hs-CRP, proteína C-reactiva de alta sensibilidad; sVCAM-1, molécula de adhesión celular vascular soluble tipo 1; sICAM-1, molécula de adhesión intercelular soluble tipo 1; UNO₃/UCr: cociente nitrato/creatinina urinario; *valores de “p” obtenidos mediante ANCOVA ajustado por sexo, edad y estadio Tanner. Valores de p referidos a:

^a Análisis mediante χ^2 -test.

^b Análisis mediante el test t-Student.

^c Análisis mediante ANCOVA ajustado por género y estadio Tanner.

Como puede observarse, aunque todos los pacientes obesos sufrían de obesidad severa debido, principalmente, a presentar adiposidad central, su perfil lipídico se encontraba dentro del rango de normalidad. Además los niños obesos mostraron un aumento de los

niveles de hs-PCR y leptina. El nivel medio de resistina no fue significativamente diferente entre el grupo obeso y el control. Sin embargo, cuando el grupo obeso se estratificó de acuerdo a la presencia o no de resistencia a la insulina, se observaron diferencias significativas entre los niños obesos con resistencia insulínica y los niños, tanto obesos como controles, sin resistencia a la insulina en cuanto a los valores de resistina (Figura 3.3).

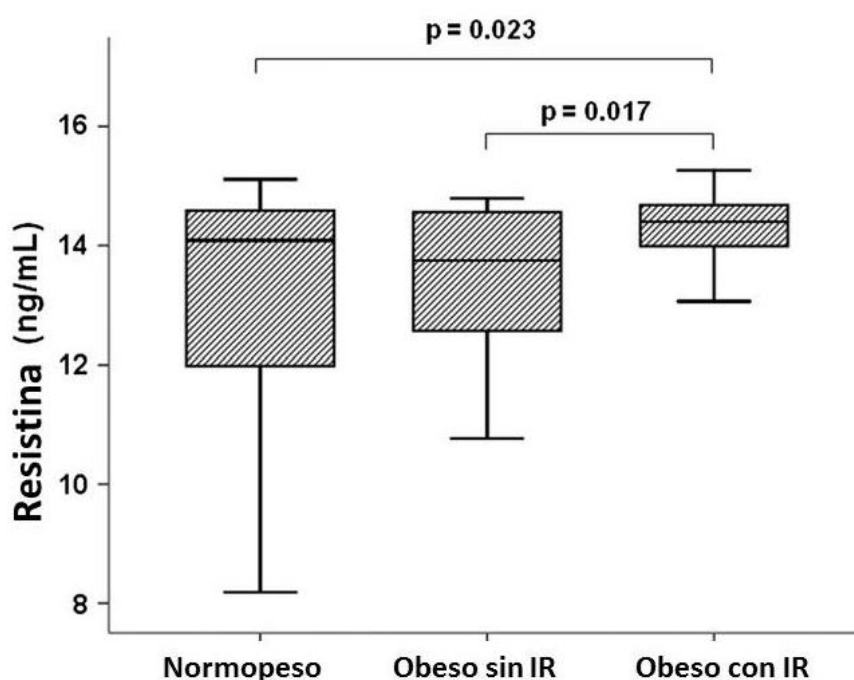


Figura 3.3. Niveles de resistina sérica en niños con normopeso ($n=40$), niños obesos sin resistencia a la insulina ($\text{HOMA-IR} < 3,16$; $n=21$) y niños obesos con resistencia a la insulina ($\text{HOMA-IR} > 3,16$; $n=49$). Los datos se muestran como medianas y rangos intercuartiles.

La correlación de los niveles de resistina con los parámetros clínicos y analíticos se investigó tras corrección por género, estadio Tanner e índice de masa corporal (BMI) en todos los niños y, específicamente, en los niños obesos. Los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la tabla 3.14.

Tabla 3.14. Correlaciones parciales de Pearson entre los niveles de resistina y los datos clínicos y experimentales de todos los niños incluidos en el estudio y de los niños obesos. Valores de las variables ajustados por género, estadio Tanner e índice de masa corporal.

	Todos los niños (n=110)		Niños obesos (n=70)	
	R	p	R	P
WC relativa	0,235	0,015	0,376	0,002
Relación WC/altura	0,223	0,021	0,338	0,005
Índice de masa grasa	0,293	0,002	0,448	<0,0001
Log c-HDL	-0,244	0,011	-0,202	0,101
Log triglicéridos	-0,009	0,928	-0,036	0,774
Log HOMA-IR	0,260	0,007	0,339	0,005
SDS BP sistólica	0,147	0,136	0,026	0,835
SDS BP diastólica	0,009	0,931	-0,167	0,178
Log homocisteína	0,279	0,004	0,382	0,001
Log hs-CRP	0,186	0,055	0,115	0,354
sVCAM-1	0,320	0,001	0,371	0,002
Log sICAM-1	0,266	0,006	0,150	0,227
Log malondialdehído	0,249	0,010	0,248	0,043
Log UNO ₃ /UCr	-0,170	0,080	-0,329	0,007
Leptina	0,259	0,007	0,338	0,005
Adiponectina	0,034	0,724	0,110	0,376

Abreviaturas: WC: circunferencia de cintura; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina; BP: presión arterial; hs-CRP: proteína-C reactiva de alta sensibilidad; sVCAM-1: molécula soluble de adhesión celular vascular tipo 1; sICAM-1: molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1; UNO₃/UCr: cociente nitrato/creatinina urinario.

De acuerdo con los resultados del análisis de correlaciones parciales de Pearson, los niveles de resistina se mostraron directa y significativamente asociados con las medidas de obesidad central, como la circunferencia de cintura relativa y la relación cintura/altura, así como el índice de masa grasa. La asociación directa entre resistina y resistencia insulínica se evidenció a través de la correlación con el índice HOMA-IR. Otros parámetros característicos del síndrome metabólico (como hipertensión arterial y perfil lipídico), hs-CRP y valores de adiponectina, no presentaron asociación con los niveles de resistina.

Sin embargo, sí se observó correlación directa entre los niveles de resistina y los de homocisteína, leptina, sVCAM-1 y malondialdehído. Por el contrario, la correlación de la resistina plasmática con los niveles de nitrato urinario fue negativa.

En base a estos resultados, se realizó un análisis de regresión múltiple en los sujetos obesos que incluyó, en el modelo estadístico inicial, todos aquellos parámetros correlacionados significativamente con los niveles plasmáticos de resistina. Los resultados de dicho análisis se recogen en la tabla 3.15 e indican que, de las variables inicialmente consideradas, sólo sVCAM-1, homocisteína y nitrato urinario permanecen significativamente asociados con la resistina con una $R^2 = 0,347$ ($p < 0,0001$), siendo la asociación más fuerte la que se observa entre los niveles plasmáticos de resistina y los niveles urinarios de nitrato (coeficiente β estandarizado $-0,316$, $p = 0,003$).

Tabla 3.15. Análisis de regresión múltiple para la resistina como variable dependiente en los niños obesos.

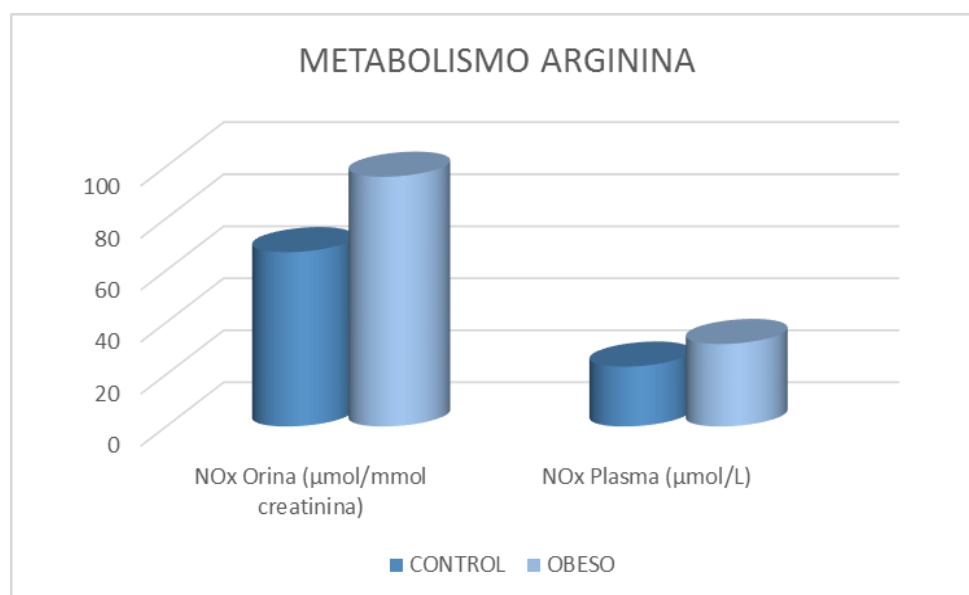
Variables independientes	Coefficiente B (IC 95%)	Coefficiente β	t	P
Constante			2,866	0,006
Circunferencia de cintura relativa	0,020 (0,000, 0,040)	0,200	1,953	0,055
Log homocisteína	3,684 (1,014, 6,353)	0,268	2,756	0,008
Nitrato urinario	-0,015 (-0,024, -0,005)	-0,316	-3,125	0,003
sVCAM-1	0,007 (0,001, 0,013)	0,236	2,454	0,017

(R^2 Ajustada = 0,347; $p < 0,0001$). Variables predictivas incluidas en el análisis. Circunferencia de cintura relativa, estadio Tanner, índice HOMA-IR, sVCAM, homocisteína, nitrato urinario y leptina.

3.5. RESUMEN COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES ENTRE PACIENTES OBESOS Y CONTROLES

En las secciones anteriores, los resultados de todos los parámetros experimentales evaluados en este estudio se han mostrado y analizado en función de las variables que los condicionaban o con las que se relacionaban. Sin embargo consideramos que, con fines comparativos, resulta interesante e informativo mostrar las diferencias observadas en todos ellos entre los pacientes del grupo obeso y el control.

La comparativa entre el grupo obeso y el control respecto a los parámetros evaluados del metabolismo de la arginina se muestra en la figura 3.4 (nitrato en plasma y orina; evaluación de la síntesis de óxido nítrico) y en la figura 3.5 (niveles sanguíneos de poliaminas).

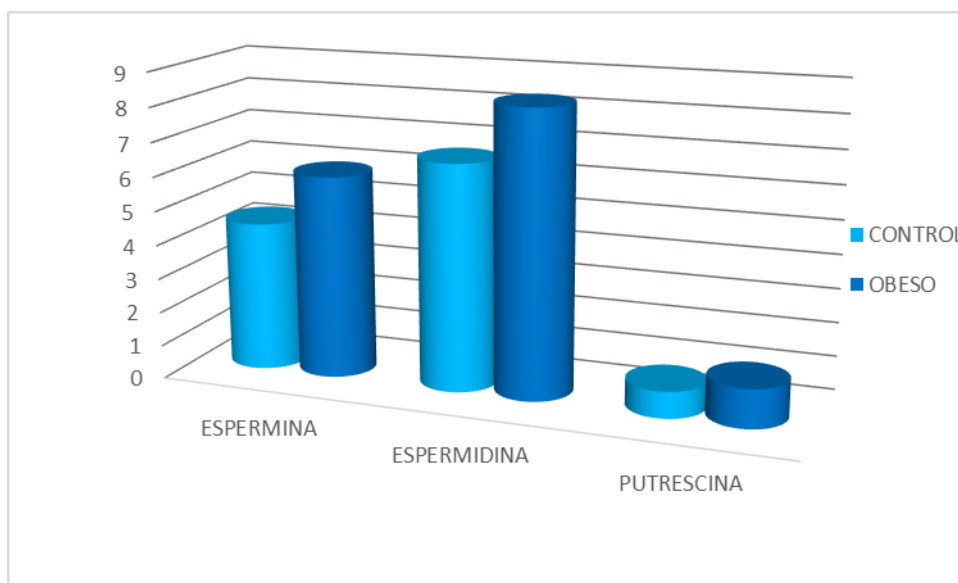


	CONTROL	OBESO	P
NOx Orina (µmol/mmol creatinina)	67 (55-89)	96 (65-113)	0,035
NOx Plasma (µmol/L)	23,0 (21,4-26,7)	31,7 (27,5-37,4)	<0,0001

Figura 3.4. Niveles plasmáticos y urinarios de nitrito + nitrato en niños obesos y con normopeso.

En relación a los niveles de productos finales del metabolismo del óxido nítrico (nitrito + nitrato; NOx), como puede observarse, tanto sus valores plasmáticos como urinarios se encuentran significativamente elevados en el grupo obeso respecto al control, siendo el aumento mucho más evidente en el caso del plasma.

Respecto a los niveles sanguíneos de poliaminas, nuestro estudio ha evidenciado un aumento claro y significativo de putrescina, espermidina y espermina en el grupo obeso respecto al control con normopeso (figura 3.5).

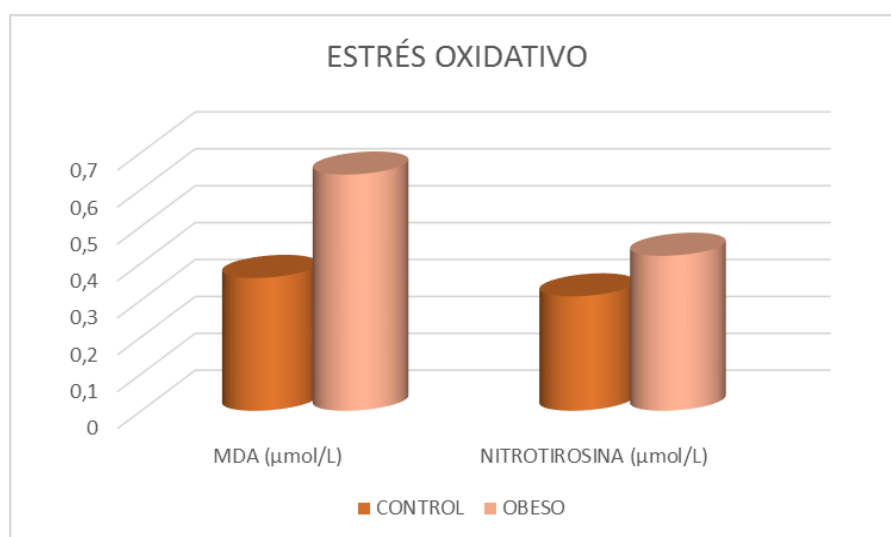


	CONTROL	OBESO	P
<i>ESPERMINA</i> (μmol/L)	4,40 ± 1,56	5,97 ± 1,89	<0,0001
<i>ESPERMIDINA</i> (μmol/L)	6,65 ± 1,60	8,35 ± 2,22	<0,0001
<i>PUTRESCINA</i> (μmol/L)	0,78 (0,65-1,00)	1,14 (0,97-1,48)	0,003

Figura 3.5. Niveles sanguíneos de putrescina, espermidina y espermina en niños obesos y con normopeso.

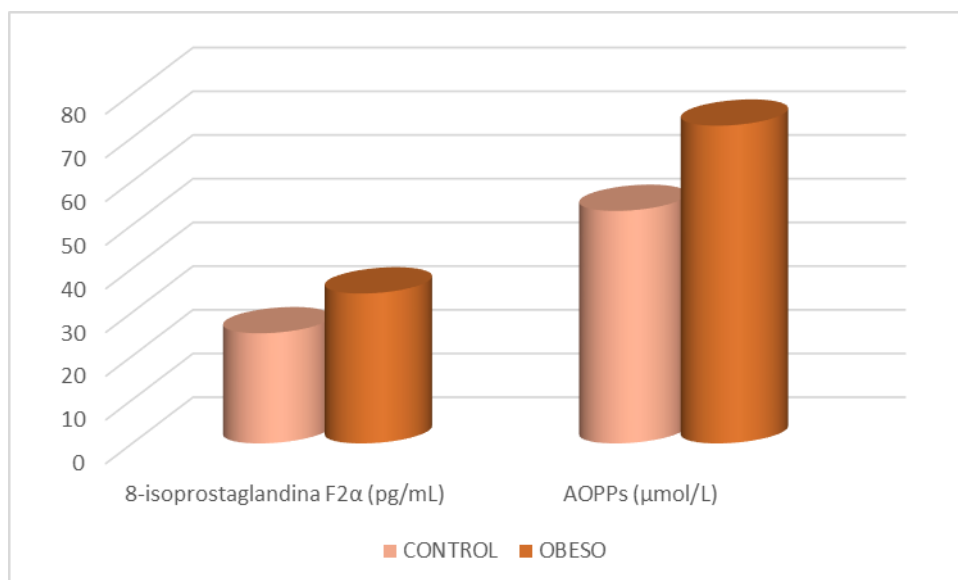
Nuestro estudio sobre parámetros relacionados con el estrés oxidativo y nitrosativo ha incluido la determinación de malondialdehído (MDA), 8-isoprostanos, AOPPS y nitrotirosina. Los niveles de estos marcadores se han representado agrupados atendiendo única y exclusivamente a la comparativa de sus niveles.

Como puede observarse en la figura 3.6, tanto los niveles de MDA como los de nitrotirosina se encontraron significativamente elevados en el grupo de pacientes obesos respecto al grupo control. Un comportamiento análogo se observa para los niveles de 8-isoprostanos y de productos avanzados de oxidación proteica (AOPPs), con niveles significativamente más altos también en el grupo obeso que en el control con normopeso (figura 3.7). El conjunto de estos marcadores muestra elevación en el grupo obeso del estrés oxidativo y del daño inferido por éste a lípidos y proteínas.



	CONTROL	OBESO	P
MALONDIALDEHÍDO (MDA; μmol/L)	0,36 (0,22-0,78)	0,64 (0,27-1,18)	0,015
NITROTIROSINA (μmol/L)	0,31 (0,13-0,51)	0,42 (0,25-0,75)	0,016

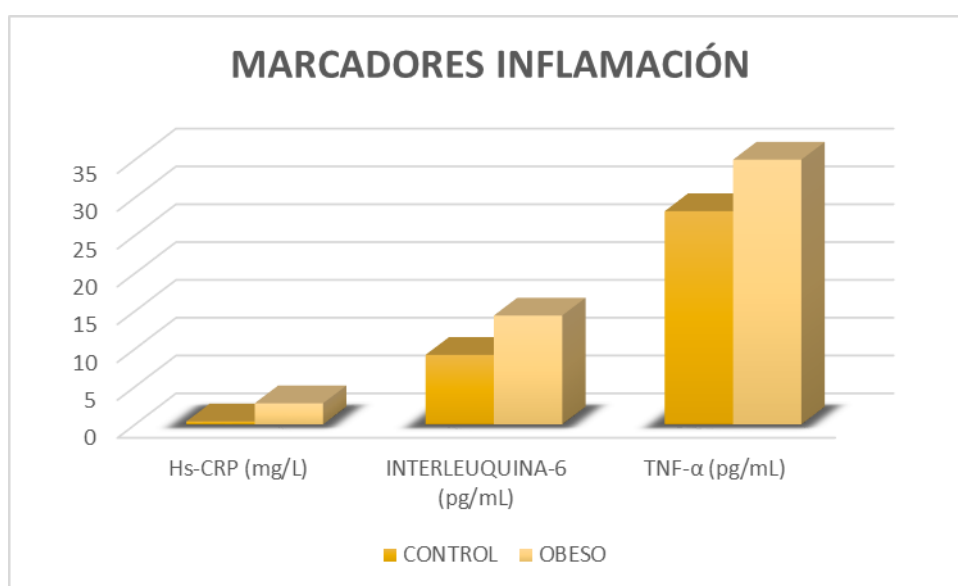
Figura 3.6. Niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) y nitrotirosina en niños obesos y con normopeso.



	CONTROL	OBESO	P
8-isoprostaglandina F_{2α} (pg/mL)	25,2 (18,4-32,6)	34,3 (24,5-50,6)	<0,001
AOPPs (μmol/L)	53,2 ±14,5	72,7±16,6	<0,0001

Figura 3.7. Niveles plasmáticos de 8-isoprostanos y AOPPs en niños obesos y con normopeso.

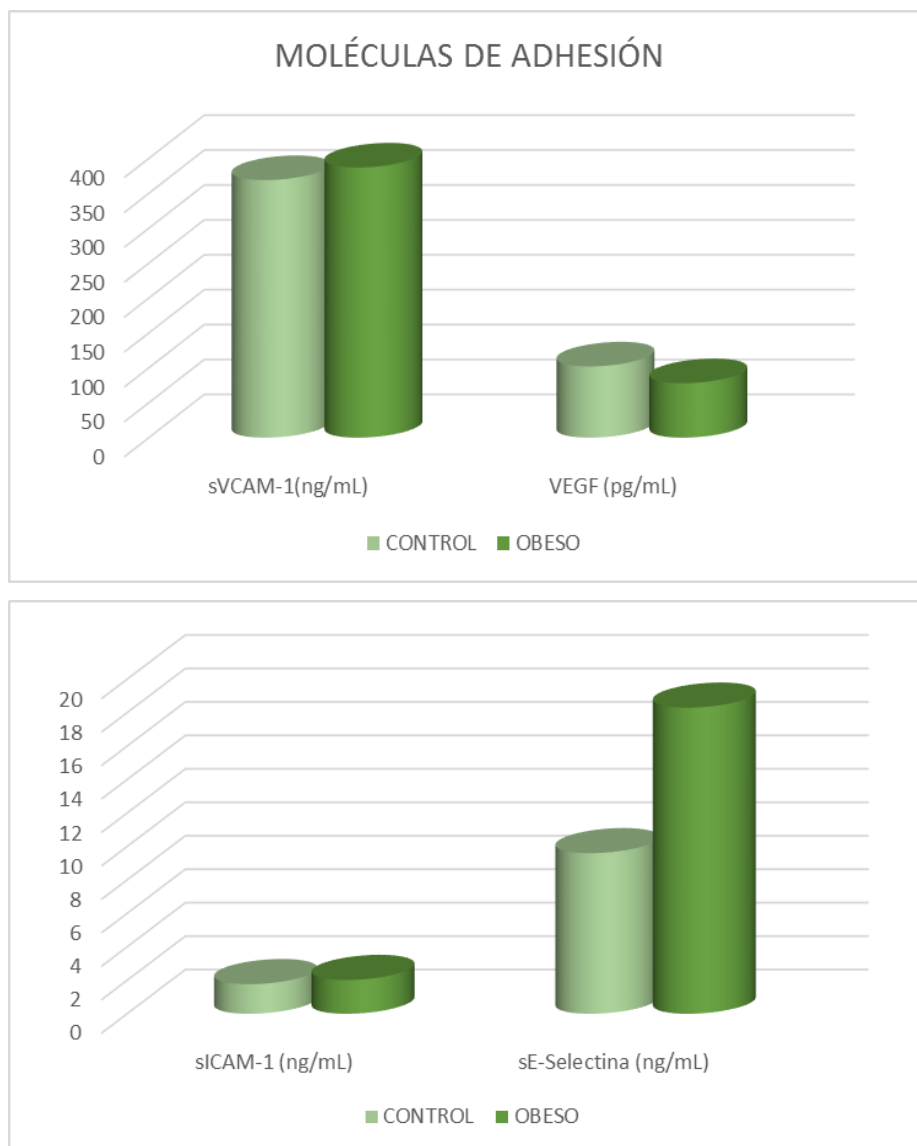
En la evaluación de otros parámetros relacionados con el riesgo cardiovascular, nuestro estudio ha incluido la determinación de hs-CRP, IL-6 y TNF- α como marcadores de inflamación. Los tres indicadores se encontraron significativamente elevados en el grupo obeso respecto al control, indicando un mayor grado de inflamación asociado a la obesidad (figura 3.8).



	CONTROL	OBESO	P
<i>hs-CRP (mg/L)</i>	0,4 (0,2-0,9)	2,8 (0,8-4,3)	<0,0001
<i>INTERLEUQUINA-6 (pg/mL)</i>	9,2 (7,6-12,2)	14,4 (10,7-20,0)	<0,0001
<i>TNF-α (pg/mL)</i>	28,2 \pm 8,0	35,0 \pm 11,6	<0,0001

Figura 3.8. Niveles plasmáticos de hs-CRP, IL-6 y TNF- α en niños obesos y con normopeso.

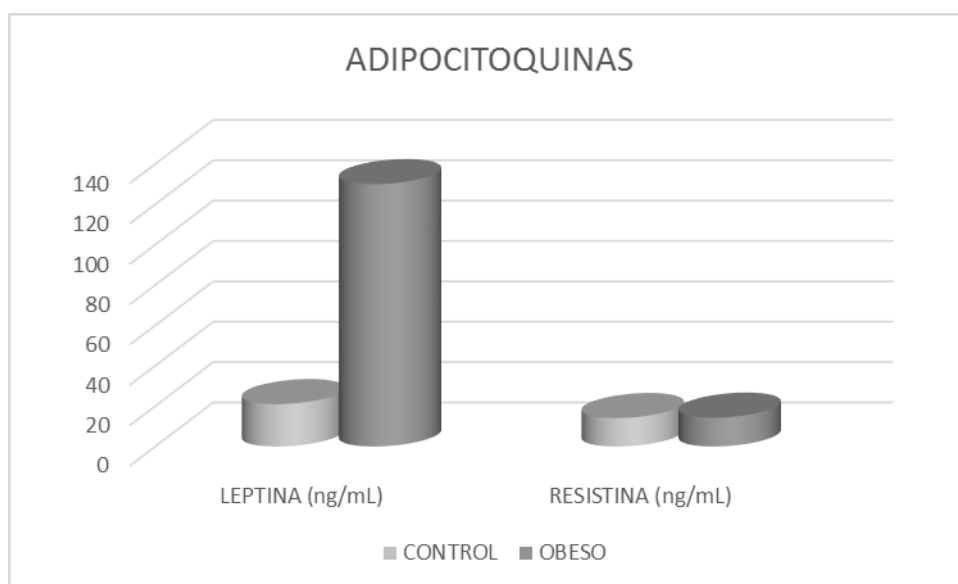
Las moléculas relacionadas con la adhesión y funcionalidad endotelial valoradas en nuestro estudio han sido sE-Selectina, sICAM-1, sVCAM-1 y VEGF. De ellas, tanto sICAM-1 como sE-Selectina mostraron niveles significativamente superiores en el grupo obeso respecto al control. Sin embargo, los niveles de sVCAM-1 y VEGF no difirieron significativamente entre ambos grupos (figura 3.9).



	CONTROL	OBESO	P
<i>sICAM-1 (ng/mL)</i>	1,77 (1,55-1,87)	2,02 (1,85-2,18)	<0,001
<i>sVCAM-1(ng/mL)</i>	369 ±81	387±60	0,120
<i>sE-Selectina (ng/mL)</i>	9,6 (6,2-18,4)	18,3 (8,2-31,8)	<0,001
<i>VEGF (pg/mL)</i>	102 (72-175)	78 (55-171)	0,267

Figura 3.9. Niveles plasmáticos de sE-Selectina, sICAM-1, sVCAM-1 y VEGF en niños obesos y con normopeso.

Los resultados de la valoración de los niveles de las adipoquinas leptina y resistina (figura 3.10) muestran que sólo la leptina se encuentra significativamente elevada en el grupo obeso frente al control. La ligera elevación de los niveles de resistina en los pacientes obesos no alcanzó significación estadística (p=0,051).



	CONTROL	OBESO	P
LEPTINA (ng/mL)	21 (2-127)	130 (96-181)	<0,0001
RESISTINA (ng/mL)	14,1 (13,2-14,6)	14,3 (13,7-14,6)	0,051

Figura 3.10. Niveles plasmáticos de leptina y resistina en niños obesos y con normopeso.

Finalmente el estudio de los parámetros relacionados con la vitamina D y el metabolismo fósfo-cálcico en nuestra población infantil mostró los resultados representados en la figura 3.11. Como puede observarse, el grupo obeso presenta, respecto al control, niveles significativamente más bajos de vitamina D (25(OH)D). Por el contrario, los niveles de iPTH y fósforo se encuentran significativamente elevados en el mismo grupo. Los niveles de calcio sérico no difirieron significativamente entre ambos grupos.

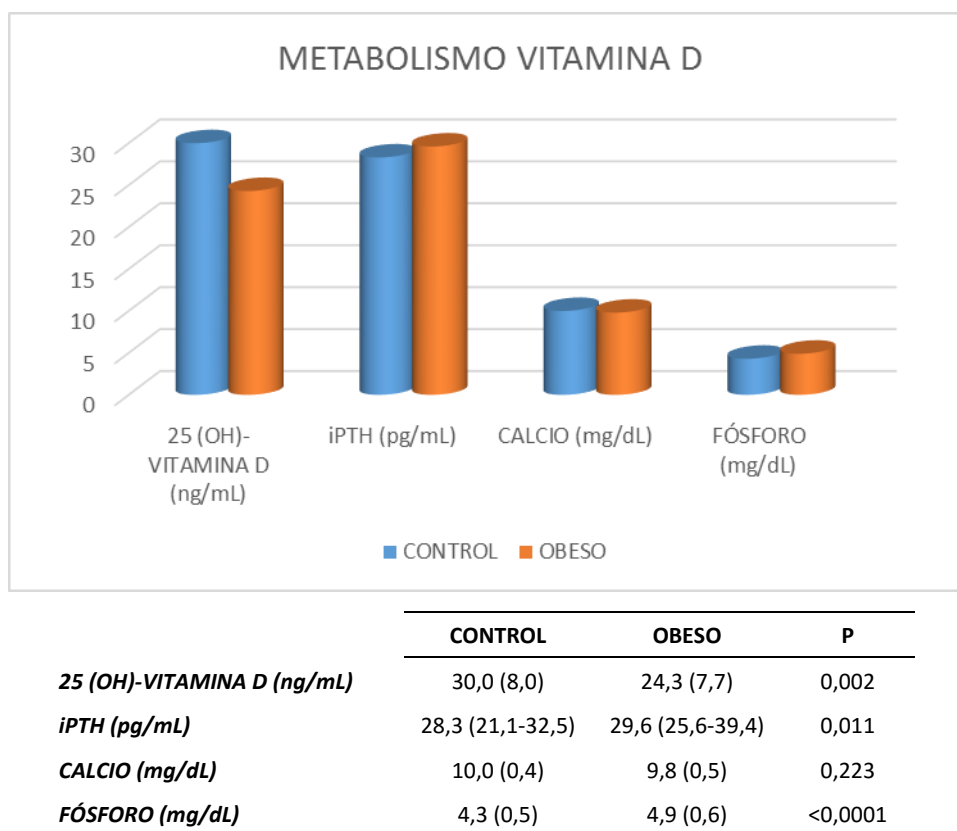


Figura 3.11. Niveles plasmáticos de vitamina D, iPTH, calcio y fósforo en niños obesos y con normopeso.

4. DISCUSIÓN

Como ya hemos comentado anteriormente, la importancia de la obesidad radica en su cada vez mayor prevalencia en la población, incluyendo la población infantil que es la que ha ocupado el presente estudio (15–18). La obesidad infantil, caracterizada por un BMI superior al p95 para edad y sexo, predispone fuertemente al desarrollo de numerosas patologías en la edad adulta (12). Sin embargo, a pesar de la clara relación entre la obesidad, sus alteraciones metabólicas asociadas y el riesgo cardiovascular en individuos adultos, los estudios realizados sobre pacientes jóvenes son escasos (190). Por ello, el objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar la presencia en la población infantil de diferentes marcadores que podrían ser indicativos de alteraciones tempranas y daño precoz a distintos niveles y, particularmente, a nivel vascular. La constatación de estas alteraciones y la identificación de sus marcadores precoces podrían orientar tanto en la evaluación del ulterior riesgo cardiovascular de los pacientes, así como en la eficacia de las diferentes opciones terapéuticas.

Reseñar que, dentro de nuestro objetivo global de establecer las bases bioquímicas y moleculares que conectan la obesidad con el riesgo cardiovascular, los trabajos del presente estudio en niños obesos se han desarrollado paralelamente a los del abordaje experimental en un modelo genético de obesidad y riesgo cardiovascular (ratones ob/ob C57BL/6). Corroborar las alteraciones encontradas en dicho modelo animal a nivel de humano, poder establecer parámetros indicativos de la evolución de la obesidad y sus complicaciones, así como abrir la posibilidad de profundizar en sus causas y mecanismos son potencialidades derivadas del análisis comparativo de los resultados en ambos modelos de obesidad.

Son numerosas las alteraciones descritas en pacientes obesos y que se han relacionado con el deterioro inicial de la función endotelial y el ulterior desarrollo de enfermedad cardiovascular (30,37,53,58,110,112,127,140). Entre dichas alteraciones destaca el daño a biomoléculas provocado por un aumento en la producción de radicales libres por el organismo. Es decir, el aumento del estrés oxidativo (140,154,156,191). Diferentes biomarcadores de daño oxidativo sistémico han sido valorados en nuestro estudio. Particularmente, los niveles de productos avanzados de oxidación protéica (AOPPs) y los de grupos –SH de las proteínas, y los de malondialdehído (MDA) y 8-isoprostanos como indicadores de peroxidación lipídica.

Un segundo aspecto de nuestro estudio ha sido el análisis de distintos parámetros relacionados con el metabolismo de la arginina, el sustrato precursor del óxido nítrico (NO). Aunque el descenso en la biodisponibilidad de NO se ha identificado como una de las

alteraciones primarias de la disfunción endotelial en la obesidad y otras patologías de RCV, la controversia sobre sus niveles de producción sigue abierta (120–123,192). Con el fin de obtener datos sobre este aspecto en la población pediátrica obesa, hemos valorado en nuestro estudio la producción global de NO a través de los niveles de sus productos finales estables, nitrato y nitrito, tanto en plasma como en orina. Pero nuestro estudio ha incluido, además, el análisis de los niveles sanguíneos de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina), otros metabolitos derivados indirectamente de la arginina y con un importante papel en el crecimiento y la proliferación celular (127). La relación entre niveles de poliaminas, disfunción endotelial y riesgo cardiovascular permanece prácticamente inexplorada. Sin embargo, trabajos previos de nuestro grupo de investigación parecen indicar que la elevación de los niveles circulantes de poliaminas podría ser un evento común en las patologías de RCV (193–195). Comprobar estas observaciones en la obesidad infantil y profundizar en su significado creemos que es uno de los aspectos más novedosos e interesantes del presente estudio.

La obesidad también se ha descrito que es un proceso que presenta un fenómeno de inflamación de bajo grado en sus estadios iniciales (57), y que ha sido evaluado en nuestro estudio a través de los niveles de diferentes adipocitoquinas y marcadores de inflamación como leptina, adiponectina, resistina, IL-6 y TNF- α . El conjunto de alteraciones descritas (estrés oxidativo, biodisponibilidad de NO, inflamación) asocian la obesidad a aterosclerosis, caracterizada por una disfunción del endotelio vascular (99). Las propiedades del endotelio han sido evaluadas también en nuestro estudio mediante la determinación de moléculas de adhesión como sVCAM-1, iCAM-1 y VEGF.

De acuerdo con el diseño de nuestro estudio, reseñar que todas las determinaciones se han realizado, de forma simultánea y comparativa, en niños controles con normopeso y niños obesos en los que se han valorado tanto marcadores de la síntesis de NO, como de poliaminas, estrés oxidativo, adipoquinas, citoquinas inflamatorias y moléculas de activación endotelial.

Entre los primeros hallazgos de nuestro estudio se encuentra la observación de que, comparados con los niños normopeso, los niños obesos presentan niveles más altos de los parámetros indicativos de la síntesis de óxido nítrico que, además, se encontraban relacionados con un aumento en los marcadores de estrés oxidativo y con la acumulación de factores de riesgo metabólico (MRFs). Así, los niveles plasmáticos de nitrito y AOPPs se

encontraron clara y significativamente elevados en los pacientes obesos con 4 o más MRFs (≥ 4 MRFs) frente los que presentaban menos de 4 MRFs (< 4 MRFs). Por el contrario, los niveles de nitrato urinario fueron inferiores en el grupo de pacientes obesos con ≥ 4 MRFs. Además, cuando se analizaron los parámetros del metabolismo del NO individualmente en los niños obesos, se encontraron asociaciones positivas entre el nitrito en plasma y los niveles de triglicéridos, y entre el nitrato en plasma con las medidas antropométricas de obesidad abdominal, ácido úrico y TNF- α , si bien se encontró una relación inversa entre el nitrato urinario y los niveles de homocisteína.

Aunque la importancia de la vía del óxido nítrico en la génesis de la aterosclerosis se conoce bien, han surgido datos contradictorios relacionados con los marcadores del metabolismo del NO, particularmente en la obesidad infantil. En pacientes obesos jóvenes, se ha descrito un descenso significativo de las medidas combinadas de nitrato/nitrito (globalmente denominado como NOx) que podría contribuir a la biodisponibilidad reducida de NO y, por extensión, a la disfunción endotelial (122). Sin embargo, también se han descrito recientemente elevaciones de las concentraciones de NOx en niños obesos y su relación con el síndrome metabólico (124). La producción excesiva de NO en pacientes obesos está apoyada por el hecho de su descenso en pacientes con obesidad mórbida tras ser sometidos a intervención bariátrica (196). La cuantificación de la producción de NO "in vivo" es difícil debido a su rápida oxidación, pero pueden obtenerse datos relacionados con este proceso a través de marcadores indirectos de su producción. El nitrito y nitrato en plasma humano son los productos de oxidación del NO generado por las óxido nítrico sintasas e indicadores cuantitativos de la formación de NO. Los niveles de nitrito se han propuesto como indicadores del NO bioactivo sintetizado por la NOS endotelial en la pared vascular. Por el contrario, el nitrato plasmático, y por tanto el NOx, sería indicativo de la producción corporal total de NO. El nitrato se excreta a través del riñón por filtración glomerular, pero una proporción importante es reabsorbida activamente por el túbulo distal lo que explica su baja tasa de aclaramiento. Así pues, el nitrato urinario, al igual que el nitrato plasmático, refleja el estado de equilibrio de la producción de NO corporal total (197).

En nuestro estudio, hemos encontrado evidencias de un aumento significativo, en lugar de reducciones, en todos los parámetros plasmáticos del metabolismo del NO en el grupo de pacientes obesos, principalmente en presencia de un grupo de factores de riesgo metabólico. Esta observación sugiere que hay aumento en la producción de NO en los estadios

más tempranos de la obesidad y que está relacionado con el riesgo metabólico de acuerdo con los datos de Ghasemi et al (124). Es posible que las discrepancias encontradas entre nuestros resultados y los de Gruber et al (122), deriven de las diferencias entre los sujetos de estudio, principalmente con respecto a la edad pues la pubertad modifica los factores de riesgo metabólico. Así, los niños incluidos en nuestro estudio son más jóvenes que los del estudio de Gruber (122). Es posible que, en los estadios iniciales de la obesidad, se produzca un aumento compensatorio de la síntesis de NO, y que ésta disminuya en estadios más avanzados. El aumento en la producción de NO podría responder a una respuesta adaptativa temprana mediada por la regulación al alza de la NOS endotelial (eNOS) (120). Además, la diferenciación adipogénica en la obesidad aumenta la expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS), lo que puede llevar a un aumento en la generación de NO (198). La expresión de la iNOS puede considerarse como uno de los aspectos de la inflamación crónica asociada a la obesidad. En este sentido, nosotros hemos observado una correlación positiva entre el nitrato en plasma y la citoquina proinflamatoria TNF- α , que precede habitualmente al aumento en la interleuquina-6 (IL-6) y la proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hs-RCP) en la cascada inflamatoria (58). Por lo tanto, los cambios en la producción del óxido nítrico pueden surgir a través de complejas interacciones entre los factores que regulan la actividad y expresión de las óxido nítrico sintetas, y que podrían variar en el curso de la obesidad.

En nuestro estudio hemos encontrado correlaciones entre los niveles plasmáticos de 8-isoprostanos $F_{2\alpha}$ y malondialdehído con los indicadores de la producción de óxido nítrico. Un aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) podría limitar la biodisponibilidad de NO al convertirlo en peroxinitrito, desencadenando además estrés nitrosativo. El peroxinitrito es un pro-oxidante muy potente que puede modificar residuos de tirosina para producir nitrotirosina, que se considera tiene un papel muy importante en el proceso vascular citotóxico (199). El aumento en los niveles de nitrotirosina en los niños obesos con independencia de la presencia de factores de riesgo metabólico observado en nuestro estudio, sugiere que éste es un evento temprano en el curso natural de la obesidad.

Debido a la complejidad de las reacciones químicas implicadas en el metabolismo del NO y sus interrelaciones con el estrés oxidativo, no es fácil discriminar si los aumentos o disminuciones de los productos indirectos del óxido nítrico (nitrito y nitrato) son indicativos de beneficios o perjuicios en la obesidad. Simplemente son una medida de la generación y eliminación del NO y no tienen implicaciones pronósticas.

Hay que destacar la correlación significativa observada en nuestro estudio entre los factores metabólicos y los parámetros del metabolismo del NO y que apunta a su relación con la elevación de su producción (200). Sin embargo, nosotros no hemos encontrado una relación entre la resistencia a la insulina y los marcadores de la vía del NO, posiblemente porque la insulinemia es muy dependiente de la edad, y sólo podría detectarse incrementando el número de sujetos de la muestra poblacional, como ocurre en el estudio de Ghasemi et al (124).

Puede resultar sorprendente nuestra observación de que, al contrario del nitrato plasmático, los valores urinarios de nitrato no parecen resultar afectados por los factores de riesgo metabólico considerados en nuestros pacientes. A pesar de ello, nuestros datos indican una interesante y estadísticamente significativa relación inversa entre el nitrato urinario y la homocisteína, un factor de riesgo independiente para la enfermedad aterosclerótica vascular temprana. En este aspecto, nuestros resultados concuerdan con los del estudio de O'Kane et al (201). La tasa de excreción del nitrato en la orina evalúa de forma gradual los cambios en la síntesis corporal de NO a más largo plazo. Alternativamente, una mínima disfunción renal en la obesidad podría explicar la disminución en la excreción de nitrato observada pues el lecho vascular renal es extremadamente sensible a cambios en la función endotelial.

La evaluación conjunta de los datos sobre la síntesis de NO nos lleva a sugerir que, en los niños obesos, el aumento en la síntesis de NO es un evento temprano asociado con el estrés oxidativo y la inflamación, y que las interrelaciones entre estos eventos podrían jugar un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis en edades tempranas.

Por lo que respecta a los niveles de poliaminas, creemos que un hallazgo clave y novedoso del presente estudio es que el aumento de la adiposidad en niños se asocia a una elevación en los niveles de las tres principales poliaminas circulantes, putrescina, espermidina y espermina. De entre ellas, la espermina es la poliamina que presenta un mayor poder discriminatorio en la obesidad, además de ser la poliamina de la que más se han estudiado sus funciones biológicas (202). Según nuestros resultados, los niveles de espermina están relacionados con los marcadores de la vía del óxido nítrico, estrés oxidativo, inflamación y leptina. Curiosamente, y sólo en niños obesos, hemos observado una correlación negativa con la 3-nitrotirosina y una asociación positiva con el VEGF, un factor que juega un papel crucial en la angiogénesis tanto fisiológica como patológica.

En el presente estudio hemos observado que los niveles circulantes de las tres principales poliaminas eran significativamente más altos en los niños obesos que en los controles con normopeso. Esta elevación en los niveles de poliaminas sugiere un aumento en la actividad de la ornitina decarboxilasa (ODC) o una inhibición de su antizima, una proteína reguladora que controla la actividad de la ODC. De hecho, una asociación entre polimorfismos genéticos del antizima de la ODC y las manifestaciones clínicas en la enfermedad coronaria cardíaca ha sido descrita (203), haciendo hincapié en el papel del metabolismo de las poliaminas en la enfermedad vascular. En este contexto, los niveles elevados de poliaminas observados en niños obesos pueden sugerir una conexión entre la obesidad y los desórdenes vasculares a través de mecanismos de proliferación celular.

Según nuestro estudio, los niveles de espermina están relacionados también con marcadores de estrés tanto nitrosativo como oxidativo. La fuerte estructura nucleofílica de las poliaminas puede bloquear y secuestrar radicales, y actuar como un antioxidante. Se ha sugerido que las poliaminas refuerzan los sistemas antioxidantes en eritrocitos, de forma que la concentración total de poliaminas en estas células constituye un factor crítico en determinar su sensibilidad frente a las especies reactivas del oxígeno (204). Así, el aumento en los niveles de poliaminas observado en los niños obesos podría estar relacionado con una regulación al alza de su síntesis debido al estrés oxidativo presente en la obesidad, pudiendo actuar como un mecanismo compensatorio.

Otro argumento en favor del posible papel protector de las poliaminas es la asociación negativa observada en nuestro estudio de la espermina con los niveles de 3-nitrotirosina en los niños obesos. De hecho, la 3-nitrotirosina ha sido considerada como un marcador de daño cardiovascular (205). Recientemente se ha implicado a la nitración de tirosinas en la inmunomodulación proporcionando un mecanismo nuevo de tolerancia de las células T en el cáncer (206). Otros papeles protectores propuestos para las poliaminas incluyen acciones antiglicantes, que protegerían frente a las complicaciones de la diabetes (207). Además, el aumento del catabolismo de las poliaminas puede inducir desacoplamiento en la oxidación de ácidos grasos y sensibilidad a insulina (208). Estas observaciones apoyan un posible papel de las poliaminas frente a la disfunción metabólica en la obesidad.

Se ha descrito que las poliaminas son requeridas para el proceso de diferenciación de los fibroblasto 3T3-L1 en adipocitos (209). Este proceso regula la formación de adipocitos y, en

consecuencia, la obesidad. En el presente estudio hemos observado que los niveles de poliaminas aumentan a medida que lo hacen los índices de adiposidad, lo que apoya su papel en el crecimiento y desarrollo del tejido adiposo. Además, se conoce que la expansión de este tejido está asociada con una angiogénesis activa que debe estar mediada por factores angiogénicos tales como el VEGF (210). Este factor se expresa en el tejido adiposo y se regula al alza durante la diferenciación de los adipocitos. Podemos hipotetizar que la producción de VEGF relacionada a los niveles de poliaminas podría ser un evento beneficioso en una etapa temprana de la formación de la placa aterosclerótica como ocurre en niños (211). El VEGF aumenta la angiogénesis y el desarrollo vascular y promueve la oxigenación de la pared arterial. Sin embargo, esta relación también proporciona un posible nexo para el mecanismo del cáncer asociado a obesidad. Además, el aumento de poliaminas puede afectar a la metilación del DNA pues ambas dependen de la S-adenosilmetionina como sustrato (212). Entrando en el terreno de la especulación, resulta atrayente una posible conexión entre obesidad y riesgo de cáncer a través de un aumento de estas aminas biológicas.

Sin lugar a dudas, las poliaminas presentan un doble papel, y serán necesarios estudios a gran escala para definir mejor el impacto potencial de las poliaminas en el entorno clínico. En este sentido, este estudio muestra un aumento de los niveles de poliaminas en la obesidad infantil que podrían ser una respuesta a las condiciones oxidativas. Su posible papel protector frente a disfunciones metabólicas y su conexión con el riesgo de cáncer en la obesidad merecen mayor atención.

Existen abrumadoras evidencias clínicas y experimentales de la estrecha conexión entre estrés oxidativo y disfunción endotelial en las patologías de RCV y en particular en la obesidad (58,156,213). De hecho, se ha sugerido que la valoración del estrés oxidativo podría ser utilizada para identificar a nivel clínico a los pacientes con riesgo de complicaciones metabólicas y cardiovasculares subsecuentes (214). La valoración del estrés oxidativo en nuestros pacientes pediátricos se ha realizado cuantificando distintos productos “marcadores” del daño inferido a las moléculas biológicas por los radicales libres. Entre los marcadores cuantificados se encuentran los niveles plasmáticos de AOPPs (productos avanzados de oxidación proteica), como indicadores del daño oxidativo a proteínas. Estudios previos habían planteado ciertas dudas acerca de la sobreestimación de los AOPPs por el clásico ensayo espectrofotométrico (169) debida, principalmente, a una interferencia turbidimétrica mediada por los triglicéridos (171,215). Cuando incluimos un paso de precipitación para minimizar los

lípidos plasmáticos (171), observamos una reducción marcada en los niveles de AOPPs y una disminución en la correlación con los triglicéridos. Destacar, sin embargo que, según nuestro estudio el incremento del daño oxidativo a proteínas en niños obesos continuó siendo evidente cuando se determinaron los niveles de AOPPs en plasma delipidado. Esta aproximación podría llevar a una mejor estimación de los niveles de AOPPs evitando el efecto de confusión de los triglicéridos endógenos. También podría resultar de ayuda en el análisis de los factores reales que determinan el aumento en los AOPPs en la obesidad infantil y su relación con el riesgo metabólico.

La obesidad en niños se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo que favorece el desarrollo de la comorbilidades (216). Estudios previos han demostrado que el grado de obesidad en la infancia está estrechamente ligado a la morbilidad cardiovascular en el adulto (217). Los eventos cardiovasculares adversos son más probables cuando están presentes varios factores de riesgo. En este sentido, es importante destacar el riesgo metabólico en nuestro grupo de estudio. En primer lugar, hay que resaltar la severidad de la obesidad con un z-score BMI promedio de $4,1 \pm 1,3$. Cerca del 80% de los pacientes obesos presentaban un z-score BMI >3 y todos ellos presentaban obesidad abdominal (circunferencia cintura (WC) $>p90$ con una relación WC/altura $>0,5$). Además, factores de riesgo metabólico (MRFs) tales como hipertensión, niveles bajos de c-HDL, resistencia a la insulina, elevación de marcadores de inflamación (proteína C-reactiva de alta sensibilidad) y de los niveles de homocisteína también estaban presentes en nuestro grupo de niños obesos.

La idea de que la evaluación del estatus oxidativo puede ayudar a establecer el riesgo de complicaciones metabólicas y cardiovasculares en los pacientes ha despertado un considerable interés por el estudio del daño oxidativo y sus indicadores (214). Sin embargo, la mayor parte de los estudios se han centrado en la oxidación lipídica, permaneciendo relativamente inexplorado el impacto de la oxidación protéica. La oxidación de proteínas a nivel vascular lleva a la disfunción y alteración de la estructura endotelial. Los AOPPs circulantes son proteínas plasmáticas oxidadas (especialmente albúmina) generadas por la actividad mieloperoxidasa y que se forman principalmente por oxidantes clorinados (169). Están considerados como excelentes marcadores de daño nitrooxidativo avanzado (218). Niveles elevados de AOPPs se han descrito como un factor de riesgo independiente para enfermedad arterial coronaria, que resulta probablemente de la localización de AOPPs en la matriz extracelular de las placas ateroscleróticas en humanos (219).

De acuerdo con datos previos (220,221), nosotros hemos constatado un aumento de todos los biomarcadores de oxidación lipídica y proteica incluidos en nuestro estudio. Además, la reducción observada en los niveles de grupos –SH proteicos sugiere un exceso en la generación de radicales libres que pueden llevar a una alteración en la conformación de la albúmina por la oxidación de sus grupos –SH. Esta condición es denominada “estrés de tioles” (222). El descenso en los niveles de grupos –SH y el aumento en los niveles de AOPPs y de marcadores de peroxidación lipídica reflejan el desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la defensa antioxidante que puede jugar un papel clave en la patogénesis de las comorbilidades. Por otra parte, la observación de un aumento en los niveles de mAOPPs en nuestro estudio sugiere que las proteínas pueden ser una diana oxidativa importante de acumulación de factores de riesgo metabólico en la obesidad infantil severa.

Los estudios clínicos relacionados con el problema de la oxidación proteica en la obesidad infantil son limitados y han generado resultados dispares. Así, Atabek et al (223) observaron niveles de AOPPs significativamente más elevados en niños obesos que en niños control, y niveles más altos de AOPPs en sujetos con resistencia a la insulina que en sujetos sin resistencia a insulina, sin diferencias significativas entre estos grupos. Krzystek-Korpacka et al (220) también han referido niveles más altos de AOPPs en adolescentes con síndrome metabólico, si bien los factores de riesgo como los niveles de c-HDL, hipertensión y resistencia a insulina no influenciaron los niveles de AOPPs cuando se analizaron por separado. Por el contrario, nuestros datos indican que los niños obesos con valores bajos de c-HDL y resistencia a insulina presentan valores más elevados de mAOPPs. Es posible que la diferencia de edad de los niños incluidos en nuestro estudio (prepuberal) pueda explicar estas discrepancias pues la pubertad aumenta los valores de insulina y disminuye los niveles de lípidos (224). La hiperlipidemia podría aumentar el proceso de generación de AOPPs in vivo a través del aumento del estrés oxidativo. A su vez, los AOPPs podrían actuar como mediadores proinflamatorios (225). Por otra parte, se ha demostrado que los AOPPs interfieren con el aclaramiento plasmático del c-HDL, el cual podría antagonizar el receptor scavenger de clase B tipo I (SR-BI) y elevar directamente el riesgo cardiovascular (226). Esto indica un papel potencial de los AOPPs en el desarrollo a largo plazo de las complicaciones y apoya la utilidad de su determinación en la evaluación del riesgo en los niños obesos.

Es también importante mencionar que los AOPPs fueron determinados por el ensayo clásico sin delipidación (169) en los estudios llevados a cabo en niños (220,223,227), y los

niveles de AOPPs podrían estar artificialmente sobreestimados debido al contenido en triglicéridos (171). De hecho, cuando se realizó el análisis de AOPPs usando los valores obtenidos en el plasma no delipidado (datos no incluidos), también se observó correlación con la resistencia a insulina en nuestro estudio. Por lo tanto, sería necesaria la eliminación de los lípidos de las muestras para interpretar de forma más precisa los resultados. Recientemente, la relación AOPPs/triglicéridos se ha propuesto como una alternativa a la modificación del ensayo (171). Sin embargo, nosotros no hemos observado una correlación significativa entre los mAOPPs y la relación propuesta, lo que sugiere que esta relación no sirve para estimar las concentraciones de mAOPPs.

La principal novedad de nuestro estudio fue el hallazgo de que los AOPPs medidos mediante el ensayo modificado (mAOPPs) estaban elevados en niños obesos, principalmente en individuos que presentaban factores de riesgo metabólico. De hecho, las concentraciones de mAOPPs en niños obesos estaban todavía más elevados en niños con un perfil lipídico aterogénico y resistencia a insulina, lo que confirmaría los resultados de estudios previos en adultos mostrando a los AOPPs como un predictor independiente de los factores de riesgo del síndrome metabólico (227). Sin embargo, no se encontró correlación entre mAOPPs y las medidas antropométricas indicativas de obesidad general y abdominal. Esos resultados contrastan con los de otros autores que encontraron una correlación significativa con esas variables (220). Las diferencias podrían explicarse por el hecho de que nosotros sólo estudiamos niños con obesidad severa y que tenían un estrecho rango de valores de circunferencia de cintura.

Los biomarcadores de peroxidación lipídica estaban también elevados en niños con obesidad severa. Sin embargo, de acuerdo con otros estudios (218), nosotros no hemos observado que las concentraciones de mAOPPs se correlacionen con los marcadores de peroxidación lipídica. De hecho, varios mecanismos pueden ser responsables de la oxidación de diferentes clases de macromoléculas.

Considerando globalmente nuestros resultados sobre el estrés oxidativo, sugerimos que debería realizarse un esfuerzo por parte de los profesionales médicos por evaluar esta condición en los niños obesos y centrarse en su mitigación precoz para prevenir el desarrollo de comorbilidades. La determinación de los niveles plasmáticos de mAOPPs es un procedimiento técnicamente sencillo para evaluar la oxidación proteica y proporcionar

información relacionada al riesgo metabólico y la efectividad del tratamiento (220). Estas características podrían dar utilidad a esta técnica como marcador en la práctica clínica.

En relación a los resultados obtenidos sobre los parámetros relacionados con el metabolismo de la vitamina D, hemos de indicar que estudios recientes han revelado una alta prevalencia de insuficiencia de vitamina D en niños y adolescentes en diferentes partes del mundo (228,229), y varios estudios han demostrado su relación con un exceso de peso corporal (230,231). Sin embargo, los datos sobre el estatus de vitamina D y los factores de riesgo cardiometabólico tanto en niños normales como obesos son aún controvertidos (232,233). En relación a los niveles de vitamina D, el hallazgo más novedoso y significativo de nuestro estudio ha sido la detección de niveles de 25(OH)D insuficientes en los niños con obesidad severa y con niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación y activación endotelial, asociados todos ellos con la patogénesis de comorbilidades.

Reseñar que, en nuestra población de estudio, se ha observado una suficiencia global de 25(OH)D, que puede reflejar factores ambientales. La exposición de la piel a la luz solar, la fuente predominante de vitamina D a través de la radiación ultravioleta B, es considerable en nuestra región, incluso teniendo en cuenta las medidas de protección. Por lo tanto, nuestros resultados pueden no ser extrapolables a niños residentes en otros países, diferentes climas o en regiones con diferentes niveles de contaminación del aire.

Los valores más bajos de 25(OH)D se encontraron en niños con obesidad extrema (SDS-BMI>4), lo que sugiere que el estado de obesidad está asociado con una menor disponibilidad de 25(OH)D como consecuencia, probablemente, de su secuestro en el exceso de tejido graso ya que se trata de una vitamina liposoluble. Los niveles séricos de 25(OH)D en niños parecen estar relacionados con la cantidad de grasa visceral, la que tiene una mayor actividad metabólica y que está asociada con el desarrollo de comorbilidades (233). En nuestro estudio, los niveles de c-HDL y apoproteína A1 estaban disminuidos en niños con niveles de 25(OH)D < 20 ng/mL, indicando un patrón desfavorable de los lípidos circulantes que incrementa el riesgo metabólico. En este sentido, existen numerosas evidencias de que los niveles de 25(OH)D pueden influenciar el desarrollo y progresión de la aterosclerosis (234); sin embargo, la mayor parte de los estudios existentes se centran en adultos con lesiones avanzadas. En nuestro estudio, los niños con valores insuficientes de 25(OH)D muestran un

aumento significativo tanto de los niveles plasmáticos de malondialdehído (un marcador final de lipoperoxidación) como de la actividad mieloperoxidasa (el principal constituyente de los macrófagos de la pared arterial). Ambos se han asociado con la iniciación y propagación de especies reactivas que representan dianas atractivas para las células inflamatorias. Además, la mieloperoxidasa está implicada en la generación de HDL disfuncional (235), principalmente promoviendo el enriquecimiento en 3-nitrotirosina y 3-clorotirosina de la apoproteína A1. En este sentido, nosotros hemos observado una correlación significativa entre los valores de 25(OH)D y los niveles de 3-nitrotirosina. Estos residuos de tirosina modificados son un producto de la nitración de proteínas, y un marcador estable y fiable de estrés nitrosativo relacionado con las reacciones inflamatorias que ocurren durante la aterosclerosis (236). Finalmente, los niveles insuficientes de 25(OH)D se observaron en niños con altos niveles de la citoquina proinflamatoria IL-6. Estos resultados novedosos sugieren una conexión entre la insuficiencia de 25(OH)D y factores potencialmente patogénicos implicados en la iniciación y desarrollo del daño aterogénico y otras comorbilidades asociadas en la obesidad.

Destacar también que, según nuestro estudio, los niveles de sVCAM-1 se encuentran notablemente incrementados en niños obesos con insuficiencia de 25(OH)D. Esta molécula de adhesión soluble es un marcador específico de disfunción endotelial asociado con los estadios en marcha de la aterosclerosis; un estudio llevado a cabo en pacientes ancianos mostró altos niveles de sVCAM-1 asociados con estenosis aórtica calcificada (237). A pesar de la gran variedad de factores de riesgo asociados con la calcificación vascular, las anomalías en el metabolismo mineral como elevaciones en los niveles de fósforo sérico (238), producto calcio-fósforo, e iPTH (239), juegan indudablemente un papel importante. Por tanto, el factor principal que afecta al riesgo aterosclerótico puede no ser el bajo estatus de vitamina D sino un desequilibrio en la homeostasis calcio-fósforo.

Según los resultados de nuestro estudio, los niveles séricos de fósforo y del producto calcio-fósforo también fueron más elevados en los niños obesos. La mayor ingesta de fósforo en los niños obesos puede provenir de hábitos nutricionales, tales como consumo de refrescos de cola que usan el fósforo como preservante, que pueden ser subestimados en el registro de la dieta diaria. A nivel fisiológico, la excreción de fósforo es altamente dependiente de la función renal, por lo que otra posibilidad alternativa para explicar el aumento indicado en los niveles séricos de fósforo sería la existencia de un daño renal incipiente en los niños obesos incluidos en nuestro estudio, a diferencia de otros trabajos con población infantil (240).

Los niveles elevados de iPTH en los niños obesos de nuestro estudio podrían deberse a una respuesta fisiológica frente a la disminución en los niveles de 25(OH)D. De hecho, la acción de la PTH puede promover recambio y pérdida ósea. La relación entre desmineralización ósea y calcificación vascular con el aumento en la mortalidad cardiovascular se ha establecido principalmente en pacientes con enfermedad renal crónica (241). De hecho, se ha demostrado una asociación entre los factores de riesgo metabólico y la disminución de la masa ósea en adolescentes obesos (242). En este sentido, nuestros hallazgos sugieren que el estrés oxidativo y la inflamación pueden proporcionar un nexo de unión entre la obesidad, el metabolismo óseo y el riesgo cardiovascular.

Reseñar, finalmente, las limitaciones y potencialidades de nuestro estudio sobre el metabolismo de la vitamina D. La asociación no implica causalidad, y nuestra muestra es pequeña. Sin embargo, la población es muy homogénea y los sesgos se evitaron ajustando por edad, sexo y estadio Tanner. Por otro lado, nuestros hallazgos podrían tener importantes implicaciones clínicas y terapéuticas. Nuevos biomarcadores como la 25(OH)D sérica podrían ser incorporados en la evaluación de la obesidad infantil, y proponerse la suplementación para mejorar su salud cardiovascular. Además, se está considerando de forma creciente el by-pass intestinal para tratar la obesidad mórbida en adolescentes (243). Esta situación podría disminuir la absorción intestinal de calcio y vitamina D y, según nuestros resultados, empeorar la disfunción endotelial y acelerar la progresión de la lesión aterosclerótica y otras comorbilidades. Así pues, sería recomendable la saturación de vitamina D antes de la intervención bariátrica.

En relación al análisis de los niveles de resistina llevado a cabo en nuestro estudio, el principal hallazgo ha sido que la resistina puede ser considerada como un marcador candidato de riesgo cardiovascular debido a su asociación significativa en niños obesos con los niveles de homocisteína, moléculas de activación endotelial y metabolitos del óxido nítrico.

El creciente interés en la resistina es debido a su posible asociación con la resistencia a la insulina. A pesar de que la relación entre resistina, obesidad y resistencia insulínica parece ser fuerte en ratones, la relevancia fisiológica exacta de la resistina en humanos sigue siendo objeto de controversia (244). En adultos, se ha observado que la resistina se asocia positivamente con la hipertensión (245) y los niveles de triglicéridos, mientras que su asociación es negativa con los niveles de c-HDL (246). Entre los estudios realizados en niños y

adolescentes, varios estudios recientes no han podido detectar un aumento de los niveles séricos de resistina en sujetos obesos, con resistencia a insulina, o en sujetos con otros componentes del síndrome metabólico (247). Nuestros hallazgos confirman que la resistina está asociada con la adiposidad visceral, como se ha visto en otros estudios (248). Sin embargo, contrariamente a los resultados de otros autores (249), nosotros hemos observado una relación con la resistencia a la insulina. La diferencia de resultados podría ser debida a los valores de HOMA-IR en los niños de nuestro estudio que fueron más elevados que los descritos en otros estudios. Además, no hemos observado en nuestro estudio asociación entre niveles de resistina y otros factores de riesgo metabólico, como la dislipemia o el aumento de la presión arterial. Es posible que la relación entre la resistina y los lípidos o la hipertensión se haga evidente en edades más avanzadas, cuando esas entidades son relativamente más prevalentes. Es de destacar que la asociación de la resistina con la obesidad central y la resistencia insulínica se perdió tras ajustar por otros parámetros que influyen en el riesgo cardiovascular, como la homocisteína o los indicadores de disfunción endotelial, lo que sugiere que la resistina ejerce principalmente el control sobre los parámetros que están directamente vinculados al desarrollo de la aterosclerosis.

Está establecido que el proceso de aterosclerosis comienza en edades tempranas, pero los mecanismos patofisiológicos exactos que subyacen a la asociación entre la obesidad y la aterosclerosis temprana no son totalmente conocidos. Estudios previos han demostrado que, afectando directamente la homeostasis vascular, la homocisteína, un aminoácido azufrado formado durante el metabolismo de la metionina, podría representar una base mecánica importante de enfermedad cardiovascular en pacientes con síndrome metabólico (250). Diversos estudios experimentales han permitido establecer que los niveles de homocisteína contribuyen a inducir la expresión de resistina en tejido adiposo de ratón a través de un mecanismo que implica la generación de especies reactivas (251). Además, la homocisteína promueve la migración de las células del músculo liso vascular, un paso clave para la formación de la neointima en la aterosclerosis, a través del efecto de la resistina (252).

La fuerza de la asociación entre los niveles elevados de homocisteína y la enfermedad cardiovascular, se ha observado que es diferente entre adultos y niños. La mayoría de los estudios epidemiológicos en adultos apoyan la relación entre homocisteína y aterotrombosis, y los sujetos con niveles de homocisteína elevados presentan un aumento en el riesgo de morbilidad cardiovascular que es normalmente dependiente de concentración. Los datos

disponibles en poblaciones infantiles son muy escasos (253). Sólo una ligera elevación de homocisteína, menor que el umbral establecido como riesgo en adultos, se encontró en los niños obesos del presente estudio. Dada la relación entre resistina y homocisteína, examinamos la asociación entre ambos parámetros. Encontramos que hay una correlación significativa entre la resistina y la homocisteína tanto en jóvenes obesos como en no obesos. Además, la homocisteína contribuye a los niveles de resistina como un importante factor independiente en el análisis multivariante.

La expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y sICAM-1 en la superficie de las células endoteliales es un paso inicial en el proceso de aterogénesis. La resistina activa las células endoteliales (mediante la regulación al alza de moléculas de adhesión, la inducción de la interacción leucocito-endotelio, y la proliferación de las células lisas vasculares) y puede promover la iniciación o perpetuación del estado aterosclerótico (76,77,252,254). La asociación de la resistina con un biomarcador de la función endotelial (sVCAM-1) en jóvenes obesos observada en nuestro estudio implica que la resistina podría estar directa o indirectamente relacionada con la enfermedad cardiovascular futura y podría considerarse como un marcador de aterosclerosis preclínica.

El óxido nítrico, una potente molécula vasodilatadora, es clave en la función endotelial. La biodisponibilidad reducida de óxido nítrico está implicada en las propiedades aterogénicas ya que promueve la vasoconstricción y aumenta el reclutamiento de leucocitos al endotelio (255). Por tanto, la disminución de óxido nítrico es un evento temprano implicado en la patogénesis del daño vascular. Como ya se ha reseñado, el óxido nítrico es rápidamente oxidado a nitrito y/o nitrato por el oxígeno en los sistemas biológicos y, por consiguiente, las concentraciones de los productos finales nitrato y nitrito (nitrato/nitrito) se usan rutinariamente como un índice de la síntesis de óxido nítrico. El nitrato excretado indica la producción sistémica de óxido nítrico. Se ha demostrado que la resistina afecta la biodisponibilidad de óxido nítrico dañando el sistema de la óxido nítrico sintasa endotelial en células endoteliales de arteria coronaria humana (78). Por otra parte, el estrés oxidativo tiene un papel predominantemente aditivo de secuestro de óxido nítrico y producción de peroxinitrito. El estrés oxidativo está implicado también en la ruta de señalización de inducción de la resistina. Nosotros hemos observado una asociación negativa entre la resistina y los niveles de nitrato urinarios, que implica una disminución en la biodisponibilidad sistémica de NO ligada a valores de resistina mayores. Esta correlación inversa observada entre los niveles

de resistina y la producción de óxido nítrico podría ser también relevante en la proliferación de las células musculares lisas vasculares, otro evento bien reconocido en el inicio y la progresión de la enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, la disminución de la disponibilidad de óxido nítrico podría promover y activar la proliferación de las células del músculo liso vascular en nuestros pacientes. La implicación de la resistina en este escenario representa un punto importante de convergencia.

Otra de las observaciones del presente estudio es la asociación de la resistina con el malondialdehído, un marcador de peroxidación lipídica. En este sentido, existe una conexión entre el estrés oxidativo y nitrosativo y los valores de resistina. El hallazgo de la relación entre los valores de resistina y los parámetros de estrés nitrosativo en niños obesos es interesante. En los últimos años ha surgido una importante y creciente línea de investigación científica sobre la relación del NO con la presión arterial, pero es poco probable que esta relación sea un factor predominante en la cohorte de niños de nuestro estudio, y otros factores implicados podrían estar relacionados. La obesidad produce un estado de inflamación de bajo grado que podría un nexo potencial entre las alteraciones metabólicas y las complicaciones vasculares. Sin embargo, contrariamente a lo observado en estudios previos en adultos (256), la inflamación, evaluada a través de los niveles de hs-CRP, no está asociada con los niveles de resistina en nuestra cohorte. Los niveles de resistina están aumentados en niños con inflamación aguda (257,258), pero los efectos de las moléculas proinflamatorias en los niveles de resistina no son dependientes únicamente de la obesidad (248). La resistina humana está indirectamente regulada por el medio interno inflamatorio de la obesidad. Además, el adipocito no es el principal tipo celular que produce la resistina en humanos, que también es producida por los macrófagos infiltrados. Se ha mimetizado el estado de inflamación subaguda en ausencia de obesidad en un modelo de ratones transgénicos por activación hepatocelular selectiva del factor nuclear-kappa B (259). Por consiguiente, se podría hipotetizar que la resistina induce un estado inflamatorio que está conducido potencialmente por el factor nuclear-kappaB directamente (260), e indirectamente por las citoquinas que se forman después de ella. Este hecho constituye un evento temprano que llevaría a un aumento en los niveles de proteína C-reactiva.

Este estudio presenta varios puntos fuertes, incluyendo los métodos estandarizados de obtención de datos clínicos y de laboratorio, la precisión de las determinaciones, y el uso de recomendaciones dietarias para asegurar la exactitud de las determinaciones de nitrato

urinario. Los datos fueron ajustados por sexo y estadio Tanner, pues se ha demostrado una asociación independiente del género con los niveles de resistina. Además, la pubertad parece jugar un papel en la secreción de resistina, pues los niveles de resistina se correlacionan con el grado físico de madurez y no con medidas antropométricas o edad cronológica (261). Debido a que la relación entre factores de riesgo metabólico y adipocinas se ha sugerido que está mediada por un aumento de la adiposidad (262), los datos del presente estudio se han controlado también por el índice de masa corporal (BMI).

A pesar de ello, deben mencionarse ciertas limitaciones de nuestro estudio. En primer lugar, puesto que el diseño de nuestro estudio es transversal, no podemos extraer ninguna inferencia causal a partir de los datos. De continuar con el análisis longitudinal, se podría evaluar el valor predictivo de la resistina en los eventos cardiovasculares. Son necesarios más datos prospectivos para determinar el valor predictivo de la resistina en la morbilidad cardiovascular en niños. Por otra parte, el tamaño de la muestra fue limitado. Sin embargo, éste es un rasgo común en la investigación pediátrica debido a las características específicas de los pacientes pediátricos. Existen pocos datos disponibles para niños con respecto a las moléculas que desempeñan papeles cruciales en la aterogénesis para ayudar a un diagnóstico precoz. Por ello, el futuro de la investigación clínica y traslacional en niños, con el fin de desentrañar el papel del tejido adiposo en las comorbilidades asociadas, está altamente garantizado.

5. CONCLUSIONES

La determinación comparativa en niños obesos y controles con normopeso de diferentes indicadores relacionados con la síntesis de NO, poliaminas, estrés oxidativo, adipocinas, citoquinas inflamatorias y moléculas de activación endotelial, y el análisis ulterior de sus correlaciones con los parámetros clínicos, antropométricos y de riesgo metabólico nos llevan a extraer las siguientes conclusiones:

1. Nuestra población obesa presenta un cuadro de inflamación y de remodelación endotelial, como muestra el aumento en los niveles tanto de las moléculas de inflamación (hs-CRP, IL-6, TNF- α) como de adhesión y funcionalidad endotelial (sICAM, sVCAM, sE-Selectina) valoradas en nuestro estudio.
2. En nuestro estudio, la población de pacientes con obesidad severa (SDS-BMI \geq 3) alcanzó el 50% de la población obesa. Estos niños con obesidad severa presentan una síntesis incrementada de óxido nítrico y un mayor estrés nitrosativo que se relacionan con los indicadores de obesidad central, estrés oxidativo e inflamación. El aumento de la síntesis de NO en la obesidad infantil podría ser un evento temprano asociado al estrés oxidativo y la inflamación, y jugar un papel relevante en el desarrollo de aterosclerosis en edades tempranas.
3. El incremento en los niveles de nitrotirosina en los niños obesos observado en este estudio sugiere que el estrés nitrosativo es un evento temprano en el mecanismo de la obesidad.
4. Los niños obesos presentan niveles sanguíneos significativamente elevados de putrescina, espermidina y espermina, relacionándose los valores de espermina con los indicadores de estrés oxidativo y nitrosativo y la angiogénesis. La novedad y el interés de estos resultados refuerzan la necesidad de analizar detalladamente el significado fisiopatológico de la elevación de poliaminas en los pacientes obesos, su implicación en las complicaciones asociadas a esta patología, así como su potencial utilidad como herramienta clínica.
5. La elevación en la población pediátrica obesa de diferentes indicadores de oxidación lipídica (MDA y 8-isoprostanos) y proteica (AOPPS), y el descenso de la defensa antioxidante (grupos SH) constatan la condición de estrés oxidativo asociado a obesidad en nuestro estudio.

6. Los productos avanzados de oxidación proteica (AOPPs) pueden constituir un buen biomarcador del daño oxidativo inferido a proteínas por el estrés oxidativo asociado a la obesidad infantil. Su relación con los factores de riesgo metabólico y la simplicidad técnica de su cuantificación abogan por su utilidad en la práctica clínica como predictor independiente del riesgo metabólico en la obesidad infantil.
7. Los niños con obesidad severa presentan niveles insuficientes de vitamina D que se relacionan con los biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación y activación endotelial, eventos todos asociados con la patogénesis de las comorbilidades de la obesidad.
8. Los niveles de resistina en niños obesos muestran un ligero aumento aunque no significativo, pero se asocian de forma significativa e independiente con los valores de homocisteína, moléculas de activación endotelial y metabolitos del óxido nítrico. La asociación de la resistina con estos indicadores nos lleva a proponer su potencial utilidad como predictor del riesgo actual y futuro de enfermedad cardiovascular en los pacientes pediátricos obesos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Rubio M. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Española Obes.* 2007;7–48.
2. Cañete Estrada R, Gil Campos M. Obesidad. *Pediatr Integr.* 2007;10:531–44.
3. Aranceta-Bartrina J, Serra-Majem L, Foz-Sala M, Moreno-Esteban B, Y. Grupo Colaborativo SEEDO*. Prevalence of obesity in Spain. *Med Clin (Barc).* 2005;125(12):460–6.
4. Bailey K., Ferro-Luzzi A. Use of body mass index of adults in assessing individual and community nutritional status. *Bull World Health Organ.* 1995;73(5):673–8.
5. Krebs N, Jacobson M. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Prevention of Pediatric Overweight and Obesity. *Pediatrics.* 1968;112(2):424–30.
6. Gutiérrez-Fisac J, López E, Banegas J, Graciani A, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. *Obes Res.* 2004;12(4):710–5.
7. Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Muñoz M. Perfil nutricional de los ancianos institucionalizados en España. In: Libro blanco de la alimentación del anciano en España, Madrid: Panamericana. 2004.
8. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, Mcdowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA.* 2006;295(13):1549–55.
9. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ.* 2000;320(7244):1240–3.
10. Wang Y. Epidemiology of childhood obesity--methodological aspects and guidelines: what is new? *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004;28(Suppl 3):S21–8.
11. Reilly JJ. Assessment of childhood obesity: national reference data or international approach? *Obes Res.* 2002;10(8):838–40.
12. Freedman DS, Mei Z, Srinivasan SR, Berenson GS, Dietz WH. Cardiovascular risk factors and excess adiposity among overweight children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *J Pediatr.* 2007;150(1):12–7.e2.
13. Keller E, Gausche R, Meigen C, Keller A, Burmeister J, Kiess W. Auxological computer based network for early detection of disorders of growth and weight attainment. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002;15(2):149–56.
14. Lobstein T, Frelut ML. Prevalence of overweight among children in Europe. *Obes Rev.* 2003;4(4):195–200.
15. Wang Y, Lobstein T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes.* 2006;1(1):11–25.
16. Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Peña Quintana L. Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the enKid study (1998-2000). *Med Clin.* 2003;121(19):725–32.

17. Aranceta J, Rodrigo CP, Majem LS, Barba LR, Izquierdo JQ, Vioque J, et al. Grupo colaborativo de Estudio. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. *Med Clin*. 2003;120(16):608–12.
18. Jackson-Leach R, Lobstein T. Estimated burden of paediatric obesity and co-morbidities in Europe. Part 1. The increase in the prevalence of child obesity in Europe is itself increasing. *Int J Pediatr Obes*. 2006;1(1):26–32.
19. Caprio S, Genel M. Confronting the epidemic of childhood obesity. *Pediatrics*. 2005;115(2):494–5.
20. Gurnani M, Birken C, Hamilton J. Childhood Obesity: Causes, Consequences, and Management. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(4):821–40.
21. Shin J-A, Lee J-H, Lim S-Y, Ha H-S, Kwon H-S, Park Y-M, et al. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig*. 2013;4(4):334–43.
22. Kaur J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162.
23. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*. 2015;16(1):1–12.
24. Alberti K, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;17(5):539–53.
25. Balkau B, Charles M. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*. 1999;16(5):442–3.
26. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol. *JAMA*. 2001;285(19):2486–97.
27. Crepaldi G, Maggi S. El síndrome metabólico: Contexto histórico. *Diabetes Voice*. 2006;51:8–10.
28. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome - A new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059–62.
29. Zimmet P, Alberti KGM, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes*. 2007;8(5):299–306.
30. Philips J-C, Scheen A. Insulin detemir in the treatment of type 1 and type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2(3):277–83.
31. García M. Síndrome Metabólico. Programa de formación continuada a distancia, AEFA. 2009. p. 6.
32. Reaven GM. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: Role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart disease. *Am Heart J*. 1991;121(4):1283–8.

33. Laakso M. Is Insulin Resistance a Feature of or a Primary Risk Factor for Cardiovascular Disease? *Curr Diab Rep.* 2015;15(12):105.
34. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
35. Aye T, Levitsky LL. Type 2 diabetes: an epidemic disease in childhood. *Curr Opin Pediatr.* 2003;15(4):411–5.
36. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(3):281–7.
37. Boden G. Obesity and Free Fatty Acids. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):635–46.
38. Grundy SM. Atherogenic Dyslipidemia Associated with Metabolic Syndrome and Insulin Resistance. *Clin Cornerstone.* 2006;8(Suppl 1):S21–7.
39. Errico TL, Chen X, Martin Campos JM, Julve J, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas. *Clin e Investig en Arterioscler.* 2013;25(2):98–103.
40. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13(26):3540–53.
41. Angulo P, Lindor K. Treatment of nonalcoholic fatty liver: present and emerging therapies. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):81–8.
42. Feingold K, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, editors *Endotext: MDText.com, Inc; 2000- 2015 Jun 10.* 2015.
43. Kraemer F. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 2002;43(10):1585–94.
44. Natarajan S, Rasineni K, Ganesan M, Feng D, McVicker B, McNiven M, et al. Structure, function and metabolism of hepatic and adipose tissue lipid droplets: implications in alcoholic liver disease. *Curr Mol Pharmacol.* 2015; Epub ahead.
45. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2015;6(3):456.
46. Jeppesen J, Hollenbeck C, Zhou M, Coulston A, Jones C, Ida Chen Y, et al. Relation Between Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, Postheparin Plasma Lipoprotein Lipase Activity, and Postprandial Lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:320–4.
47. Klop B, Elte J, Cabezas M. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients.* 2013;5(4):1218–40.

48. Sasahara T, Yamashita T, Sviridov D, Fidge N, Nestel P. Altered properties of high density lipoprotein subfractions in obese subjects. *J Lipid Res.* 1997;38(3):600–11.
49. Giannini C, de Giorgis T, Scarinci A, Ciampani M, Marcovecchio ML, Chiarelli F, et al. Obese related effects of inflammatory markers and insulin resistance on increased carotid intima media thickness in pre-pubertal children. *Atherosclerosis.* 2008;197(1):448–56.
50. Herouvi D, Karanasios E, Karayianni C, Karavanaki K. Cardiovascular disease in childhood: The role of obesity. *Eur J Pediatr.* 2013;172(6):721–32.
51. Franssen R, Monajemi H, Stroes ESG, Kastelein JJP. Obesity and Dyslipidemia. *Med Clin North Am.* 2008;37(3):623–33.
52. Krauss R, Winston M, Fletcher B, Grundy S. Obesity: Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation.* 1998;98(14):1472–6.
53. López De Fez CM, Gaztelu M, Rubio T, Castaño A. Mecanismos de hipertensión en obesidad. *An Sist Sanit Navar.* 2004;27(2):211–9.
54. Rao A, Pandya V, Whaley-Connell A. Obesity and Insulin Resistance in Resistant Hypertension: Implications for the Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2015;22(3):211–7.
55. Lurbe E, Alvarez V, Liao Y, Tacons J, Cooper R, Cremades B, et al. The Impact of Obesity and Body Fat Distribution on Ambulatory Blood Pressure in Children and Adolescents. *Am J Hypertens.* 1998;11(4):418–24.
56. Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res. Nature Publishing Group;* 2010;33(5):386–93.
57. Duncan B, Schmidt M, Pankow J, Ballantyne C, Couper D, Vigo A, et al. Low-Grade Systemic Inflammation and the Development of Type 2 Diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes.* 2003;52(7):1799–805.
58. Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(4):332–41.
59. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 SUPPL. 1):64–73.
60. Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* 2014;220(2):T47–59.
61. Rosen E, Spiegelman B. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444(7121):847–53.
62. Friedman J, Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395(6704):763–70.

63. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest.* 1996;98(6):1277–82.
64. Considine R V, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas a, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334(5):292–5.
65. Kouidhi S, Jarbouli S, Clerget Froidevaux M, Abid H, Demeneix B, Zaouche A, et al. Relationship between subcutaneous adipose tissue expression of leptin and obesity in Tunisian patients. *Tunis Med.* 2010;88(8):569–72.
66. Pandey G, Shihabudeen MS, David HP, Thirumurugan E, Thirumurugan K. Association between hyperleptinemia and oxidative stress in obese diabetic subjects. *J Diabetes Metab Disord.* 2015;14(1):1–6.
67. González Rodríguez D, Solano RL, González Martínez J. Adiponectin, insulin and glucose concentrations in overweight and obese subjects after a complex carbohydrates (fiber) diet. *Arch Latinoam Nutr.* 2009;59(3):296–303.
68. Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–14.
69. Rojas E, Rodríguez-Molina D, Bolli P, Israili Z, Faría J, Fidilio E, et al. The role of adiponectin in endothelial dysfunction and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16(8):463.
70. Fuentes E, Fuentes F, Vilahur G, Badimon L, Palomo I. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2013;2013.
71. Wang X, Pu H, Ma C, Jiang T, Wei Q, Duan M, et al. Adiponectin Abates Atherosclerosis by Reducing Oxidative Stress. *Med Sci Monit.* 2014;20:1792–800.
72. Matsuda M, Shimomura I. Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(1):1–10.
73. Thomas S, Suresh S, Sudheesh M, Vijayakumar T. Association of insulin resistance with adipocytokine levels in patients with metabolic syndrome. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(2):155–60.
74. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule- β selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest.* 2003;111(2):225–30.
75. Fagnoli JL, Sun Q, Olenczuk D, Qi L, Zhu Y, Hu FB, et al. Resistin is associated with biomarkers of inflammation while total and HMW adiponectin are associated with biomarkers of inflammation, insulin resistance, and endothelial function. *Diabetes.* 2006;55(2):281–8.
76. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PWM, Li RK, Weisel RD, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: Further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation.* 2003;108(6):736–40.
77. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: A new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(2):415–9.

78. Chen C, Jiang J, Lü J-M, Chai H, Wang X, Lin PH, et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(1):H193–201.
79. Recasens M, Ricart W, Fernández-Real J. Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ Navarra*. 2004;48(2):49–54.
80. Saavedra Ramírez PG, Vásquez Duque GM, González Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *latreia*. 2011;24(2):157–66.
81. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac’h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Jt Bone Spine*. 2010;77(6):552–7.
82. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases , cancers , and cardiovascular disease 1 – 4. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1678–88.
83. Reid IR, Bolland MJ, Grey A. Effects of vitamin D supplements on bone mineral density: A systematic review and meta-Analysis. *Lancet*. 2014;383(9912):146–55.
84. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, Van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008;29(6):726–76.
85. Parker J, Hashmi O, Dutton D, Mavrodaris A, Stranges S, Kandala NB, et al. Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: Systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2010;65(3):225–36.
86. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:1080S – 6S.
87. Prasad P, Kochhar A. Interplay of Vitamin D and Metabolic Syndrome: a Review. *Diabetes Metab Syndr. Diabetes India*; 2015; Epub ahead of print.
88. Dhingra R, Sullivan L, Fox C, Wang T, D’Agostino RS, Gaziano J, et al. Relations of Serum Phosphorus and Calcium Levels to the Incidence of Cardiovascular Disease in the Community. *Arch Intern Med*. 2007;167(9):879–85.
89. Xiao L, Liu Y, Wang N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(3):H317–25.
90. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057–69.
91. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015;15(1):130.
92. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527–61.
93. Pober J, Sessa W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):803–15.

94. Stern D, Esposito C, Gerlach H, Ryan J, Handley D, Nawroth P. Endothelium and regulation of coagulation. *Diabetes Care*. 1991;14(2):160–6.
95. Thomas M, Storey R. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*. 2015;114(3):449–58.
96. Mitchell J a, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*. 2008;93(1):141–7.
97. Kostapanos M, Florentin M, Elisaf M, Mikhailidis D. Hemostatic factors and the metabolic syndrome. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11(6):880–905.
98. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 1999;77(7):527–43.
99. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1999 ;34(3):631–8.
100. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter D, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher A. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102(9):1000–6.
101. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct Proinflammatory Effect of C-Reactive Protein on Human Endothelial Cells. *Circulation*. 2000;102(18):2165–8.
102. Spinelli F, Di Franco M, Metere A, Conti F, Iannuccelli C, Agati L, et al. Decrease of asymmetric dimethyl arginine after anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Drug Dev Res*. 2014;75(Suppl 1):S67–9.
103. Luiking Y, Ten Have G, Wolfe R, Deutz N. Arginine de novo and Nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303:E1177–89.
104. Closs EI, Simon A, Vékony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr*. 2004;134(10 Suppl):2752S – 2759S; discussion 2765S – 2767S.
105. Baydoun AR, Emery PW, Pearson JD, Mann GE. Substrate-dependent regulation of intracellular amino acid concentrations in cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;173(3):940–8.
106. Morris Jr S. Recent advances in arginine metabolism: Roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol*. 2009;157(6):922–30.
107. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998;336:1–17.
108. Morris SM. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr*. 2007;137(6 Suppl 2):1602S – 1609S.
109. Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin as a Target in Obesity-related Inflammatory State. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(2):145–50.

110. Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo G, Cardillo C, et al. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014;28(2):169–76.
111. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2014;73C:383–99.
112. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(5):398–406.
113. Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction: A key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease?. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):1–11.
114. Grover-Páez F, Zavalza-Gómez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;84(1):1–10.
115. Matthys KE, Bult H. Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 1997;6:3–21.
116. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases : structure , function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593–615.
117. Freire MAM, Guimarães JS, Leal WG, Pereira A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front Neurosci*. 2009;3(SEP):175–81.
118. Leiper J, Nandi M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(4):277–91.
119. Pacher P, Beckman J, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2007;87:315–424.
120. Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, Kubota Y, Kobayashi K, Nejime N, et al. Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci*. 2006;78(11):1187–96.
121. Gomes V, Casella-Filho A, Chagas A, Tanus-Santos J. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide*. 2008;19:345–50.
122. Gruber H-J, Mayer C, Mangge H, Fauler G, Grandits N, Wilders-Truschnig M. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(5):826–31.
123. Zahedi Asl S, Ghasemi A, Azizi F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem*. 2008;41(16-17):1342–7.
124. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Nitric oxide and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. *Eur J Epidemiol*. 2010;25(1):45–53.
125. Persson L. Polyamine homeostasis. *Essays Biochem*. 2009;46:11–24.

126. Liu C, Perez-Leal O, Barrero C, Zahedi K, Soleimani M, Porter C, et al. Modulation of polyamine metabolic flux in adipose tissue alters the accumulation of body fat by affecting glucose homeostasis. *Amino Acids*. 2014;46(3):701–15.
127. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(8):716–32.
128. Jell J, Merali S, Hensen M, Mazurchuk R, Spornyak J, Diegelman P, et al. Genetically altered expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase affects fat metabolism in mice via acetyl-CoA. *J Biol Chem*. 2007;282(11):8404–13.
129. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol*. 2015;427(21):3389–406.
130. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: A critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(9):906–11.
131. Soda K. Polyamine intake, dietary pattern, and cardiovascular disease. *Med Hypotheses*. 2010;75(3):299–301.
132. Auwerx J. Improving metabolism by increasing energy expenditure. *Nat Med*. 2006;12:44–5.
133. Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 1995;77(3):147–61.
134. Aldershvile J, Ambrosio G, Bayés de Luna A, Badimon L, Bertrand ME, Cleand J et al. Estrés oxidativo (especies de oxígeno reactivo), patología cardiovascular (Parte I). *Eur Cardiol J*. 1998;3(72).
135. Rybczyńska M. Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postep Hig Med Dows*. 1994;48(4):419–41.
136. Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal K. Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. *Therapie*. 1997;52(4):251–70.
137. Zhang J, Veasey S. Making sense of oxidative stress in obstructive sleep apnea: Mediator or distracter? *Front Neurol*. 2012;3(179):1–8.
138. Free Radical Brochure. Radox Laboratories Ltd.
139. Schieber M, Chandel N. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453–62.
140. Stocker R, Kearney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84(4):1381–478.
141. Tangvarasittichai S, Poonsub P, Tangvarasittichai O, Sirigulsatien V. Serum Levels of Malondialdehyde in Type 2 Diabetes Mellitus Thai Subjects. *Siriraj Med J*. 2009;61(1):20–3.

142. Moreira PI, Sayre LM, Zhu X, Nunomura A, Smith MA, Perry G. Detection and Localization of Markers of Oxidative Stress by In Situ Methods: Application in the Study of Alzheimer Disease. *Free Radicals Antioxid Protoc Methods Mol Biol.* 2010;610:419–34.
143. Rahmanto AS, Morgan PE, Hawkins CL, Davies MJ. Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(8):1071–8.
144. Hunt J V, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J.* 1988;256(1):205–12.
145. Rosenfeld M. Inflammation, lipids, and free radicals: lessons learned from the atherogenic process. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16(4):249–61.
146. Steinberg D. Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis. *Circulation.* 1997;95:1062–71.
147. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(23):9383–7.
148. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. 1997;36(1):1–21.
149. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: Potential Markers of Oxidant Stress in Atherothrombotic Disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2309–15.
150. Gniwotta C, Morrow JD, Roberts LJ, Kühn H. Prostaglandin F₂-Like Compounds, F₂-Isoprostanes, Are Present in Increased Amounts in Human Atherosclerotic Lesions. *Arter Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3236–41.
151. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, et al. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F₂ alfa is increased in hypercholesterolemia. *Arter Thromb Vasc Bio.* 1997;17:3230–5.
152. Reilly MP, Praticò D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, et al. Increased formation of distinct F₂ isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998;98(25):2822–8.
153. Otani H. Oxidative Stress as Pathogenesis of Cardiovascular Risk Associated with Metabolic Syndrome. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(7):1911–26.
154. DeMarco VG, Johnson MS, Whaley-Connell AT, Sowers JR. Cytokine abnormalities in the etiology of the cardiometabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12(2):93–8.
155. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):434–9.
156. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752–61.

157. Imayama I, Ulrich CM, Alfano CM, Wang C, Xiao L, Wener MH, et al. Effects of a caloric restriction weight loss diet and exercise on inflammatory biomarkers in overweight/obese postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Cancer Res.* 2012;72(9):2314–26.
158. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-fukai M. NAD(P)H Oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494–501.
159. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(9):471–8.
160. Aroor AR, DeMarco VG. Oxidative stress and obesity: The chicken or the egg? *Diabetes.* 2014;63(7):2216–8.
161. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, Ferrández Longás A, López-Siguero JP, Sánchez González E, et al. Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte II: valores de talla, peso e índice de masa corporal desde el nacimiento a la talla adulta. *An Pediatría.* 2008;68(6):552–69.
162. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Girls. *Arch Dis Childh.* 1969;44:291–303.
163. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg P, Kappy M. Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics.* 2008;122(2):398–417.
164. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem.* 1995;41(6):892–6.
165. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem.* 1993;214(1):11–6.
166. Teixeira D, Santaolalia ML, Meneu V, Alonso E. Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male swiss albino mice. *J Nutr.* 2002;132(12):3715–20.
167. Santos MT, Valles J, Aznar J, Vilches J. Determination of plasma malondialdehyde-like material and its clinical application in stroke patients. *J Clin Pathol.* 1980;33(10):973–6.
168. Wong SHY, Knight J a., Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.* 1987;33(2):214–20.
169. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen A, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304–13.
170. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464–478
171. Anderstam B, Ann-Christin B-H, Valli A, Stenvinkel P, Lindholm B, Suliman ME. Modification of the oxidative stress biomarker AOPP assay: Application in uremic samples. *Clin Chim Acta.* 2008;393(2):114–8.

172. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70–7.
173. Gergel' D, Cederbaum AI. Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent. *Arch Biochem Biophys.* 1997;347(2):282–8.
174. Beckman J. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 1996;9(5):836–44.
175. Ceriello a., Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: Evidence of oxidative stress. *Diabetologia.* 2001;44(7):834–8.
176. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase : friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77:598–625.
177. Morishita K, Kubota N, Asano S, Kaziro Y, Nagata S. Molecular Cloning and Characterization of cDNA for Human Myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 1987;262(8):3844–51.
178. van Dalen CJ, Winterbourn CC, Senthilmohan R, Kettle AJ. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. Implications for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. *J Biol Chem.* 2000;275(16):11638–44.
179. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103(11):1547–60.
180. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(35):13032–7.
181. Hazen SL, Hsu FF, Duffin K, Heinecke JW. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide- chloride system of phagocytes converts low density lipoprotein cholesterol into a family of chlorinated sterols. *J Biol Chem.* 1996;271(38):23080–8.
182. Tiruppathi C, Naqvi T, Wu Y, Vogel SM, Minshall RD, Malik AB. Albumin mediates the transcytosis of myeloperoxidase by means of caveolae in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(20):7699–704.
183. Astern JM, Pendergraft WF, Falk RJ, Jennette JC, Schmaier AH, Mahdi F, et al. Myeloperoxidase interacts with endothelial cell-surface cytokeratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma Kallikrein-Kinin system. *Am J Pathol.* 2007;171(1):349–60.
184. Eiserich J, Baldus S, Brennan M, Ma W, Zhang C, Tousson A, et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science.* 2002;296(5577):2391–4.
185. Andelid K, Bake B, Rak S, Lindén A, Rosengren A, Ekberg-Jansson A. Myeloperoxidase as a marker of increasing systemic inflammation in smokers without severe airway symptoms. *Respir Med.* 2007;101(5):888–95.
186. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, et al. Myeloperoxidase Serum Levels Predict Risk in Patients With Acute Coronary Syndromes. 2003;1440–5.

187. Wu CC, Chen JS, Wu WM, Liao TN, Chu P, Lin SH, et al. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(April):1134–9.
188. Sun Y-C, Chang P-Y, Tsao K-C, Wu T-L, Sun C-F, Wu LL, et al. Establishment of a sandwich ELISA using commercial antibody for plasma or serum 3-nitrotyrosine (3NT). Elevation in inflammatory diseases and complementary between 3NT and myeloperoxidase. *Clin Chim Acta*. 2007;378(1-2):175–80.
189. Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, Del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V. Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes*. 2010;5(1):56–63.
190. Sanchez A, Levy P, Sekarski T, Arbelaez A, Hildebolt C, Holland M, et al. Markers of cardiovascular risk, insulin resistance, and ventricular dysfunction and remodeling in obese adolescents. *J Pediatr*. 2015;166(3):660–5.
191. Otani H. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1911–26.
192. Ghasemi A, Zahediasl S AF. Nitric oxide and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. *Eur J Epidemiol*. 2010;25(1):45–53.
193. Meneu V. Metabolismo de la arginina en la patología diabética: Estudio en humanos. Universidad de Valencia; 2000.
194. Santaolaria M. Alteraciones en el metabolismo de la arginina en la hipertensión arterial y en la diabetes: estudio en humanos. Universidad de Valencia; 2001.
195. García-Taberner M. Aporte dietario de arginina y patología diabética. Universidad de Valencia; 2001.
196. Lin L, Lee W, Shen H, Yang W, Pai N, Su T, et al. Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients. *Atherosclerosis*. 2007;190(2):436–42.
197. Tsikas D, Gutzki F-M, Stichtenoth DO. Circulating and excretory nitrite and nitrate as indicators of nitric oxide synthesis in humans: methods of analysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;62(S1):51–9.
198. Noronha BT, Li J-M, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes*. 2005;54(April):1082–9.
199. Koeck T, Willard B, Crabb J, Kinter M, Stuehr D, Aulak K. Glucose-mediated tyrosine nitration in adipocytes: targets and consequences. *Free Radic Biol*. 2009;46(7):884–92.
200. Choi JW. Enhanced nitric oxide production is closely associated with serum lipid concentrations in adolescents. *Clin Chim Acta*. 2004;347(1-2):151–6.
201. O’Kane P, Jackson G, Ferro A. Whole body nitric oxide production is not decreased in patients with coronary atherosclerosis but is inversely related to plasma homocysteine. *Atherosclerosis*. 2008;196(2):574–9.

202. Tsujinaka S, Soda K, Kano Y, Konishi F. Spermine accelerates hypoxia-initiated cancer cell migration. *Int J Oncol.* 2011;38(2):305–12.
203. Dumont J, Zureik M, Bauters C, Gruppiso M-C, Cotel D, Montaye M, et al. Association of OAZ1 Gene Polymorphisms With Subclinical and Clinical Vascular Events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(10):2120–6.
204. Rider J, Hacker A, Mackintosh C, Pegg A, Woster P, Casero RJ. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amin Acids.* 2007;33(2):231–40.
205. Ischiropoulos H. Protein tyrosine nitration--an update. *Arch Biochem Biophys.* 2009;484(2):117–21.
206. Hardy LL, Wick D a., Webb JR. Conversion of Tyrosine to the Inflammation-Associated Analog 3'-Nitrotyrosine at Either TCR- or MHC-Contact Positions Can Profoundly Affect Recognition of the MHC Class I-Restricted Epitope of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein 33 by CD8 T Ce. *J Immunol.* 2008;180(9):5956–62.
207. Bjelakovic G, Beninati S, Bjelakovic B, Sokolovic D, Jevtovic T, Stojanovic I, et al. Does polyamine oxidase activity influence the oxidative metabolism of children who suffer of diabetes mellitus? *Mol Cell Biochem.* 2010;341(1-2):79–85.
208. Pirinen E, Kuulasmaa T, Pietilä M, Heikkinen S, Tusa M, Itkonen P, et al. Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. *Mol Cell Biol.* 2007;27(13):4953–67.
209. Vuohelainen S, Pirinen E, Cerrada-Gimenez M, Keinänen T a., Uimari A, Pietilä M, et al. Spermidine is indispensable in differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J Cell Mol Med.* 2009;14(6b):1683–92.
210. Ledoux S, Queguiner I, Msika S, Calderari S, Rufat P, Gasc JM, et al. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes.* 2008;57(12):3247–57.
211. Holm P, Slart R, Zeebregts C, Hillebrands J, Tio R. Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF. *Ann Med.* 2009;41(4):257–64.
212. Schipper R, van den Heuvel L, Verhofstad A, De Abreu R. Polyamines and DNA methylation in childhood leukaemia. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 2):331–5.
213. Laura Anca P, Bogdana V, Olivia T, Horia V, Dumitru O, Leon Z. The Relations Between Immunity, Oxidative Stress and Inflammation Markers, in Childhood Obesity. *Free Radic Biol Med.* 2014;75:S44–5.
214. Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(1):72–7.
215. Valli A, Suliman ME, Meert N, Vanholder R, Lindholm B, Stenvinkel P, et al. Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to presence of triglycerides and other endogenous factors. *Clin Chim Acta.* 2007;379(1-2):87–94.
216. Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood Obesity, Other Cardiovascular Risk Factors, and Premature Death. *N Engl J Med.* 2010;362(6):485–93.

217. Clapp B, Hingorani a, Kharbanda R, Mohamedali V, Stephens J, Vallance P, et al. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res.* 2004;64(1):172–8.
218. Meaney E, Vela A, Samaniego V, Meaney A, Asbún J, Zempoalteca J, et al. Metformin, arterial function, intima-media thickness and nitroxidation in metabolic syndrome: the mefisto study. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(8):895–903.
219. Woods AA, Linton SM, Davies MJ. Detection of HOCl-mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques. *Biochem J.* 2003;370:729–35.
220. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, Berdowska I, Zielinski B, Noczynska A. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem.* 2008;41(12):943–9.
221. Sebeková K, Somoza V, Jarcusková M, Heidland A, Podracká L. Plasma advanced glycation end products are decreased in obese children compared with lean controls. *Int J Pediatr Obes.* 2009;4(2):112–8.
222. Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(2):188–92.
223. Atabek M, Keskin M, Yazici C, Kendirci M, Hatipoglu N, Koklu E, et al. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *Eur J Pediatr.* 2006;165(11):753–6.
224. Goodman E, Daniels S, Meigs J, Dolan L. Instability in the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents. *Circulation.* 2007;115(17):2316–22.
225. Liu SX. Advanced Oxidation Protein Products Accelerate Atherosclerosis Through Promoting Oxidative Stress and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(5):1156–62.
226. Marsche G, Frank S, Hrzjenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, et al. Plasma-Advanced Oxidation Protein Products Are Potent High-Density Lipoprotein Receptor Antagonists In Vivo. *Circ Res.* 2009;104(6):750–7.
227. Sebeková K, Boor P, Valachovicová M, Blazíček P, Parrák V, Babinská K, et al. Association of metabolic syndrome risk factors with selected markers of oxidative status and microinflammation in healthy omnivores and vegetarians. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(9):858–68.
228. Houghton LA, Szymlek-Gay EA, Gray AR, Ferguson EL, Deng X, Heath ALM. Predictors of vitamin D status and its association with parathyroid hormone in young New Zealand children. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:69–76.
229. Hill TR, Cotter AA, Mitchell S, Boreham CA, Dubitzky W, Murray L, et al. Vitamin D status and its determinants in adolescents from the Northern Ireland Young Hearts 2000 cohort. *Br J Nutr.* 2008;99(05):1061–7.
230. Rodríguez-Rodríguez E, Navia-Lombán B, López-Sobaler A, Ortega R. Associations between abdominal fat and body mass index on vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64(5):461–7.

231. Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg FA, Aksnes L, Moan J. Vitamin D status in Norwegian children and adolescents with excess body weight. *Pediatr Diabetes*. 2011;12(2):120–6.
232. Sackeck J, Goodman E, Chui K, Chomitz V, Must A, Economos C. Vitamin D Deficiency, Adiposity, and Cardiometabolic Risk in Urban Schoolchildren. *J Pediatr*. 2011;159(6):945–50.
233. Reis JP, von Muhlen D, Miller ER, Michos ED, Appel LJ. Vitamin D Status and Cardiometabolic Risk Factors in the United States Adolescent Population. *Pediatrics*. 2009;124(3):e371–9.
234. Reis JP, von Mühlen D, Michos ED, Miller ER, Appel LJ, Araneta MR, et al. Serum vitamin D, parathyroid hormone levels, and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;207(2):585–90.
235. Heinecke J. The role of myeloperoxidase in HDL oxidation and atherogenesis. *Curr Atheroscler Rep*. 2007;9(4):249–51.
236. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Megías-Vericat J, Tortajada-Girbés M, Alonso-Iglesias E. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):475–80.
237. Linhartova K, Sterbakova G, Racek J, Cerbak R, Porazikova K, Rokyta R. Linking soluble vascular adhesion molecule-1 level to calcific aortic stenosis in patients with coronary artery. *Exp Clin Cardiol*. 2009;14(3):14–7.
238. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA. Serum Phosphorus Levels Associate with Coronary Atherosclerosis in Young Adults. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(2):397–404.
239. Gilardini L, Pasqualinotto L, Di Matteo S, Caffetto K, Croci M, Girola A, et al. Factors Associated With Early Atherosclerosis and Arterial Calcifications in Young Subjects With a Benign Phenotype of Obesity. *Obesity*. 2011;19(8):1684–9.
240. Celik N, Andiran N. The relationship between serum phosphate levels with childhood obesity and insulin resistance. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2011;24(1-2):81–3.
241. Lilien M, Groothoff J. Cardiovascular disease in children with CKD or ESRD. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(4):229–35.
242. Pollock N, Bernard P, Gutin B, Davis C, Zhu H, Dong Y. Adolescent obesity, bone mass and cardiometabolic risk factors. *J Pediatr*. 2011;158(5):727–34.
243. Lenders CM, Wright JA, Apovian CM, Hess DT, Shukla RR, Adams WG, et al. Weight Loss Surgery Eligibility According to Various BMI Criteria Among Adolescents. *Obesity*. 2009;17(1):150–5.
244. de Luis DA, Gonzalez Sagrado M, Conde R, Aller R, Izaola O, Primo D. Lack of association of serum resistin levels with metabolic syndrome criteria in obese female patients. *Clin Biochem*. 2011;44(16):1280–3.
245. Fang C, Lei J, Zhou S, Zhang Y, Yuan G, Wang J. Association of higher resistin levels with inflammatory activation and endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(4):646–9.

246. Norata G, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano A. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2007;156(2):279–84.
247. Boyraz M, Cekmez F, Karaoğlu A, Cinaz P, Durak M, Bideci A. Relationship of adipokines (adiponectin, resistin and RBP4) with metabolic syndrome components in pubertal obese children. *Biomark Med.* 2013;7(3):423–8.
248. Li M, Fiset A, Zhao X-Y, Deng J-Y, Mi J, Cianflone K. Serum resistin correlates with central obesity but weakly with insulin resistance in Chinese children and adolescents. *Int J Obes.* 2009;33(4):424–39.
249. Nehus E, Furth S, Warady B, Mitsnefes M. Correlates of resistin in children with chronic kidney disease: the chronic kidney disease in children cohort. *J Pediatr.* 2012;161(2):276–80.
250. Refsum H, Nurk E, Smith A, Ueland P, Gjesdal C, Bjelland I, et al. The Hordaland Homocysteine Study : A Community-Based Study of Homocysteine , Its Determinants , and Associations with Disease. *J Nutr.* 2006;136(6 Suppl):1731s – 1740s.
251. Li Y, Jiang C, Xu G, Wang N, Zhu Y, Tang C, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro. *Diabetes.* 2008;57(April):817–27.
252. Jiang C, Zhang H, Zhang W, Kong W, Zhu Y, Zhang H, et al. Homocysteine promotes vascular smooth muscle cell migration by induction of the adipokine resistin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(6):C1466–76.
253. da Silva NP, de Souza FIS, Pendeza AI, Fonseca FLA, Hix S, Oliveira AC, et al. Homocysteine and cysteine levels in prepubertal children: association with waist circumference and lipid profile. *Nutrition.* 2013;29(1):166–71.
254. Hsu W, Chao Y, Tsai Y, Lien C, Chang C, Deng M, et al. Resistin induces monocyte-endothelial cell adhesion by increasing ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via p38MAPK-dependent pathway. *J Cell Physiol.* 2011;226(8):2181–8.
255. Cho Y, Lee S-E, Lee H-C, Hur J, Lee S, Youn S-W, et al. Adipokine resistin is a key player to modulate monocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells, leading to progression of atherosclerosis in rabbit carotid artery. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(1):99–109.
256. Fagnoli JL, Sun Q, Olenczuk D, Qi L, Zhu Y, Hu FB, et al. Resistin is associated with biomarkers of inflammation while total and high-molecular weight adiponectin are associated with biomarkers of inflammation, insulin resistance, and endothelial function. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(2):281–8.
257. Liu R, He B, Gao F, Liu Q, Yi Q. Relationship between adipokines and coronary artery aneurysm in children with Kawasaki disease. *Transl Res.* 2012;160(2):131–6.
258. Gheita T, El-Gazzar I, El Shazly R, El-Din A, Abdel-Rasheed E, Bassyouni To R. Elevated serum resistin in juvenile idiopathic arthritis: relation to categories and disease activity. *J Clin Immunol.* 2013;33(1):297–301.
259. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005;11(2):183–90.

260. Zhang J, Lei T, Chen X, Peng Y, Long H, Zhou L, et al. Resistin up-regulates COX-2 expression via TAK1-IKK-NF-kappaB signaling pathway. *Inflammation*. 2010;33(1):25–33.
261. Maggio ABR, Wacker J, Montecucco F, Galan K, Pelli G, Mach F, et al. Serum resistin and inflammatory and endothelial activation markers in obese adolescents. *J Pediatr*. 2012;161(6):1022–7.
262. Rubin DA, McMurray RG, Hackney AC, Harrell JS. Relationship between cardiovascular risk factors and adipokines in adolescents. *Horm Res pædiatrics*. 2011;76(2):123–9.

***10. ANEXO: Publicaciones
derivadas del presente
estudio***

Polyamines Are Increased in Obese Children and Are Related to Markers of Oxidative/Nitrosative Stress and Angiogenesis

Pilar Codoñer-Franch, Sandra Tavárez-Alonso, Rosa Murria-Estal, Guadalupe Herrera-Martín, and Eulalia Alonso-Iglesias

Department of Pediatrics (P.C.-F.) and Clinical Biochemistry Laboratory (R.M.-E.), Dr. Peset University Hospital, 46017 Valencia, Spain; Departments of Pediatrics, Obstetrics, and Gynecology (P.C.-F.) and Biochemistry and Molecular Biology (S.T.-A., E.A.-I.), University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; and Laboratory of Cytomics (G.H.-M.), Mix Unit Center of Investigation Principe Felipe-University of Valencia Estudi General, Center of Investigation Principe Felipe, 46012 Valencia, Spain

Context: Polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) are polycationic amines derived from arginine, which is the precursor of nitric oxide (NO). Due to the close relationship between the metabolism of polyamines and NO metabolism, the alteration in polyamine homeostasis can affect the NO bioavailability at the endothelium.

Objectives: The objective of the study was to test the hypothesis that childhood obesity is associated with a significant modification of blood polyamines and to investigate the presence of correlation between these molecules, circulating markers of oxidative and nitrosative stress, and endothelial dysfunction.

Design and Setting: This was an observational analytical case-control study conducted at one tertiary care center.

Patients and Methods: The study was performed with 102 children aged 7–14 yr (60 obese, 42 non-obese). Blood polyamines were measured by HPLC. Metabolites of the NO pathway, oxidative stress parameters, inflammatory markers, adhesion molecules, and adipocytokines were also determined.

Results: Polyamine levels were significantly higher in obese children. Among them, spermine was the polyamine with the more discriminatory power, taking into account the obesity. In all children, spermine levels were related to biomarkers of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and leptin and to adhesion molecules, soluble E-selectin, and soluble intercellular adhesion molecule-1. Only in obese children was there a positive correlation with vascular endothelial growth factor and a negative correlation with 3'-nitrotyrosine levels.

Conclusions: Polyamine levels are increased in childhood obesity and correlated to markers of oxidative/nitrosative stress and angiogenesis. This finding implicates polyamine metabolism in the complications of obesity. Their potential utility as a clinical tool remains to be elucidated. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: 2821–2825, 2011)

Vascular homeostasis is maintained by the secretion of vasodilators of which nitric oxide (NO) is the key. The amino acid L-arginine, which is a precursor of NO in macrophages and endothelial cells, throughout the syn-

thesis of ornithine is also a precursor of polyamines (putrescine, spermidine, and spermine), a group of polycationic amines involved in nearly every step of nucleic acid and protein synthesis (1). Therefore, they have a major

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-0531 Received February 28, 2011. Accepted June 1, 2011.

First Published Online June 22, 2011

Abbreviations: NO, Nitric oxide; ODC, ornithine decarboxylase; ROC, receiver-operating characteristic; VEGF, vascular endothelial growth factor.

role in human cell growth and proliferation. Thus, polyamines have been proposed to be biochemical markers for neoplasia because high polyamine concentrations are found in the physiological fluids of patients with malignancies. Due to their important functions in cells, their intracellular levels are highly regulated through a careful balance among biosynthesis, degradation, export, and uptake (2). The two key enzymes in the biosynthetic pathway, ornithine decarboxylase (ODC) and S-adenosylmethionine decarboxylase, are strongly regulated by feedback mechanisms at different levels. There is a close relationship between the metabolism of polyamines and NO metabolism driven by the amino acid arginine. Arginase is the central enzyme of the urea cycle that hydrolyzes arginine to ornithine. This enzyme competes with NO synthase for the substrate, arginine, and redirects the metabolism to the formation of polyamines. Up-regulation of the arginase may arise from enhanced formation of reactive oxygen species (3). Recently our group has shown an increase in markers of oxidative stress (4) and NO production in obese children (5). Therefore, we hypothesized that there may also be a significant change in polyamine metabolism, particularly levels of circulating polyamines, in obese children. To search their implications on obesity complications, we investigated the relationship between blood polyamine levels and markers of nitrosative and oxidative stress, inflammation, endothelial damage, and adipocytokines.

Materials and Methods

The study population consisted of 60 severely obese children and a control group of 42 healthy nonobese children ranging from 7 to 14 yr old. Characteristics of children and the criteria of inclusion and exclusion in the study are reported in the Supplemental Material and Methods and Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>. The parents and children filled out self-report food diaries to register the children's eating habits. The consumption of foods with large amounts of nitrates (spinach, lettuce) or polyamines (fermented cheese) were discouraged for the 48 h preceding the measurements to avoid confounding due to diet. The ethical committee of the institution approved the study, and the parents gave their informed consent. The children gave their oral consent.

For all participants, the clinical and anthropometric parameters were recorded using standard methods during the consultation. The degree of obesity was determined using age- and gender-related body mass index cutoff points established by Cole *et al.* (6) and standardized by z-score. The Spanish growth curves were used as a reference (7). Body fat percentage was obtained via bioelectrical impedance using the BC-418MA Tanita segmental body composition analyzer (Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands).

Blood sample preparation, routine biochemical analysis, and determination of markers of NO metabolism and oxidative

stress, inflammation, adhesion molecules, and adipocytokines were detailed in Supplemental Material and Methods.

Polyamine analysis

Acidic extracts of whole blood were used as described previously (8). In brief, 500 μ l of blood was mixed with 50 μ l of 4 mol/liter HClO₄ and 10 μ l of 1 mmol/liter 1,6-diaminohexane (internal standard to follow polyamine recovery). After shaking, the tubes were kept at 4 C for 15 min and centrifuged (15,000 \times g; 10 min). Dansyl derivatives of polyamines were obtained by mixing 100 μ l of clear supernatants with 400 μ l of dansyl chloride (10 g/liter in acetone) and 200 μ l of a saturated sodium carbonate solution and allowing the mixtures to react in the dark at 55 C for 90 min with occasional shaking. Then 100 μ l of 100 g/liter L-proline was added, and the samples were incubated for 30 min under the same conditions to remove the excess of dansyl chloride. Finally, the dansylated polyamines were extracted with 700 μ l of toluene, evaporated to dryness under vacuum, and redissolved in 50 μ l of acetonitrile. Aliquots of 20 μ l of these final solutions were used for HPLC analysis of dansylated polyamine derivatives.

Measurements were performed using an HPLC system (Waters, Milford, MA) equipped with a reverse-phase column (Nova-Pak C₁₈; 3.9 \times 150 mm; 4 μ m particle size; Waters) and precolumn (Nova-Pak C₁₈; 3.9 \times 20 mm; 4 μ m particle size; Waters). Fluorescence detection was set to 338 and 510 nm excitation and emission wavelengths, respectively. In this system, the polyamines were separated using a 50-min linear gradient from acetonitrile/water (60:40) to 100% acetonitrile at a flow rate of 1.5 ml/min. The identification of dansyl derivatives of putrescine, spermidine, spermine, and 1,6-diaminohexane was made by their retention times and quantification comparison with standards run in parallel with the blood samples. Recovered 1,6-diaminohexane in each sample (normally >90%) was used for the calculations.

Statistics

Statistical analysis was performed with the SPSS.17 software package (SPSS Inc., Chicago, IL). A receiver-operating characteristic (ROC) curve accounting for obesity was performed for the three polyamines to identify the most appropriate polyamine for subsequent analysis. Partial Pearson's coefficient correlation analysis adjusted by Tanner's stage and gender was performed in the obese subjects and in the entire group of subjects to identify the factors related to the polyamine level, which was considered to be the dependent variable. Adiposity, oxidative/nitrosative stress, inflammation, adhesion molecules, and adipocytokines were independent variables. Multiple linear regressions with stepwise procedures were used to evaluate the relative strength of the correlations between variables. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Blood levels of the three polyamines were significantly higher in the obese group with respect control group (Fig. 1A), and the remainder experimental parameters are described in Supplemental Table 2. We compared the area under the ROC curve for the three polyamines: putrescine,

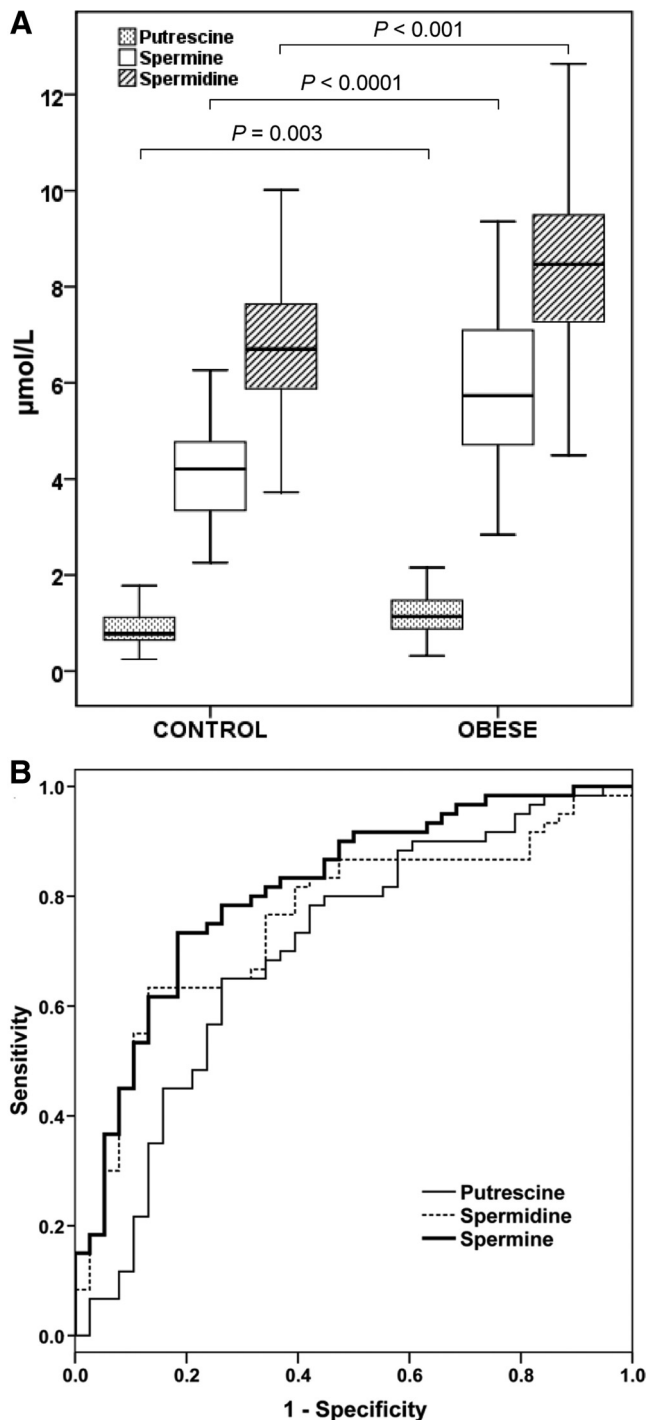


FIG. 1. A, Blood polyamine levels in control and obese children. The differences between groups adjusted for Tanner stage and gender were compared by an analysis of covariance test. Values are expressed as median (interquartile range): putrescine, 0.78 (0.64–1.03) vs. 1.14 (0.88–1.48) µmol/liter; spermine, 4.14 (3.34–4.77) vs. 5.74 (4.71–7.10) µmol/liter; spermidine, 6.65 (5.88–7.64) vs. 8.47 (7.27–9.50) µmol/liter. B, ROC curve of the three polyamines.

spermidine, and spermine (Fig. 1B). Spermine performed more accurately (0.82) than spermidine (0.76) or putrescine (0.70). These differences turn out not to be statistically significant, however. At the cutoff point of 4.86 µmol/liter, the degrees of sensitivity (73.3%) and speci-

TABLE 1. Partial Pearson’s coefficient correlation between spermine levels and clinical and laboratory data in all children included in the study (n = 102) and obese children (n = 60), adjusted for Tanner’s stage and gender

	All children	Obese children
Body mass index z-score	0.458 ^a	0.274 ^b
Relative fat mass	0.420 ^a	0.269 ^b
WC/hip circumference	0.263 ^c	0.107
WC/height	0.460 ^a	0.265 ^b
Relative WC	0.412 ^a	0.202
Log homocysteine	0.133	0.053
Log nitrite	0.272 ^b	0.236
Log nitrate	0.163	−0.110
Log 3′-nitrotyrosine	−0.061	−0.340 ^c
Log malondialdehyde	0.303 ^c	0.260 ^b
Log 8-isoprostaglandin F _{2α}	0.134	−0.177
Log sulfhydryl groups	−0.056	0.073
Log leptin	0.320 ^d	0.049
Log adiponectin	0.156	0.217
Resistin	0.150	0.154
Log hs-CRP	0.329 ^d	0.224
TNF-α	0.314 ^d	0.218
Log IL-6	0.215 ^b	0.039
Log sE-selectin	0.250 ^b	0.148
Log VEGF	0.128	0.279 ^b
sVCAM-1	0.030	0.002
Log sICAM-1	0.277 ^b	0.098

Skewed data were log transformed. WC, waist circumference; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; sE-selectin, soluble E-selectin; VEGF, vascular endothelial growth factor; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion protein 1; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1.

^a P < 0.0001; ^b P < 0.05; ^c P < 0.01; ^d P < 0.001.

ficity (81.0%) of spermine were the highest. Thus, subsequent correlation analysis was done with this polyamine.

Significant associations with spermine levels were noted in all of the study subjects (Table 1). The partial correlation analysis revealed a positive correlation between spermine blood levels and anthropometric measures indicative of obesity as well as markers of nitrosative/oxidative stress (plasma nitrite, malondialdehyde). There was also a positive association with inflammatory markers, leptin and adhesion molecules, soluble E-selectin, and soluble intracellular adhesion molecule-1. However, when only obese children were taken into account, some of these associations were lost, whereas other significant associations emerged. In particular, a negative association was found with 3′-nitrotyrosine and a positive association with vascular endothelial growth factor (VEGF). In the multiple regression analysis of the factors related to spermine levels, only malondialdehyde and VEGF yielded a model that was predictive (R² adjusted = 0.26, P = 0.047 and P = 0.004, respectively); therefore, the other variables were excluded.

Discussion

The key novel finding of the present study is that increased adiposity in children is associated with an increase in the three circulating polyamine levels. Among them, spermine is the polyamine with the highest discriminatory power in obesity in addition to being the one with more well-studied biological functions (9). We show that spermine level was related to markers of the NO pathway, oxidative stress, inflammation, and leptin. Interestingly, we have noted a negative correlation with 3'-nitrotyrosine and a positive association with VEGF, a factor that plays a pivotal role in both physiological and pathological angiogenesis, only in obese children.

In the current study, we observed that the circulating levels of the three main polyamines were significantly higher in obese children compared with controls. This increase in polyamines suggests an increase in ODC activity or an inhibition of ODC antizyme, a regulatory protein that controls ODC activity. An association between genetic polymorphisms of ODC antizyme and clinical outcomes in coronary heart disease has been reported (10), stressing the role of polyamine metabolism in vascular disease. Elevated polyamine levels in obese children may suggest a link between obesity and vascular disorders through cell proliferation mechanisms.

We have found that spermine levels were related to markers of nitrosative and oxidative stress. The strongly nucleophilic structure of polyamines can block and scavenge radicals and act as an antioxidant. In erythrocytes, it has been suggested that reinforce the antioxidant systems in these cells, being the total polyamine concentration a critical factor in determining cellular sensitivity to reactive oxygen species (11). Thus, the observed increase in polyamine levels in obese children might be related to an up-regulation of synthesis due to the oxidative stress present in obesity and can act as a compensatory mechanism.

In turn, the negative association of spermine to 3'-nitrotyrosine levels in obese children is another argument for the possible protective role of polyamines. In effect, 3'-nitrotyrosine has been considered a marker of cardiovascular injury (12). Recently this tyrosine nitration has been implicated in immunomodulation and provides a novel mechanism of T cell tolerance in cancer (13). Other protective roles for polyamines have been suggested. It has been proposed that they can act as antiglycating agents and protect against complications of diabetes (14). Moreover, enhanced polyamine catabolism, as seen with increased polyamine levels, can induce fatty acid oxidation uncoupling and insulin sensitivity (15). This facts support a putative role for polyamines against metabolic dysfunction in obesity.

In addition, polyamines have been shown to be necessary for the differentiation of 3T3-L1 fibroblasts into adipocytes (16), which regulates adipocyte formation and, consequently, obesity. In the current work, polyamine levels increase along with adiposity indices, which support their role on growth and development on adipose tissue. Furthermore, it is known that the expansion of this tissue is associated with active angiogenesis that must be mediated by angiogenic factors, such as VEGF (17). This factor is expressed in adipose tissue and is up-regulated during adipocyte differentiation. We can hypothesize that VEGF production related to polyamine levels could be a beneficial event in the early step of atherosclerotic plaque formation as it occurs in children (18). VEGF enhances angiogenesis and vascular development and promotes the oxygenation of arterial wall. However, this relation also provides a plausible link for the mechanism of obesity-associated cancer. Additionally, the increase of polyamines may affect DNA methylation because both depend on the same substrate S-adenosylmethionine (19). Thus, it is appealing to speculate that the connection between obesity and the risk of cancer could be the increase in these biological amines.

Undoubtedly, polyamines have two roles. Large-scale studies are needed to better define the potential impact of polyamines in clinical settings. In this respect, this study shows an increase in polyamine levels in childhood obesity that could be a response to oxidative conditions. Their putative protective role against metabolic dysfunction and their link to increased cancer risk in obesity deserves further attention.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Pilar Codoñer-Franch, Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avenida Gaspar Aguilar, no. 90, 46017 Valencia, Spain. E-mail: pilar.codoner@uv.es.

This work was supported by Grant 945/2008 from Escuela Valenciana de Estudios de la Salud, Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, and Grant CSD 2007-00063 of the Research Activity Program (CONSOLIDER-INGENIO), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

Disclosure Summary: P.C.-F., S.T.-A., R.M.-E., G.H.-M., and E.A.-I. have nothing to declare.

References

1. Pegg AE 2009 Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61:880–894
2. Persson L 2009 Polyamine homeostasis. *Essays Biochem* 46:11–24
3. Durante W, Johnson FK, Johnson RA 2007 Arginase: a critical reg-

- ulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:906–911
4. Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, Del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V 2010 Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes* 5:56–63
 5. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Megías-Vericat J, Tortajada-Girbés M, Alonso-Iglesias E 2011 Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* 215:475–480
 6. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH 2000 Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 320:1240–1243
 7. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, Ferrández Longás A, López-Siguero JP, Sánchez González E, Sobradillo Ruiz B, Yeste Fernández D; Grupo Colaborador Español 2008 Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)* 68:552–569
 8. Teixeira D, Santaolalia ML, Meneu V, Alonso E 2002 Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male Swiss albino mice. *J Nutr* 132:3715–3720
 9. Tsujinaka S, Soda K, Kano Y, Konishi F 2011 Spermine accelerates hypoxia-initiated cancer cell migration. *Int J Oncol* 38:305–312
 10. Dumont J, Zureik M, Bauters C, Grupposo MC, Cottel D, Montaye M, Hamon M, Dicimetière P, Amouyel P, Brosseau T 2007 Association of OAZ1 gene polymorphisms with subclinical and clinical vascular events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2120–2126
 11. Rider JE, Hacker A, Mackintosh CA, Pegg AE, Woster PM, Casero Jr RA 2007 Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* 33:231–240
 12. Ischiropoulos H 2009 Protein tyrosine nitration—an update. *Arch Biochem Biophys* 484:117–121
 13. Hardy LL, Wick DA, Webb JR 2008 Conversion of tyrosine to the inflammation-associated analog 3'-nitrotyrosine at either TCR- or MHC-contact positions can profoundly affect recognition of the MHC class I-restricted epitope of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein 33 by CD8 T cells. *J Immunol* 180:5956–5962
 14. Bjelakovic G, Beninati S, Bjelakovic B, Sokolovic D, Jevtic T, Stojanovic I, Rossi S, Tabolacci C, Kocić G, Pavlovic D, Saranac Lj, Zivic S 2010 Does polyamine oxidase activity influence the oxidative metabolism of children who suffer of diabetes mellitus? *Mol Cell Biochem* 341:79–85
 15. Pirinen E, Kuulasmaa T, Pietilä M, Heikkinen S, Tusa M, Itkonen P, Boman S, Skommer J, Virkamäki A, Hohtola E, Kettunen M, Fatrai S, Kansanen E, Koota S, Niiranen K, Parkkinen J, Levonen AL, Ylä-Herttuala S, Hiltunen JK, Alhonen L, Smith U, Jänne J, Laakso M 2007 Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure and glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 27:4953–4967
 16. Vuohelainen S, Pirinen E, Cerrada-Gimenez M, Keinänen TA, Uimari A, Pietilä M, Khomutov AR, Jänne J, Alhonen L 2010 Spermidine is indispensable in differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J Cell Mol Med* 14:1683–1692
 17. Ledoux S, Queguiner I, Msika S, Calderari S, Rufat P, Gasc JM, Corvol P, Larger E 2008 Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* 57:3247–3257
 18. Holm PW, Slart RH, Zeebregts CJ, Hillebrands JL, Tio RA 2009 Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF. *Ann Med* 41:257–264
 19. Schipper RG, van den Heuvel LP, Verhofstad AA, De Abreu RA 2007 Polyamines and DNA methylation in childhood leukaemia. *Biochem Soc Trans* 35:331–335



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation

Pilar Codoñer-Franch^{a,b,*}, Sandra Tavárez-Alonso^c, Rosa Murria-Estal^d, Javier Megías-Vericat^e, Miguel Tortajada-Girbés^a, Eulalia Alonso-Iglesias^c

^a Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain

^b Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Avda Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Valencia, Avda Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain

^d Clinical Biochemistry Laboratory, Dr. Peset University Hospital, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain

^e Laboratory of Cytomics, Mix Unit CIPF-UVEG, Center of Investigation Principe Felipe, Avda Autopista del Saler, 46012 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2010

Received in revised form 8 December 2010

Accepted 24 December 2010

Available online 19 January 2011

Keywords:

Children

Nitric oxide

Obesity

Oxidative stress

Tumor necrosis factor α

ABSTRACT

Objective: Nitric oxide (NO) is the major endothelium-derived relaxing factor. The aim of the present study was to evaluate NO synthesis and metabolism in severely obese children with different degrees of metabolic risk and to ascertain their relation with the parameters of oxidative stress and inflammation. **Methods:** The study involved 60 obese children evaluated with respect to metabolic risk factors (MRFs) ($32 < 4$ MRFs and $28 \geq 4$ MRFs) and 50 normal weight children between 7 and 14 years of age. Nutritional status was assessed by clinical and anthropometric examination. MRFs (serum lipid profile, insulin resistance indexes, blood pressure) in addition to uric acid, homocysteine, leptin, and inflammatory markers were measured. Plasma nitrite, nitrate and nitrotyrosine concentrations, and urinary nitrate were determined as markers of NO production and nitrosative stress. Malondialdehyde, 8-isoprostane $F_{2\alpha}$, and advanced oxidation protein products were analyzed in plasma to assess oxidative stress.

Results: Compared with healthy controls, the obese children had significantly increased concentrations of markers of NO synthesis and nitrosative and oxidative stress that were correlated with each another. Increased NO production in obese children was associated with MRFs; plasma nitrate to waist circumference ($r = 0.388$, $p = 0.003$), uric acid ($r = 0.404$, $p < 0.001$), and tumor necrosis factor α ($r = 0.302$, $p = 0.021$), and plasma nitrite to triglycerides ($r = 0.432$, $p < 0.001$).

Conclusion: NO synthesis and nitrosative stress are increased in severely obese children and correlated with anthropometric parameters indicative of abdominal obesity, oxidative stress and inflammatory markers.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is a major endothelium-derived relaxing factor synthesized in small amounts by both endothelial and neuronal NO synthase (NOS) under basal conditions. In contrast, inducible NOS can produce up to 1000-fold more NO than endothelial NOS when stimulated by inflammatory cytokines. The action of NO is very sensitive to the presence of free radicals, mainly superoxide, which combines with NO and generates peroxynitrite, a reaction that results in inhibition of NO-mediated processes and enhances oxidative damage [1]. This loss of NO bioavailability is a key feature of endothelial dysfunction.

Obesity is a clinical condition that can act as an underlying pathophysiological trigger of cardiovascular disease. In obesity, oxidative stress is now recognized to be an important feature that favors atherosclerosis and other adverse metabolic effects throughout the dysregulation of adipokines and inflammation [2]. However, contradictory data are available regarding NO metabolism in obesity and its complications [3]. Thus, Gomes et al. have described that adult patients with metabolic syndrome had lower concentrations of markers of NO formation [4]. In the same way, obesity in juveniles has been associated with a decrease in serum NO metabolites [5]. Nevertheless, a disparity of results has been found by other authors whereas evidence points to an association between higher serum NO metabolites levels and clustering of metabolic syndrome components in epidemiologic studies in adults [6] as well as in children [7].

The current study was designed to test the hypothesis that the parameters of NO metabolism are increased in obese children and related to cardiovascular risk. For this purpose, we have assessed

* Corresponding author at: Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avenida Gaspar Aguilar, Nº 90, 46017 Valencia, Spain.
Tel.: +34 961622389; fax: +34 963864815.

E-mail address: pilar.codoner@uv.es (P. Codoñer-Franch).

the plasma nitrite and nitrate, the urinary excretion of nitrate, and the nitrative modification of proteins by nitrotyrosine in a group of severely obese children. Traditional metabolic risk factors (MRFs) such as abdominal obesity, hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance were evaluated as well as recent factors related to cardiovascular risk such as uric acid and homocysteine. In addition, because oxidative stress is present in obese children [8], we ascertained the relation between the biomarkers of lipid and protein oxidation and indices of NO metabolism. Yet, as the adipokines and other inflammatory cytokines are implicated in cardiovascular risk [2], we also investigated the relation with leptin and parameters of subclinical inflammation [high-sensitivity C-reactive protein, tumor necrosis factor α (TNF- α), and interleukin 6] in our study subjects.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

A total of 110 subjects (age range 7–14 years) were studied, including 60 obese children (37 males), followed at the Pediatrics Nutrition outpatient clinic, and 50 healthy controls with normal nutritional status (23 males), who were from the local population visiting primary care pediatricians for routine health check-ups and unrelated to the patients. All participants underwent a complete medical history and physical examination and no children had clinical or laboratory signs of disease. The parents and the children provided their signed informed consent to participate in the study, which was approved by the local ethics committee.

The children's eating habits reflect the typical Mediterranean diet [9]. A limited nitrate diet (excluding food items such as cured meat and green leafy vegetables) was consumed for the 48 h preceding the measurements to avoid any dietary influence on nitrate and nitrite parameters. None of the children were receiving antioxidants or vitamin supplementation.

2.2. Measurements

Anthropometric parameters included body weight, height, waist circumference (WC), and hip circumference. Body adiposity was assessed by bioelectric impedance (BC-418MA, Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands). Values were expressed in number of standard deviation (z-score), referred to age and gender [10], for body mass index (BMI), or related to the 50th percentile for WC [11], and percentage of fat mass [12]. Obesity was defined following the criteria of the International Obesity Task Force [13]. Blood pressure was measured using an automated sphygmomanometer (Dinamp 200; GE medical Systems Information Technologies, Inc., Milwaukee, WI, USA) and expressed as z-score according to the tables provided by the Task Force Report [14].

2.3. Laboratory tests

Blood samples were obtained in the morning after at least a 12-h fast, and urine samples were obtained in 2 h after subjects fully voided their bladder. All biochemical parameters were determined at the hospital clinical laboratory. Glucose, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, and uric acid were measured by standardized techniques, and insulin and homocysteine by automated electrochemiluminescence immunoassay (Aeroset System[®] and Architect c8000[®] Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Germany). High-sensitivity C-reactive protein was measured by kinetic nephelometry (Image Nephelometer[®], Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA). Insulin resistance was determined by the homeostasis model assessment and

by fasting glucose-to-insulin ratio. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was determined through serum creatinine using the Léger formula (i.e., $eGFR \text{ (mL/min)} = [56.7 \times \text{body weight (kg)} + 0.142 \times \text{height}^2 \text{ (cm)}] / \text{creatinine (}\mu\text{M)}$), and corrected to body surface $\times 1.73 \text{ m}^2$.

2.4. Analytical procedures for markers of nitric oxide metabolism and oxidative stress

All markers were determined in plasma samples obtained immediately following blood processing (centrifugation at $600 \times g$ for 10 min) and stored in small aliquots (500 μL) at -80°C until analysis (<6 months, thawed once) [15]. In addition, nitrate excretion was evaluated in samples of 2 h urine collection, processed and stored in the same way. All assays were carried out in duplicate.

NO production was evaluated through their stable end products nitrite and nitrate. Plasma nitrite was measured fluorometrically (Assay kit No 780051; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) [16]. Fluorescence was quantified using a SpectraMAX Plus 384 GEMINI XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). To avoid interferences: (1) plasma samples were ultrafiltered through 10 kDa molecular weight cut-off filters (Microcon Ultracel YM-10; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) under centrifugation ($14,000 \times g$, 120 min, 15°C), (2) the amount of sample in the assay was limited to 10 μL of the ultrafiltered plasma, and (3) all materials (including microtiter plates, filters, tubs and pipette tips) were carefully rinsed with Ultrapure Milli-Q water prior to the assays. Following these guidelines, the assay was linear in the range 0–3.85 $\mu\text{mol/L}$ nitrite, with a detection limit of 0.05 $\mu\text{mol/L}$. Nitrate levels in plasma and urine were measured spectrophotometrically using the Griess reaction following conversion of nitrate to nitrite with nitrate reductase from *Aspergillus* spp. Conditions were essentially those described by Moshage et al. [17], being the absorbance at 540 nm recorded on a Multiskan EX microplate reader (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finland). The values obtained by this procedure were the sum of nitrite plus nitrate, from which nitrite levels were subtracted to obtain those of nitrate. Values of nitrate in urine were expressed related to those of creatinine ($\mu\text{mol/mmol creatinine}$) (UNO_3/UCr). Plasma nitrotyrosine was measured by enzyme-linked immunosorbent assay essentially as described by Ceriello et al. [18] using a commercially available kit (HK501; Hycult Biotech B.V., Uden, Netherlands).

Regarding markers of oxidative stress, plasma 8-isoprostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ was determined by a commercially available competitive enzyme immunoassay kit (Catalog No. 516351; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Malondialdehyde was determined in plasma spectrophotometrically at 532 nm following a reaction with thiobarbituric acid and reverse-phase isocratic HPLC separation [19]. Advanced oxidation protein products (AOPPs), a marker of protein oxidation, was measured spectrophotometrically at 340 nm according to the method proposed by Witko-Sarsat et al. [20] with a modification that adds a delipidation step [21].

2.5. Analytical procedure for inflammatory markers

We used a multiplex immunoassay [22] with MILLIPLEX Map Human Kits specific for interleukin 6, leptin and TNF- α (Human Serum Adipokine Panel B, # HADK2-61K-B) from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The plates were read in a cytometer (Luminex 100TM IS Analyser, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The standard curve was calculated using five-parametric-curve fitting, and results were analyzed using Luminex 100 IS 2.3 software (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

Table 1

Clinical and biochemical data of the 110 children stratified according to nutritional status and the number of metabolic risk factors (MRFs).

	Non-obese (n = 50)	Severe obesity with <4 MRFs (n = 32)	Severe obesity with ≥4 MRFs (n = 28)	p-value
Gender (F/M) ^a	27/23	11/21	12/16	0.210
Age (years) ^b	11 (9–13)	11 (8–12)	12 (10–13) [†]	0.036
eGFR (mL/min/1.73 m ²) ^c	136 ± 21	130 ± 14	123 ± 17 [*]	0.040
Anthropometry^b				
BMI z-score	−0.4 (−1.1–0.2)	3.9 (2.9–5.5) [*]	3.9 (3.3–5.0) [*]	<0.0001
Relative fat mass (%)	106 ± 26	199 ± 40 [*]	199 ± 45 [*]	<0.0001
Relative WC (%)	100 ± 10	143 ± 17 [*]	146 ± 17 [*]	<0.0001
WC/height	0.45 ± 0.04	0.62 ± 0.06 [*]	0.62 ± 0.07 [*]	<0.0001
Traditional MRFs^c				
Systolic BP z-score	−0.13 ± 1.09	0.83 ± 1.09 [*]	1.71 ± 0.95 [‡]	<0.0001
Diastolic BP z-score	0.00 (−0.60–0.18)	0.52 (0.22–1.19) [*]	1.06 (0.27–1.68) [‡]	<0.0001
HDL-cholesterol (mg/dL)	52 (44–61)	47 (41–53)	37 (32–41) [‡]	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	62 (42–79)	73 (61–83)	140 (98–212) [‡]	<0.0001
Glucose (mg/dL)	93 ± 7	95 ± 5	98 ± 7 [‡]	0.001
Insulin (μIU/mL)	9.1 ± 5.1	15.0 ± 7.1 [*]	28.0 ± 10.8 [‡]	<0.0001
HOMA-IR	2.0 (1.3–2.5)	3.2 (2.4–4.2) [*]	6.1 (4.8–8.9) [‡]	<0.0001
FGIR	11.2 (8.8–14.5)	7.0 (5.1–9.6) [*]	3.9 (2.9–4.9) [‡]	<0.0001
Other cardiovascular risk factors^c				
Uric acid (mg/dL)	3.3 ± 1.1	4.0 ± 0.7 [*]	5.0 ± 1.1 [‡]	<0.0001
Homocysteine (μmol/L)	6.5 (5.7–7.0)	7.2 (5.9–8.6)	7.9 (6.8–9.0) [*]	0.003

BMI = body mass index; WC = waist circumference; BP = blood pressure; HDL = high-density lipoprotein; HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance; FGIR = fasting glucose-to-insulin ratio; eGFR = estimated glomerular filtration rate.

Values are expressed as means ± SD or as medians (interquartile range) for skewed data.

^a Chi-square test.

^b ANOVA test.

^c ANCOVA test adjusted by age and gender.

^{*} Statistically different versus non-obese subjects.

[†] Versus severe obese subjects with <4 MRFs.

[‡] Versus non-obese subjects, and severe obese subjects with <4 MRFs.

2.6. Definitions

To estimate metabolic risk in children we included the following factors for analysis based on criteria analogous to those of the International Diabetes Federation (IDF) consensus [23]: (1) abdominal adiposity (WC ≥ 90th percentile with regard to age and gender and WC/height ≥ 0.5), (2) impaired glucose metabolism (fasting glucose ≥ 100 mg/dL, or insulin resistance defined as homeostasis model assessment ≥ 3.16 [24], or fasting glucose-to-insulin ratio ≤ 6 [25]), (3) high-density lipoprotein cholesterol ≤ 40 mg/dL, (4) triglycerides ≥ 110 mg/dL, and (5) hypertension (systolic or diastolic blood pressure > 95th percentile for age and gender). We considered that obese children had a high metabolic risk when at least four of these factors were present (≥ 4 MRFs).

2.7. Statistical analysis

Data analysis was performed with the SPSS 17.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The adjustment to normality was verified with the Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors correction. Skewed data were log transformed for analysis. All results are expressed as mean ± SD or median and interquartile range (25–75th percentile) as appropriate. Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) for gender-age-standardized data. Analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for age and gender was used to non-standardized variables. *Post hoc* comparisons using the Least Significant Difference (LSD) test were performed to determine which group significantly differs from others. Relationships of the parameters of the NO pathway with oxidative stress biomarkers, MRFs, leptin and parameters of inflammation were analyzed by Pearson partial correlation coefficient after controlling for age and gender both in all children included in the study and specifically in obese children. A *p* value < 0.05 was considered the minimum level of statistical significance.

3. Results

3.1. Study subjects

Table 1 shows the clinical characteristics, anthropometric parameters and biochemical data of the normal weight and obese children according to the presence of MRFs included in this study. There were significant differences in all factors studied between the control group and all children in the obese group (60 children). It was notable that the obese children with high metabolic risk (≥ 4 MRFs) were slightly older. These children also present higher values of uric acid and homocysteine and the eGFR was lower (although within normal limits) than normal children.

3.2. Markers of the NO metabolism, oxidative stress, and inflammation in obese children according to metabolic risk

The results are presented in Table 2. Analysis of the NO metabolism showed significant alterations in obese children compared to normal weight children. Plasma nitrite, nitrate, and nitrotyrosine were significantly increased in obese children, with plasma nitrite higher in the obese children with MRFs ≥ 4 versus MRFs < 4. UNO₃/UCr was also higher in obese children than controls; however, patients with MRFs ≥ 4 had lower levels compared to obese children with MRFs < 4. This fact cannot be attributed to an altered glomerular function, as this was normal in all cases. Moreover, UNO₃/UCr was not correlated with eGFR (*r* = 0.174, *p* = 0.192). Leptin values were increased in obese children and were higher with high metabolic risk. Inflammatory markers were increased in obese children without differences with respect to MRFs. The markers of lipid peroxidation (malondialdehyde and 8-isoprostane F_{2α}) were also significantly elevated in obese children. The increase in AOPPs was only observed in the children with higher metabolic risk.

Table 2
Parameters of the NO pathway, oxidative stress, and inflammation of the 110 children stratified according to nutritional status and the number of metabolic risk factors (MRFs).

	Non-obese (n = 50)	Severe obesity with <4 MRFs (n = 32)	Severe obesity with ≥4 MRFs (n = 28)	p-value ^a
Nitrite (μmol/L)	1.07 (0.60–1.60)	1.43 (0.80–2.0) [*]	2.61 (1.37–3.90) [‡]	0.005
Nitrate (μmol/L)	23.0 (21.4–25.8)	31.1 (27.3–41.4) [†]	31.9 (27.5–35.6) [†]	0.002
Nitrotyrosine (μmol/L)	0.29 (0.14–0.47)	0.42 (0.24–0.78) [*]	0.42 (0.27–0.72) [*]	0.028
UNO ₃ /UCr (μmol/mmol creatinine)	71.8 (58.8–84.0)	99.9 (71.1–128.6) [†]	92.1 (63.6–106.7) [†]	0.002
8-isoprostane F _{2α} (pg/mL)	24.8 (18.4–30.1)	33.9 (23.8–54.9) [*]	35.2 (26.2–47.4) [*]	<0.001
Malondialdehyde (μmol/L)	0.36 (0.22–0.47)	0.41 (0.27–1.19) [*]	0.82 (0.28–1.16) [*]	0.008
AOPPs (μmol/L)	47.7 ± 15.6	51.1 ± 16.0	63.5 ± 14.3 [‡]	<0.001
Leptin (ng/mL)	21.5 (8.2–50.6)	113.7 (85.5–130.8) [*]	168.6 (130.3–193.3) [‡]	<0.0001
TNF-α (pg/mL)	28.0 ± 8.5	37.5 ± 11.3 [*]	34.1 ± 9.9 [*]	<0.0001
Interleukin 6 (pg/mL)	9.2 (7.6–12.2)	15.1 (12.2–20.7) [*]	13.7 (10.7–19.3) [*]	<0.0001
hs-CRP (mg/L)	0.43 (0.21–0.96)	3.08 (0.88–4.53) [*]	2.40 (0.89–4.56) [*]	<0.0001

UNO₃/UCr = urinary nitrate/urinary creatinine; AOPPs = advanced oxidation protein products; TNF-α = tumor necrosis factor α; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein. Values are expressed as means ± SD or as medians (interquartile range) for skewed data.

^a ANCOVA adjusted by age and gender.

^{*} Statistically different versus non-obese subjects.

[†] Versus severe obese subjects with <4 MRFs.

[‡] Versus non-obese subjects, and severe obese subjects with <4 MRFs.

3.3. Correlation of parameters of the NO metabolism with oxidative stress markers in obese children

We found a significant correlation between plasma markers of NO metabolism and those indicative of oxidative stress in obese children adjusted by age and gender. Plasma nitrite and nitrate contents were significantly and positively associated with 8-isoprostane F_{2α} ($r = 0.386$, $p = 0.003$, and $r = 0.320$, $p = 0.014$, respectively). Furthermore, plasma nitrite was also associated with plasma malondialdehyde ($r = 0.275$, $p = 0.036$). However, such correlations do not extend to urinary nitrate in spite of the good correlation among nitrate levels in plasma and urine ($r = 0.649$, $p < 0.0001$). In our study, nitrotyrosine levels were neither correlated with nitrite or nitrate levels nor with parameters of oxidative stress.

3.4. Correlation of parameters of the NO metabolism and nitrosative stress with cardiometabolic risk factors and adipokines

The analysis was performed on all children enrolled in the study and especially in the obese group (Table 3). To control for the effects of age and gender, the partial Pearson's coefficient correlation analysis adjusted by these variables was done. There were

positive associations of anthropometric parameters indicative of abdominal adiposity such as the relative WC, and WC/height with plasma nitrate in obese children. Nevertheless, there was no correlation to other anthropometric parameters such as body mass index z-score or the percentage of fat mass, nor to blood pressure. Regarding serum lipid levels, only the triglyceride values were related to plasma nitrite in obese children. Among non-traditional MRFs analyzed, there was a positive correlation of plasma nitrate with uric acid, and UNO₃/UCr was inversely correlated with homocysteine levels. With respect to the inflammatory markers, only TNF-α values correlated positively with plasma nitrate in obese children.

4. Discussion

In this study, markers of NO formation, oxidative stress, leptin and inflammatory cytokines were assessed in normal and obese children. The main findings are as follows: (1) compared with normal weight children, the obese children had higher concentrations of markers of NO formation, which were associated with increased markers of oxidative stress. (2) When the presence of ≥4 MRFs was considered, the plasma levels of nitrite were higher, as well as the AOPPs. In contrast, the urinary levels of nitrate were lower than in the group of obese children with <4 MRFs. (3) When the parameters

Table 3
Pearson correlation coefficients adjusted for age and gender in all the study children (n = 110) and severely obese children (n = 60).

	Log nitrite		Log nitrate		Log UNO ₃ /UCr		Log nitrotyrosine	
	All subjects	Obese subjects	All subjects	Obese subjects	All subjects	Obese subjects	All subjects	Obese subjects
Log BMI z-score	0.233 [*]	0.125	0.381 [§]	0.192	0.180	0.098	0.199 [*]	-0.145
Relative WC	0.246 [†]	0.098	0.452 [§]	0.388 [†]	0.227 [*]	0.191	0.237 [*]	0.061
WC/height	0.292 [†]	0.103	0.414 [§]	0.286 [*]	0.227 [*]	0.205	0.250 [†]	0.129
Systolic BP z-score	0.277 [†]	0.236	0.128	-0.019	0.006	-0.081	0.225 [*]	0.133
Log diastolic BP z-score	0.233 [*]	-0.072	0.080	-0.100	-0.076	-0.157	0.168	-0.047
Log HDL-cholesterol	-0.287 [†]	-0.245	-0.237 [*]	-0.052	0.045	0.211	-0.148	-0.031
Log triglycerides	0.367 [§]	0.432 [‡]	0.076	-0.014	-0.024	0.008	-0.002	-0.029
Log HOMA-IR	0.194 [*]	0.153	0.175	-0.185	-0.015	-0.217	0.220 [*]	0.100
Uric acid	0.155	0.217	0.359 [§]	0.404 [‡]	0.068	0.109	-0.043	-0.234
Log homocysteine	0.038	0.141	-0.015	-0.233	-0.202 [*]	-0.314 [*]	-0.123	-0.103
Log leptin	0.041	0.113	0.279 [†]	-0.203	0.146	-0.215	0.150	-0.199
TNF-α	0.049	0.145	0.249 [†]	0.302 [*]	0.237 [*]	0.251	0.158	0.094
Log interleukin 6	0.073	0.005	0.089	-0.180	-0.056	-0.198	0.269 [†]	0.138
Log hs-CRP	0.025	0.013	0.195 [*]	-0.220	0.154	-0.155	0.237 [*]	-0.168

BMI = body mass index; WC = waist circumference; BP = blood pressure; HDL = high-density lipoprotein; HOMA-IR = homeostasis model assessment of insulin resistance; TNF-α = tumor necrosis factor α; hs-CRP = high-sensitivity C-reactive protein.

^{*} $p < 0.05$.

[†] $p < 0.01$.

[‡] $p < 0.001$.

[§] $p < 0.0001$.

of NO metabolism were analyzed individually in obese children, there was a positive association of plasma nitrite with triglyceride levels, and of plasma nitrate with anthropometric measures of abdominal obesity, uric acid, and TNF- α , whereas an inverse relationship between urinary nitrate and homocysteine was found.

Although the importance of the NO pathway in the genesis of atherosclerosis is well-recognized, contradictory data regarding markers of NO metabolism have emerged, particularly in childhood obesity. In obese juveniles, a significant decrease has been reported in nitrate/nitrite combined measurements (usually termed as NO $_x$) that may contribute to a reduced bioavailability of NO [5]. However, recently, the concentrations of NO $_x$ have been found to be higher in obese children and related to metabolic syndrome [7]. The excessive production of NO in obese patients is also supported by the fact of its decrease found after bariatric surgery in morbid obese patients [26]. Measuring NO production “in vivo” is difficult because it is rapidly oxidized, but insights regarding this process can be obtained by indirect markers of its production. Nitrite and nitrate in human plasma are the oxidation products of NOS-derived NO and quantitative indicators of NO formation. Nitrite levels have been proposed as indicator of bioactive NO synthesized by endothelial NOS in the vascular wall. In contrast, plasma nitrate, and hence NO $_x$, will be indicative of total-body NO synthesis. Nitrate is excreted through the kidney by glomerular filtration, but a significant proportion is actively reabsorbed by the distal tubule accounting for its low clearance rate. Hence, urinary nitrate, in the same way as plasma nitrate, reflects the steady-state of the total body NO production [15].

In our study, we found evidence of significant increases rather than reductions in all the plasmatic parameters of the NO metabolism in obese children, mainly in the presence of a cluster of MRFs. This observation suggests that enhanced NO production occurs at the earliest stages of obesity and is related to metabolic risk in line with the data of Ghasemi et al. [7]. It is possible that discrepancies between our results and those of Gruber et al. [5] may be derived from differences in subjects among the studies, mainly with respect to the age because puberty modifies metabolic risk factors. The children included in our study are younger than the subjects studied by Gruber et al. [5]. It is conceivable that, in the initial state, there is a compensatory increase of NO synthesis, and, after that, it could decline. Enhanced NO production may occur by an early adaptive response through upregulation of endothelial NOS [3]. Furthermore, adipogenic differentiation in obesity increases the expression of inducible NOS that can lead to an augmented generation of NO [27]. The expression of inducible NOS may be regarded as one aspect of obesity-associated chronic inflammation. In this sense, we have found a positive relationship between plasma nitrate and the pro-inflammatory cytokine TNF- α , which habitually precedes the increase in interleukin 6 and high-sensitivity C-reactive protein in the inflammatory cascade [2]. Therefore, changes in NO production may arise through complex interactions between factors that regulate NOS activity and expression and could differ throughout the course of obesity.

In the current study, correlations were found between both plasma 8-isoprostanes F $_{2ox}$ and malondialdehyde with markers of NO production. Increased production of reactive oxygen species could limit NO bioavailability because they convert NO to peroxynitrite that in turn leads to nitrosative stress. Peroxynitrite is a powerful pro-oxidant that can modify tyrosine residues to give nitrotyrosine, which is considered to play a major role in the cytotoxic vascular process [28]. The increase in nitrotyrosine levels in obese children irrespective of the presence of MRFs found in this study suggests that it is an early event in the natural history of obesity.

Because of the complex chemical reactions involved in metabolism of NO and its interrelationship with oxidative stress it

cannot be easily discriminated whether high or low levels of indirect products of NO (nitrite and nitrate) will be beneficial or not. They are thus a measure both of the generation and elimination of NO and have no prognostic implications.

Of note is the significant correlation of metabolic factors with parameters of NO metabolism that points to the enhanced production [29]. However, we did not find a relationship between insulin resistance and markers of the NO pathway, possibly because insulinemia is highly age-dependent, and it could require a much larger numbers of subjects to detect, as it occurs in the study of Ghasemi et al. [7].

It may be surprising that, on the contrary, urinary nitrate seems to not be affected by the MRFs studied in our patients. Nonetheless, an interesting and statistically significant inverse relationship between urinary nitrate and homocysteine, an independent risk factor for early atherosclerotic vascular disease, was observed. In this sense, our results are in agreement with O’Kane et al. [30]. The excretion rate of nitrate in the urine assesses gradual, long-lasting changes in whole body NO synthesis. Alternatively, minimal renal dysfunction in obesity might explain the diminution observed in the excretion of nitrate as the renal vascular bed is extremely sensitive to changes in endothelial function.

In conclusion, we suggest that in obese children, the increased NO biosynthesis is an early event associated with oxidative stress and inflammation. These interrelations may play a role in the development of atherosclerosis at an early age.

Conflict of interest statement

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

This research was supported by grants 945/2008 from EVES, Consellería de Sanitat, Generalitat Valenciana, and by CSD 2007-00063 Research Activity Programme (CONSOLIDER-INGENIO), MEC, Spain.

References

- [1] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315–424.
- [2] Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:332–41.
- [3] Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, et al. Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci* 2006;78:1187–96.
- [4] Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2008;19:345–50.
- [5] Gruber HJ, Mayer C, Mangge H, Fauler G, Grandits N, Wilders-Truschnig M. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:826–31.
- [6] Zahedi Asl S, Ghasemi A, Azizi F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2008;41:1342–7.
- [7] Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Nitric oxide and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. *Eur J Epidemiol* 2010;25:45–53.
- [8] Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V. Is obesity associated with oxidative stress in children. *Int J Pediatr Obes* 2010;5:56–63.
- [9] Serra-Majem L, Ribas L, Ngo J, et al. Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public Health Nutr* 2004;7:931–5.
- [10] Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, et al. Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)* 2008;68:552–69.
- [11] Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004;145:439–44.
- [12] McCarthy HD, Cole TJ, Fry T, Jebb SA, Prentice AM. Body fat reference curves for children. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:598–602.
- [13] Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000;320:1240–3.

- [14] National high blood pressure education program working group on high blood pressure in children and adolescent. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* 2004;114:555–76.
- [15] Tsikas D, Gutzki F-M, Stichtenoth DO. Circulating and excretory nitrite and nitrate as indicators of nitric oxide synthesis in humans: methods of analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;61:51–9.
- [16] Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MC. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 1993;214:11–6.
- [17] Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892–6.
- [18] Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001;44:834–8.
- [19] Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827:76–82.
- [20] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304–13.
- [21] Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Tortajada-Girbés M, Simó-Jordá R, Alonso-Iglesias E. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) is indicative of metabolic risk in severe obese children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010. doi:10.1016/j.numecd.2010.06.002.
- [22] Vignali DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 2000;243:243–55.
- [23] Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents—an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007;8:299–306.
- [24] Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 2005;115:e500–3.
- [25] Giannini C, de Giorgis T, Scarinci A, et al. Obese related effects of inflammatory markers and insulin resistance on increased carotid intima media thickness in pre-pubertal children. *Atherosclerosis* 2008;197:448–56.
- [26] Lin LY, Lee WJ, Shen HN, Yang WS, Pai NH, Su TC, Liao CS. Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients. *Atherosclerosis* 2007;190:436–42.
- [27] Noronha BT, Li JM, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes* 2005;54:1082–9.
- [28] Koeck T, Willard B, Crabb JW, Kinter M, Stuehr DJ, Aulak KS. Glucose-mediated tyrosine nitration in adipocytes: targets and consequences. *Free Radic Biol Med* 2009;46:884–92.
- [29] Choi JW. Enhanced nitric oxide production is closely associated with serum lipid concentrations in adolescents. *Clin Chem Acta* 2004;347:151–6.
- [30] O’Kane PD, Jackson G, Ferro A. Whole body nitric oxide production is not decreased in patients with coronary atherosclerosis but is inversely related to plasma homocysteine. *Atherosclerosis* 2008;196:574–9.



Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children

P. Codoñer-Franch^{a,b,*}, S. Tavárez-Alonso^d, R. Murria-Estal^c,
M. Tortajada-Girbés^a, R. Simó-Jordá^a, E. Alonso-Iglesias^d

^a Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain

^b Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Avda Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain

^c Clinical Biochemistry Laboratory, Dr. Peset University Hospital, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Valencia, Avda Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain

Received 21 January 2010; received in revised form 25 April 2010; accepted 3 June 2010

KEYWORDS

Advanced oxidation protein products;
Childhood obesity;
Insulin resistance;
Metabolic risk factors;
Oxidative stress

Abstract *Background and aims:* The assessment of oxidative stress may aid in the identification of subsequent metabolic risk in obese children. The objective of this study was to determine whether the plasma level of advanced oxidation protein products, analyzed with a recently proposed modified assay that involves a delipidation step (mAOPPs), was related to metabolic risk factors (MRFs) in severely obese children.

Methods and results: The plasma levels of mAOPPs were determined by spectrophotometry in 54 severely obese and 44 healthy children. We also measured lipid peroxidation biomarkers (thiobarbituric acid-reactive substances, malondialdehyde, and 8-isoprotane F_{2x}) and sulfhydryl groups, a marker of antioxidant defense. Protein oxidation and lipid peroxidation markers were higher and sulfhydryl levels were lower in obese children compared with controls. Taking metabolic risk into account, obese children were subdivided according to the cutoff point (53.2 $\mu\text{mol/L}$) obtained for their mAOPPs values from the ROC curve. Anthropometric measures and the existence of hypertension did not differ between groups. The presence of dyslipidemia and insulin resistance was significantly higher in the group with higher mAOPPs levels. The highest levels of mAOPPs were found in the children with ≥ 3 MRFs. The level of mAOPPs was positively correlated with triglycerides and negatively correlated with high-density lipoprotein cholesterol. There was no correlation of this marker of protein oxidation with biomarkers of lipid peroxidation.

Abbreviations: AOPPs, advanced oxidation protein products; mAOPPs, modified advanced oxidation protein products; BMI, body mass index; BP, blood pressure; FGIR, fasting glucose-to-insulin ratio; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment index; MRFs, metabolic risk factors; -SH groups, sulfhydryl groups; TG, triglycerides; WC, waist circumference.

* Corresponding author at: Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avda Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain. Tel.: +34 961622389; fax: +34 963864815.

E-mail address: pilar.codoner@uv.es (P. Codoñer-Franch).

Conclusion: The determination of mAOPPs in delipidated plasma is an easy way to evaluate protein oxidation. It may be useful in severely obese children for better cardiovascular risk assessment.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Obese children have elevated oxidative stress levels that may contribute to the pathogenesis of long-term complications such as cardiovascular disorders and type 2 diabetes [1]. Thus, determination of oxidative stress markers, in addition to clinical and laboratory indices, has been proposed for evaluation of obese children [2]. The most frequently used approach is the measurement of lipid peroxidation. In addition to lipids, proteins are also recognized as important targets for oxidants. The oxidative structural and functional modification of proteins could be an important event leading to endothelial dysfunction [3]. Until recently, however, protein oxidation has not been extensively studied in clinical settings because of a lack of easily accessible methods for detection of protein damage. Advanced oxidation protein products (AOPPs) are a relatively novel oxidative stress marker. They have mainly been related with impaired carbohydrate metabolism in subjects with type 1 or 2 diabetes [4,5]. Atabeck et al. [6] found that this marker was increased in obese children and adolescents. A recent study showed that juvenile overweight/obesity and obesity-related disorders were associated with increased AOPPs levels [7]. Nevertheless, there is currently insufficient data linking protein oxidative stress determined by AOPPs levels to metabolic risk factors (MRFs) in children. Paradoxically, despite higher AOPPs, obese children display lower plasma advanced glycation products (involved in the pathogenesis of diabetic complications) in comparison with their lean counterparts [8]. In addition, current methods might be overestimating AOPPs values because of interferences caused by lipid levels (principally triglycerides) [9]. For these reasons, the aim of this study was to investigate the value of AOPPs, using a modified assay that includes a delipidation step (mAOPPs), as a marker of protein oxidation in obese children to assess their clinical utility to identify obese children who are at risk for complications. We also investigated the relationship of this marker with others biomarkers of lipid oxidation in childhood obesity.

Methods

Study population

A total of 98 children aged 7–14 years were enrolled in this study. Fifty-four of these children were referred to the outpatient clinic at Dr. Peset University Hospital (Valencia, Spain) for investigation and treatment of obesity. All these children were affected by severe essential obesity with a body mass index (BMI) higher than 2.5 standard deviations from the mean for their age and gender [10]. The other 44 children constituted the control group. The children were

recruited by primary care physicians during routine clinical check-ups and gave their consent to participate in the study. All subjects were Caucasian and of Spanish descent. Exclusion criteria were the presence of concomitant diseases, genetic syndromes, endocrine disorders, and chronic allergies. No children had an infectious and/or inflammatory illness, which was confirmed by medical histories and physical examinations. Pubertal stage was assessed by inspection and palpation in each patient by the same pediatrician according to the criteria of Marshall and Tanner. All of the subjects were \leq stage 3, and female subjects had not yet begun menstruation. Nutritional habits were similar in all children; there were no vegetarians, and no patients were taking supplemental vitamins. Informed written consent was obtained from all parents, and oral consent was obtained from all children. The Ethical Committee of the hospital approved the research.

Measurements

On the day of entry to the study, all children underwent a complete clinical history and examination. Weight and height measurements were taken with the child lightly dressed and barefoot, according to standardized methods. Waist circumference (WC) was obtained over the unclotted abdomen at the narrowest point between the rib cage and the superior border of the iliac crest. Hip circumference was measured over light clothing at the level of the widest diameter around the buttocks using non-elastic flexible tape, and measurements were recorded to the nearest 0.1 cm. We used the BMI z-score for age and gender as a fatness index. The fat mass percentage was obtained via bioelectrical impedance using the BC-418MA Tanita Segmental Body Composition Analyzer (Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands) and converted to normalized parameters using comparison to the 50th standard percentile for age and gender for the fat mass percentage (relative fat mass) [11]. The distribution of fat mass was evaluated by relating the WC to the 50th percentile for age and gender [12] as well as the WC/hip circumference and WC/height indices.

Blood pressure (BP) was measured using an automated sphygmomanometer (Dinamp 200; GE medical Systems Information Technologies, Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA). Elevated BP (\geq 95th percentile for height) was determined using tables provided by the Task Force Report [13].

Laboratory procedures

After overnight fasting, blood samples were taken from the antecubital vein. Routine biochemical blood tests included serum glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol,

triglycerides (TG), and uric acid [Aeroset System[®], Abbott Clinical Chemistry (Wiesbaden, Germany)]. Insulin, homocysteine, and folic acid were measured using automated electrochemiluminescence immunoassays [Architect c800[®], Abbott Clinical Chemistry (Wiesbaden, Germany)]. Nephelometry was used to measure apoproteins A1 and B and highly sensitive C-reactive protein [Dade Behring Inc., (Barcelona, Spain)]. We employed the homeostasis model assessment index (HOMA-IR) for determination of insulin resistance, which was calculated by the following equation: fasting insulin levels ($\mu\text{U/mL}$) \times fasting glucose (mmol/L)/22.5. We also determined the fasting glucose-to-insulin ratio (FGIR) (i.e., fasting glucose (mg/dL)/fasting insulin ($\mu\text{U/mL}$)).

Analyses of oxidative stress biomarkers were performed for plasma obtained immediately by blood processing (centrifugation at 600 g for 10 min) and stored in small aliquots (500 μL) at -80°C until analysis (<6 months) [14]. All assays were carried out in duplicate. AOPPs were measured spectrophotometrically according to the method proposed by Witko-Sarsat et al. [15]. Briefly, 1 mL of plasma diluted 1:5 in phosphate-buffered saline (10 mmol/L , pH 7.4) or chloramine-T standard solutions (0–100 $\mu\text{mol/L}$) was mixed with 50 μL of potassium iodide (1.16 mol/L) followed by 100 μL of acetic acid. Absorbance at 340 nm was determined immediately, and AOPPs concentrations were expressed in $\mu\text{mol/L}$ of chloramine-T equivalents. We delipidated plasma samples (500 μL) with a 50 μL mixture of 10 g/L dextran sulfate (Dextralipid 50; Sigma–Aldrich Química S.A, Madrid, Spain) and 1 mol/L magnesium sulfate (Sigma–Aldrich Química S.A, Madrid, Spain) and measured AOPPs in the supernatant after centrifugation at 1000 g for 20 min [9]. These values were compared to AOPPs measured directly in the plasma to determine lipid interferences. Unless stated otherwise, AOPPs values in this study refer to those obtained in delipidated plasma and marked as mAOPPs.

Plasma 8-isoprostaglandin F_{2x} was analyzed using a commercially available competitive enzyme immunoassay (EIA) kit (Catalog No 516351; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Similar to a previously described method [16], plasma levels of malondialdehyde were determined by spectrophotometric quantification of the diethylthio-barbituric acid adduct at 532 nm after reverse-phase isocratic HPLC separation of the complex. In addition, thiobarbituric acid-reactive substances (malondialdehyde-like substances) were analyzed spectrophotometrically at 532 nm following reaction with thiobarbituric acid under acidic conditions as described by Santos et al. [17]. The concentration of sulfhydryl groups (-SH groups) was measured with Ellman's reagent (5',5'-dithiobis, 2-nitrobenzoic acid) in 0.1 mol/L sodium phosphate buffer, pH 8.0. Absorbance was read at 412 nm and calculations were performed with a molar extinction coefficient of $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [18].

Definitions

Because universally accepted criteria to estimate metabolic risks in children are lacking, we included the same risk factor variables that are used for the adult definition.

These are based on criteria analogous to those of the International Diabetes Federation (IDF) consensus [19]. Thus, the following variables were considered for analysis: central adiposity (WC \geq 90th percentile with regard to age and gender and WC/height \geq 0.5), impaired glucose metabolism (fasting glucose \geq 5.55 mmol/L [100 mg/dL] or insulin resistance defined as HOMA-IR \geq 3.16 [20] or FGIR \leq 6 [21]), dyslipidemia (HDL-C \leq 1.03 mmol/L [40 mg/dL] or TG \geq 1.24 mmol/L [110 mg/dL]), and hypertension (systolic or diastolic BP $>$ 95th percentile for age and gender).

Statistical analysis

The sample size necessary to achieve 90% statistical power with a two-sided significance level of 0.05 was calculated from our previous data [1]. The adjustment to normality was verified with the Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors correction. Continuous data were expressed as mean \pm SD, or median (interquartile range) for skewed data. The data that were not normally distributed were transformed logarithmically for analysis. Differences in continuous variables between two groups were assessed by unpaired Student's *t*-test. Categorical data are presented as frequencies (*n*) and percentages (%) and are compared by the χ^2 test. The cutoff value for mAOPPs was calculated from a receiver-operating characteristic (ROC) curve. Correlations between variables were assessed with Pearson's coefficient. Multiple linear regression (stepwise) was applied to identify the relationship between the various parameters. Statistical analysis was performed using the G-Stat 2.0 software package (GlaxoSmithKline S.A.). $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

The clinical and anthropometric data as well as the biochemical characteristics of the children participating in the study are summarized in Table 1. The differences between obese children and controls with regard to age and gender were not significant. All obese subjects presented with abdominal obesity (WC $>$ 90th percentile and WC/height $>$ 0.5), and 80% of them had a BMI z-score $>$ 3. Only 26% of the obese children had fasting glucose values greater than 100 mg/dL . However, HOMA-IR values exceeded 3.16 in 76% of participants, and FGIR $<$ 6 was noted in 68%.

Cumulative results regarding biomarkers of oxidative stress in both the patient and control groups are shown in Table 2, and significant differences were documented. All biomarkers of oxidative stress were higher in obese children compared with controls. The levels of sulfhydryl groups were significantly lower in obese children, which reflected the degree of antioxidant consumption. Independent of delipidation, no correlation was observed between AOPPs values and the biomarkers of lipid peroxidation or antioxidant status.

As expected, plasma delipidation reduced AOPPs levels (by 23% and 16%) and TG (by 88% and 86%) in the obese and control groups, respectively. However, AOPPs values remained significantly elevated in the obese group after plasma delipidation. Thus, only the AOPPs values obtained in delipidated plasma (mAOPPs) were used in subsequent analysis.

Table 1 Clinical and biochemical data for control and severely obese children enrolled in the study

	Control (<i>n</i> = 44)	Obese (<i>n</i> = 54)	<i>P</i> -value
Gender (F/M)	19/25	21/33	0.667
Age (years)	11 (9–13)	12 (9–13)	0.615
BMI z-score	−0.4 ± 0.9	4.1 ± 1.3	<0.0001
Relative fat mass (%)	105 ± 28	198 ± 43	<0.0001
Relative WC (%)	101 ± 10	145 ± 17	<0.0001
WC/hip circumference	0.87 ± 0.06	0.93 ± 0.06	<0.0001
WC/height	0.45 ± 0.04	0.62 ± 0.06	<0.0001
Systolic BP z-score	−0.16 ± 1.16	1.31 ± 1.13	<0.0001
Diastolic BP z-score	−0.06 (−0.64–0.34)	0.66 (0.26–1.55)	<0.0001
Total cholesterol (mmol/L)	4.04 ± 0.83	4.40 ± 0.90	0.040
HDL-C (mmol/L)	1.31 (1.17–1.58)	1.03 (0.93–1.22)	<0.0001
LDL-C (mmol/L)	2.36 ± 0.62	2.69 ± 0.75	0.023
TG (mmol/L)	0.68 (0.47–0.85)	1.05 (0.79–1.62)	<0.0001
Apoprotein A1 (g/L)	1.26 (1.14–1.52)	1.18 (1.05–1.30)	<0.001
Apoprotein B (g/L)	0.65 ± 0.17	0.79 ± 0.23	0.001
Fasting glucose (mmol/L)	5.12 ± 0.44	5.37 ± 0.34	0.010
Fasting insulin (pmol/L)	60.4 (44.4–74.3)	135.7 (95.0–193.0)	<0.0001
HOMA-IR	2.0 (1.3–2.5)	4.7 (3.2–6.6)	<0.0001
FGIR	11.2 (9.2–14.3)	4.9 (3.5–7.3)	<0.0001
hs-CRP (mg/L)	0.4 (0.2–0.9)	2.7 (0.8–4.0)	<0.0001
Homocysteine (μmol/L)	6.6 (5.8–7.0)	7.8 (5.9–8.6)	0.024
Folic acid (nmol/L)	17.7 (13.1–24.7)	16.8 (10.6–22.6)	0.060
Uric acid (μmol/L)	190 ± 59	270 ± 62	<0.0001

hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein.

To convert total cholesterol, HDL-C and LDL-C to mg/dL, divide by 0.0259; TG, divide by 0.0113; apoprotein A1 and B, divide by 0.01; glucose, divide by 0.0555; insulin to μU/mL, divide by 6.945; homocysteine to mg/L, divide by 7.397; folic acid to ng/mL, divide by 2.266; uric acid to mg/dL, divide by 59.48.

Values are expressed as mean ± SD or as median (interquartile range) for skewed data.

Taking metabolic risk into account, we subdivided the obese children according to the cutoff point obtained for their mAOPPs values from the ROC curve, with an area under the curve (AUC) of 0.76 (Table 3). At this cutoff point (53.2 μmol/L), the degrees of sensitivity (67%) and specificity (71%) were the highest. Anthropometric measures and the existence of hypertension did not differ between groups. A more atherogenic lipid profile and the presence of insulin resistance were noted in obese children with higher mAOPPs values. Overall, the presence of ≥3 MRFs was more frequently noted in the obese children, which had higher mAOPPs levels. The severely obese children with ≥3 MRFs had a mAOPPs level of 62.7 ± 14.2 μmol/L whereas children with one or two factors had a level of 47.9 ± 14.3 μmol/L (*P* < 0.001).

We did not observe any correlations between mAOPPs and anthropometric measures, BMI z-score, or relative fat mass in obese children. Nevertheless, the level of mAOPPs was positively correlated with TG (*r* = 0.29, *P* = 0.031) and TG/HDL-C index (*r* = 0.35, *P* = 0.009) and negatively correlated with HDL-C (*r* = −0.33, *P* = 0.014). No other correlations with biochemical parameters were noted.

To investigate the independent effect of the MRFs on mAOPPs, a multiple stepwise linear regression analysis was performed on data obtained from obese children. The initial model included BMI z-score, systolic BP z-score, HDL-C, TG, and HOMA-IR as independent variables. In the analysis of the factors influencing mAOPPs levels, only systolic BP z-score and HDL-C yielded a model that was

Table 2 Biomarkers of oxidative stress determined in plasma of control and severely obese children

	Control (<i>n</i> = 44)	Obese (<i>n</i> = 54)	<i>P</i> -value
AOPPs (μmol/L)	53.2 ± 14.5	72.7 ± 16.6	<0.0001
mAOPPs (μmol/L)	44.3 ± 13.9	56.1 ± 15.9	<0.001
TBARS (μmol/L)	21.3 ± 2.6	22.7 ± 3.0	0.028
Malondialdehyde (μmol/L)	0.35 (0.22–0.44)	0.67 (0.31–1.16)	<0.001
8-isoprostaglandin F _{2α} (pg/ml)	27.0 (17.9–34.9)	35.8 (25.0–49.5)	<0.001
Sulfhydryl groups (μmol/L)	428 ± 43	411 ± 37	0.030

TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

Values are expressed as mean ± SD or as median (interquartile range) for skewed data.

Table 3 Metabolic risk factors according to the cutoff point for AOPPs in 54 severely obese children

	AOPPs < 53.2 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 29$)	AOPPs ≥ 53.2 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 25$)	P-value
BMI z-score	4.3 \pm 1.3	3.9 \pm 1.4	0.275
Relative WC (%)	144 \pm 15	145 \pm 19	0.868
WC/height	0.62 \pm 0.05	0.62 \pm 0.07	0.893
Systolic BP z-score	1.01 \pm 1.26	1.66 \pm 0.85	0.033
Diastolic BP z-score	0.64 (0.18–1.19)	0.69 (0.35–1.55)	0.393
Hypertension	12 (41.4)	14 (56.0)	0.284
HDL-C (mmol/L)	1.09 (0.98–1.32)	0.96 (0.88–1.06)	0.009
≤ 1.04	9 (31.0)	16 (64.0)	0.015
TG (mmol/L)	0.87 (0.76–1.03)	1.32 (1.06–1.93)	0.020
≥ 1.24	7 (24.1)	15 (60.0)	0.007
TG/HDL-C	1.83 (1.39–2.50)	3.32 (2.13–5.23)	0.002
≥ 3.5	4 (13.8)	12 (48.0)	0.006
Fasting glucose (mmol/L)	5.36 \pm 0.30	5.39 \pm 0.38	0.738
≥ 5.55	7 (24.1)	7 (28.0)	0.747
Fasting insulin (pmol/L)	135.1 \pm 74.9	171.3 \pm 77.6	0.088
≥ 96.9	16 (55.2)	23 (92)	0.003
HOMA-IR	4.21 (2.50–6.11)	5.07 (3.91–7.58)	0.045
≥ 3.16	18 (62.1)	23 (92.0)	0.010
FGIR	5.55 (3.90–8.44)	4.68 (3.26–5.64)	0.031
≤ 6	15 (51.7)	22 (88.0)	0.004
MRFs ≥ 3	12 (41.4)	18 (72.0)	0.024
MRFs ≥ 4	7 (24.1)	16 (64.0)	0.003

To convert total cholesterol and HDL-C to mg/dL, divide by 0.0259; TG, divide by 0.0113; glucose, divide by 0.0555; insulin to $\mu\text{U/mL}$, divide by 6.945. Values are expressed as mean \pm SD, as median (interquartile range) for skewed data, and as n (percentage) for categorical variables.

weakly predictive; the other variables were excluded ($R^2 = 0.18$, $P = 0.007$).

No correlation was found between mAOPPs and AOPPs levels normalized to the TG values (the AOPPs/TG ratio), but there was a positive correlation between the AOPPs determined by the original and the modified assay ($r = 0.71$, $P < 0.0001$).

Discussion

In this study, we investigated the protein oxidative status in obese children based on the presence of plasma mAOPPs. Previous studies have raised some concerns about the overestimation of AOPPs by the classical spectrophotometric assay [15], which is mainly due to TG-mediated turbidity interference [9,22]. When we included a precipitation step to minimize plasma lipids [9], we observed a marked reduction in AOPPs levels and a diminished correlation with TG. Importantly, our study showed that oxidative alterations of proteins remain evident in obese children when AOPPs are measured in delipidated plasma. Thus, this approach might yield a better estimation of the level of AOPPs by avoiding the confounding effect of endogenous triglycerides. It may also be helpful in the analysis of the real factors that determine increases in AOPPs in childhood obesity and their relation to metabolic risk.

Obesity in children has been related to increased oxidative stress that favors the development of comorbidities [23]. Previous studies have shown that the degree of obesity in childhood is tightly linked to cardiovascular morbidity in adulthood [24]. Adverse cardiovascular outcomes are more likely when several risk factors are

present. In this sense, it is important to emphasize the metabolic risk in our study group. First, we must highlight the severity of obesity with an average BMI z-score of 4.1 ± 1.3 . Nearly 80% of the obese subjects had a BMI z-score >3 and all presented with abdominal obesity (WC percentile >90 th with a WC/height ratio >0.5). Moreover, MRFs such as hypertension, low HDL-C, insulin resistance, elevated markers of inflammation (high-sensitivity C-reactive protein), and homocysteine levels were present in our group of obese children.

Recently, it has been suggested that an evaluation of oxidative status might contribute to the identification of patients with an increased risk of subsequent metabolic and cardiovascular complications [2]. In contrast to oxidized lipids, the impact of oxidized protein has not been extensively studied. Oxidation of proteins at the vascular level leads to dysfunction and altered endothelial structure. AOPPs are oxidized plasma proteins (especially albumin) generated by myeloperoxidase activity that are mainly formed by chlorinated oxidants [15]. They are considered excellent markers of advanced nitrooxidative damage [25]. Increased levels of AOPPs have been described as an independent risk factor for coronary artery disease, which probably results from the localization of AOPPs in the extracellular matrix of atherosclerotic plaques in humans [26].

In agreement with previous data [7,8], we found increases in all of the biomarkers of lipid and protein oxidation included in our study. In addition, reduced levels of protein -SH groups suggest an excess of free radical generation that can lead to an alteration of the albumin conformation via oxidation of -SH groups. This condition is

termed "thiol stress" [27]. The decrease in –SH group levels and the increase in mAOPPs and lipid peroxidation markers reflects an imbalance between ROS production and antioxidant defense that may play a key role in the pathogenesis of comorbidities. Moreover, the observed increases in mAOPPs levels in our study suggest that proteins might be an important oxidative target of accumulation of MRFs in severe childhood obesity.

Clinical studies concerning the problem of protein oxidation in childhood obesity are limited and have yielded conflicting results. Atabek et al. [6] found that AOPPs levels in obese children were significantly higher than those in control children. Although AOPPs levels in subjects with insulin resistance were higher than those in subjects without insulin resistance, there was no significant difference between these groups. Krzystek-Korpaczka et al. [7] also reported higher levels of AOPPs in adolescents with metabolic syndrome, although the risk factors such as HDL-C levels, hypertension, and insulin resistance did not influence AOPPs levels when analyzed separately. In contrast, our data showed that obese children with low HDL-C values and insulin resistance presented higher mAOPPs levels. It is possible that the different age of the children included in the present study (prepubertal) could explain these discrepancies because puberty increases insulin and decreases lipid values [28]. Hyperlipidemia may enhance the *in vivo* process of AOPPs formation through elevation of oxidative stress. In turn, AOPPs may act as proinflammatory mediators [3]. Moreover, it has been demonstrated that AOPPs interfere with plasma clearance of HDL-C, which may antagonize the class B, type I scavenger receptor (SR-BI) and directly elevate cardiovascular risk [29]. This indicates a potential role of AOPPs in the long-term development of complications and supports the usefulness of its determination in the assessment of risk in obese children.

It is also important to mention that the AOPPs were measured by the classic assay without delipidation [15] in studies conducted in children [6–8], and the AOPPs levels may be artificially overestimated due to triglyceride content [9]. In fact, when AOPPs analysis was performed using the values obtained in non-delipidated plasma (data not shown), we also observed a correlation with insulin resistance. Thus, it may be necessary to remove lipids from samples to accurately interpret the results. Recently, the relationship between AOPPs/triglycerides has been proposed as an alternative to the modification of the assay [9]. However, we did not find a significant correlation between mAOPPs and the proposed ratio, which suggests that this ratio cannot serve as an estimate of mAOPPs concentrations.

The main novelty of the present study was the finding that AOPPs measured by the modified assay (mAOPPs) were elevated in obese children, mainly in the individuals with MRFs. In fact, concentrations of mAOPPs in obese children were elevated even more in children with an atherogenic lipid profile and insulin resistance, which confirmed the results of previous studies in adults showing AOPPs to be an independent predictor of risk factors for metabolic syndrome [30]. However, no correlation was found between mAOPPs and anthropometric measures indicative of general or abdominal obesity. These findings contrast with those of

other authors who found a significant correlation with these variables [7]. The differences may be explained by the fact that we only studied severely obese children and had a narrow range of WC values.

Biomarkers of lipid peroxidation were also elevated in severely obese children. In agreement with other studies [25], however, we found that mAOPPs concentrations did not correlate with markers of lipid peroxidation. In fact, several mechanisms can be responsible for the oxidation of different classes of macromolecules.

In conclusion, we suggest that pediatricians should strive to assess the extent of oxidative stress in obese children and focus on mitigation of this condition at the earliest possible stage to prevent the development of comorbidities. Determination of plasma mAOPPs levels is an easy method that can evaluate protein oxidation and provide information related to metabolic risk and treatment effectiveness [7]. These features could lend utility to this technique as a marker for clinical practice.

Acknowledgements

This research was supported by grant 945/2008 from EVES (Escuela Valenciana de Estudios de la Salud), Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, and by CSD 2007-00063 Research Activity Programme (CONSOLIDER-INGENIO), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

References

- [1] Codoner-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, Del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V. Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes* 2010;5:56–63. doi:10.1080/17477160903055945.
- [2] Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;20:72–7. doi:10.1016/j.numecd.2009.06.002.
- [3] Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, Nagai R, Zhang WR, Liu ZQ, et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1156–62. doi:10.1161/01.ATV.0000214960.85469.68.
- [4] Krzystek-Korpaczka M, Salmonowicz B, Boehm D, Berdowska I, Zielinski B, Patryn E, et al. Diagnostic potential of oxidative stress markers in children and adolescents with type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2008;41:48–55. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.10.003.
- [5] Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2009;43:508–11. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.11.011.
- [6] 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. doi:10.1007/s00431-006-0165-5.
- [7] Krzystek-Korpaczka M, Patryn E, Boehm D, Berdowska I, Zielinski B, Noczynska A. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem* 2008;41:943–9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.04.024.
- [8] Sebeková K, Somoza V, Jarcusková M, Heidland A, Podracká L. Plasma advanced glycation end products are decreased in obese children compared with lean controls. *Int J Pediatr Obes* 2009;4:112–8. doi:10.1080/17477160802248039.

- [9] Anderstam B, Ann-Christin B-H, Valli A, Stenvinkel P, Lindholm B, Suliman ME. Modification of the oxidative stress biomarker AOPP assay: application in uremic samples. *Clin Chim Acta* 2008;393:114–8. doi:10.1016/j.cca.2008.03.029.
- [10] Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, Ferrández Longás A, López-Siguero JP, Sánchez González E, et al. Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)* 2008;68:552–69.
- [11] McCarthy HD, Cole TJ, Fry T, Jebb SA, Prentice AM. Body fat reference curves for children. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:598–602. doi:10.1038/sj.ijo.0803232.
- [12] Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004;145:439–44. doi:10.1016/j.peds.2004.06.044.
- [13] National high blood pressure education program working group on high blood pressure in children and adolescent. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* 2004;114:555–76. doi:10.1542/peds.114.2.S2.555.
- [14] Matteucci E, Biasci E, Giampietro O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetol* 2001;38:187–9. doi:10.1007/s592-001-8077-3.
- [15] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304–13. doi:10.1038/ki.1996.186.
- [16] Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach Jr CN, Sunderman Jr FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thio-barbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987;33:214–20.
- [17] Santos MT, Valles J, Aznar J, Vilches J. Determination of plasma malondialdehyde-like material and its clinical application in stroke patients. *J Clin Pathol* 1980;33:973–6. doi:10.1136/jcp.33.10.973.
- [18] Alonso E, Cervera J, García-España A, Bendala E, Rubio V. Oxidative inactivation of carbamoyl phosphate synthetase (ammonia). Mechanism and sites of oxidation, degradation of the oxidized enzyme, and inactivation by glycerol, EDTA, and thiol protecting agents. *J Biol Chem* 1992;267:4524–32.
- [19] Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007;8:299–306. doi:10.1111/j.1399-5448.2007.00271.x.
- [20] Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 2005;115:e500–3. doi:10.1542/peds.2004-1921.
- [21] Giannini C, de Giorgis T, Scarinci A, Ciampani M, Marcovecchio ML, Chiarelli F, et al. Obese related effects of inflammatory markers and insulin resistance on increased carotid intima media thickness in pre-pubertal children. *Atherosclerosis* 2008;197:448–56. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.06.023.
- [22] Valli A, Suliman ME, Meert N, Vanholder R, Lindholm B, Stenvinkel P, et al. Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to presence of triglycerides and other endogenous factors. *Clin Chim Acta* 2007;379:87–94. doi:10.1016/j.cca.2006.12.026.
- [23] Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med* 2010;362:485–93.
- [24] Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, et al. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res* 2004;64:172–8. doi:10.1016/j.cardiores.2004.06.020.
- [25] Meaney E, Vela A, Samaniego V, Meaney A, Asbun J, Zempoalteca JC, et al. Metformin, arterial function, intima-media thickness and nitrooxidation in metabolic syndrome: the Mefisto Study. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:895–903. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04920.x.
- [26] Woods AA, Linton SM, Davies MJ. Detection of HOCl-mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques. *Biochem J* 2003;370:729–35. doi:10.1042/BJ20021710.
- [27] Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:188–92. doi:10.1016/j.diabres.2006.12.007.
- [28] Goodman E, Daniels SR, Meigs JB, Dolan LM. Instability in the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents. *Circulation* 2007;115:2316–22. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.669994.
- [29] Marsche G, Frank S, Hrzenjak A, Holzer M, Dirnberger S, Wadsack C, et al. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ Res* 2009;104:750–7. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.193169.
- [30] Sebeková K, Boor P, Valachovicová M, Blazíček P, Parrák V, Babinská K, et al. Association of metabolic syndrome risk factors with selected markers of oxidative status and micro-inflammation in healthy omnivores and vegetarians. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:858–68. doi:10.1002/mnfr.200500170.

Vitamin D Status is Linked to Biomarkers of Oxidative Stress, Inflammation, and Endothelial Activation in Obese Children

Pilar Codoñer-Franch, MD, PhD^{1,2}, Sandra Tavárez-Alonso, MSc³, Raquel Simó-Jordá, MD¹, Paz Laporta-Martín, MD, PhD⁴, Arturo Carratalá-Calvo, MD, PhD⁴, and Eulalia Alonso-Iglesias, PhD³

Objective To examine vitamin D, parathyroid hormone, and serum calcium-phosphorus levels relationships to biomarkers of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and endothelial activation, potential contributors for vascular complications in obese children.

Study design Cross-sectional clinical study of 66 obese Caucasian children aged 7 to 14 years. Cardiovascular risk factors were assessed. Malondialdehyde and myeloperoxidase as measures of oxidative stress, and plasma nitrite+nitrate, urinary nitrate, and 3-nitrotyrosine as markers of nitrosative stress were measured. Adipocytokines, inflammatory molecules (high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α), endothelial activation molecules (soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1 [sVCAM-1]), E-selectin, and vascular endothelial growth factor were also investigated. Serum 25-hydroxy-cholecalciferol [25(OH)D], intact parathormone, and calcium-phosphorus levels were determined in these children and in a comparison group of 39 non-obese children.

Results Obese children had a significantly lower 25(OH)D level ($P = .002$) and a higher intact parathormone ($P = .011$) than non-obese children. Phosphorus and the calcium-phosphorus product were also significantly higher ($P < .0001$). Insufficient serum concentrations of 25(OH)D (<20 ng/mL) were detected in 5% of normal children and in 30% of the obese children. In the obese children with vitamin D insufficiency, malondialdehyde, myeloperoxidase, 3-nitrotyrosine, interleukin-6, and sVCAM-1 were substantially elevated. A partial correlation analysis showed an inverse relationship of 25(OH)D levels with 3-nitrotyrosine ($r = -0.424$, $P = .001$), and sVCAM-1 ($r = -0.272$, $P = .032$).

Conclusions Insufficient 25(OH)D levels were detected in severely obese children with increased markers of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and endothelial activation. (*J Pediatr* 2012;161:848-54).

Vitamin D deficiency is associated with increased risk of a wide range of human disorders, including cardiovascular disease.¹ Furthermore, low vitamin D status has been frequently reported in obesity (in both adults and in children),^{2,3} a condition tightly linked to cardiometabolic risk. Previous studies in children have shown mixed results about the relationship of vitamin D deficiency and traditional risk factors for cardiovascular disease in children either associated or independently of obesity.^{4,5} The mechanism by which vitamin D deficiency affects cardiovascular health remains unclear, mainly because it is accompanied by changes in parathyroid hormone (PTH) and calcium and phosphorus levels, which can contribute to vascular complications even when they occur within a normal range.⁶

Vitamin D can also have a role in inflammation status through diverse effects on inflammatory cells.⁷ The coexistence of obesity and a low-grade inflammatory state is accepted. In addition, oxidative stress is recognized as an important feature in obesity linked to the development of adverse metabolic effects, causing dysregulation of adipokines and inflammation.⁸ All these factors can contribute to the onset of endothelial dysfunction, an early phase of atherosclerosis. The progress of lesions involves intima and medial calcification and the proliferation of vascular smooth muscle cells, which leads to plaque formation. Although these arterial complications are usually the consequence of aging, they have also been observed in young subjects in association with dysregulation of calcium homeostasis.⁹ Moreover, carotid calcifications have been found in obese children and adolescents related to PTH elevations even within a normal range, suggesting that a subclinical imbalance in calcium-phosphorus homeostasis may be involved.¹⁰

The major circulating form of vitamin D, synthesized by hydroxylation in the liver, is 25-hydroxy-cholecalciferol [25(OH)D], which is commonly used to assess vitamin D status. The renal production of the active form,

25(OH)D	25-hydroxy-cholecalciferol
HDL	High-density lipoprotein
iPTH	Intact parathyroid hormone
PTH	Parathyroid hormone
BMI	Body mass index
sVCAM-1	Soluble vascular cell adhesion molecule 1

From the ¹Department of Pediatrics, Dr Peset University Hospital; ²Department of Pediatrics, Obstetrics, and Gynecology, ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Valencia; and ⁴Laboratory of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology, Clinical University Hospital, Valencia, Spain

Supported by Conselleria de Sanitat (grant AP-199/11), Generalitat Valenciana, and Research Activity Program (CONSOLIDER-INGENIO; CSD 2007-00063), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. The authors declare no conflicts of interest.

0022-3476/\$ - see front matter. Copyright © 2012 Mosby Inc. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.04.046>

1,25-dihydroxycholecalciferol, is tightly regulated by serum phosphorus and PTH levels. Thus, evaluation of the vitamin D status should take into account the changes in PTH, calcium, and phosphorus levels.

The overall aim of the present study is to test the hypothesis that suboptimal levels of 25(OH)D are related to increased cardiovascular risk in obese children. Our specific objectives were (1) to investigate 25(OH)D and PTH status as well as serum calcium and phosphorus levels in relation to severe obesity; and (2) to examine their association with selected biomarkers of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and endothelial activation molecules that can be linked to atherosclerosis.

Methods

We recruited a group of severely obese, Caucasian children ($n = 66$; 37 boys) between 7 and 14 years of age who met the inclusion criteria of primary obesity. They were referred by their primary care pediatrician to the outpatient Pediatric Nutrition Unit of Dr Peset University Hospital for study and treatment between October 2009 and March 2010. The assessment of obesity was based on the International Obesity Task Force definition, and the extent of obesity was quantified using Cole's least mean square method, which normalizes the skewed body mass index distribution. The SDS-body mass index (BMI) was used in the analyses; all subjects selected were characterized as obese (SDS-BMI ≥ 2), and half were considered extremely obese (SDS-BMI > 4). Children with secondary obesity syndromes were excluded. None of the children had an acute infectious illness or were taking vitamin supplements. In addition, a control group of 39 healthy children with normal BMI was studied. Study subjects live on the Spanish Mediterranean coast at latitude of 39° 28' 48" N, in a region with 2660 hours of sun per year. Lifestyle data were obtained in all participants. None of the children were enrolled in any weight control program addressing diet or physical activity. Dietary data were collected by a nutritionist, and energy and nutrient intake were calculated using the nutritional database Alimentación y Salud, Bi-TASDE (General Médica Farmacéutica, Granada, Spain), which is based on the composition of Spanish food. Physical activity was estimated by a validated questionnaire completed by the parents. The study was approved by the hospital ethics committee. All parents gave informed written consent, and oral assent was obtained from the children. Anthropometry, including weight, height, and waist circumference, was performed in light indoor clothing after removal of shoes. Body composition was determined by a bioelectrical impedance instrument with 8-contact electrodes (BC-418MA; Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands). The fat mass percentage and waist circumference were converted to normalized measurements compared with the 50th standard percentile for age and sex^{11,12} (relative fat mass and relative waist circumference). Sexual maturation was assessed during physical examination by one of us (R.S.-J.) according to Marshall and Tanner's criteria.¹³ Resting blood pressure was mea-

sured with a Dinamp 200 (GE Medical Systems Information Technologies, Inc, Milwaukee, Wisconsin); an average of 3 measurements were used.

Blood samples were obtained after a 12-hour fast and then immediately centrifuged and aliquoted. Urinary nitrate was determined by analyzing urine samples obtained 2 hours after full bladder evacuation. Biochemical blood measures (glucose, lipid profile, apoproteins A1 and B, uric acid, creatinine, calcium, and phosphorus) were measured by automated techniques (Aeroset System; Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Germany), and insulin levels were analyzed by an automated electrochemiluminescence immunoassay (Architect c8000; Abbott Clinical Chemistry). High-sensitivity C-reactive protein was measured by kinetic nephelometry (Image Nephelometer; Beckman Coulter Inc, Brea, California). Insulin resistance was determined by the homeostasis model assessment for insulin resistance, which was calculated as fasting insulin levels (IU/L) \times fasting glucose (mmol/L)/22.5. The estimated glomerular filtration rate was assessed by measuring serum creatinine levels using the Léger formula [ie, estimated glomerular filtration rate (mL/min) = $[56.7 \times \text{body weight (kg)} + 0.142 \times \text{height}^2 \text{ (cm)}] / \text{creatinine } (\mu\text{M})$] and corrected to body surface $\times 1.73 \text{ m}^2$. The serum levels of 25(OH)D and intact PTH (iPTH) were quantified by electrochemiluminescence immunoassays in a Modular Analytics E170 (reagents and automatic analyzer were from Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Determinations were made at the Clinical Biochemistry and Molecular Pathology Laboratory of Clinical University Hospital of Valencia, Spain. For vitamin D, the quantitative Elecsys vitamin D total assay was used. Calibration was done with the vitamin D total CalSet. The interassay precision (coefficient of variation) using manufacturer's quality control samples (PeciControl Bone; Elecsys Systems, Roche Diagnostics GmbH) was between 11.4% and 8.7%. Vitamin D status was classified according to the level of 25(OH)D as vitamin D sufficient ($>20 \text{ ng/mL}$) or insufficient ($<20 \text{ ng/mL}$).¹⁴ Plasma levels of malondialdehyde were determined by spectrophotometric quantification of diethyl thiobarbituric acid adduct at 532 nm after a reverse-phase isocratic high-performance liquid chromatography separation of the complex.¹⁵ Myeloperoxidase levels were determined immunoenzymatically by the Quantikine Human Myeloperoxidase Immunoassay # DMYEOO (R&D Systems Europe, Abingdon, United Kingdom). Nitrate levels in plasma and urine were measured spectrophotometrically using the Griess reaction, following the conversion of nitrate to nitrite with nitrate reductase from *Aspergillus* spp. Conditions were based on those described by Moshage et al.¹⁶ Plasma 3-nitrotyrosine was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay as described by Ceriello et al¹⁷ using a commercially available kit (HK501; Hycult Biotech BV, Uden, The Netherlands). Manufacturer methodology was followed to carry out a multiplex immunoassay with MILLIPLX Map Human Kits (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts) in order to measure interleukin 6, leptin, and tumor necrosis factor- α (Human Serum Adipokine Panel B, # HADK2-61K-B);

adiponectin, soluble E-selectin, soluble intercellular adhesion molecule 1, and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) (Human Cardiovascular Disease Panel 1, # HCVD-67AK); and vascular endothelial growth factor (Human Cardiovascular Disease Panel 3, # HCVD3-67CK) (Millipore Corporation). The plates were read in a cytometer Luminex 100TM IS Analyzer (Luminex Corp, Austin, Texas).

Statistical Analysis

Data are given as proportions, mean with SD or median with IQR for skewed data that were log transformed before analysis. Differences between the groups were analyzed using a χ^2 test for categorical data and a Student t-test for continuous data normalized by age and sex (SDS-BMI, weight, height, waist circumference, and fat mass). The rest of the quantitative variables were evaluated by an ANCOVA test adjusted for sex, age, and Tanner stage. A Pearson's partial correlation analysis, which was corrected for sex, age, Tanner stage, and SDS-BMI, was used to assess associations between variables in obese children.

Results

The mean 25(OH)D level was significantly lower in obese children than in children with normal BMI. Conversely, iPTH values were higher in the obese group. Both serum phosphorus and calcium levels were within the normal ranges for both groups of children, but phosphorus and the calcium-phosphorus product were significantly increased in obese children (Table I). The obese children were categorized into 2 groups based on their SDS-BMI: those with an SDS-BMI between 2 and 4 ($n = 33$) and those with an SDS-BMI >4 ($n = 33$), who were considered extremely obese. Vitamin D status, iPTH levels, and serum calcium

and phosphorus concentrations in normal BMI children and in the 2 groups of obese children are shown in the Figure. In the extremely obese group, 25(OH)D levels were significantly lower and iPTH levels were significantly higher than in the group with normal BMI. The serum phosphorus levels were higher in the 2 obese groups than in the normal group, but the calcium levels did not differ.

In the obese group, 30% of the subjects ($n = 20$) had serum 25(OH)D concentrations <20 ng/mL (vitamin D insufficiency), and the remaining 70% ($n = 46$) had 25(OH)D levels ≥ 20 ng/mL (vitamin D sufficiency). No children in the "severely deficient range" (<5 ng/mL) were detected in our study. Only 5% of control children were vitamin D insufficient.

Subsequent analysis was performed only in obese children to assess the relationships between vitamin D status and cardiovascular risk factors. The clinical and anthropometric characteristics of obese children were not significantly different when stratified by the 25(OH)D status. Glomerular filtration rate was suggestive of slight hyperfiltration. Blood pressure values were similar in both groups. Physical activity, energy, and nutrient intake did not differ between groups. However, the group with vitamin D insufficiency had higher values of iPTH and lower concentrations of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and apoprotein A1 compared with the children with vitamin D sufficiency. Other individual metabolic risk factors did not differ between sufficient or insufficient vitamin D status (Table II).

Measures of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and endothelial damage in obese children are shown in Table III. Markers of oxidative stress, malondialdehyde, myeloperoxidase, and 3-nitrotyrosine, along with levels of interleukin 6 and sVCAM-1, were significantly increased in the group with 25(OH)D values <20 ng/mL.

A partial correlation analysis, which was corrected by sex, age, pubertal status, and SDS-BMI, was carried out among the obese children. An inverse relationship of 25(OH)D with 3-nitrotyrosine ($r = -0.424$, $P = .001$) and with sVCAM-1 ($r = -0.272$, $P = .032$) was found. The serum calcium levels were positively associated with tumor necrosis factor- α ($r = 0.279$, $P = .028$). The serum phosphorus concentrations were correlated to levels of plasma nitrite+nitrate ($r = 0.293$, $P = .021$), and an inverse correlation was found for the high-sensitivity C-reactive protein ($r = -0.317$, $P = .012$). There was no significant association of 25(OH)D levels or calcium and phosphorus concentrations with other measures of oxidative/nitrosative stress, inflammation, adipocytokines, or adhesion molecules.

Table I. Clinical and biochemical data for the 66 obese children and 39 normal children who participated in the study

	Obese (n = 66)	Normal BMI (n = 39)	P value
Sex (boys)	41	19	.180*
Age (y)	12 (9-13)	11 (8-13)	.208†
Tanner stage	2.2 (0.8)	2.0 (0.9)	.326†
Energy intake (kcal/d)	1937 (517)	1880 (371)	.500‡
Vitamin D intake (μ g/d)	5.2 (1.4)	5.0 (1.5)	.227‡
Calcium intake (mg/d)	794 (177)	787 (185)	.854‡
BMI (kg/m^2)	29.4 (26.8-33.5)	17.7 (16.1-19.9)	$<.0001^\ddagger$
SDS-BMI	3.9 (2.9-5.1)	-0.4 (-1-0.5)	$<.0001^\ddagger$
25(OH)D (ng/mL)	24.3 (7.7)	30.0 (8.0)	.002‡
iPTH (pg/mL)	29.6 (25.6-39.4)	28.3 (21.1-32.5)	.011‡
iPTH/25(OH)D (pg/ng)	1.32 (0.97-1.84)	0.88 (0.71-1.34)	.001‡
Calcium (mg/dL)	9.8 (0.5)	10.0 (0.4)	.223‡
Phosphorus (mg/dL)	4.9 (0.6)	4.3 (0.5)	$<.0001^\ddagger$
Calcium \times phosphorus (mg^2/dL^2)	48.7 (6.0)	42.5 (5.9)	$<.0001^\ddagger$

Values are expressed as the means (SD) or as medians (IQR) for skewed data.

*By a χ^2 test.

†By a Student t test.

‡By an ANCOVA that was adjusted for sex, age, and Tanner stage.

Discussion

A number of recent studies have revealed a high prevalence of vitamin D insufficiency in children and adolescents in different parts of the world,^{18,19} and several studies have shown its relationship to excess body weight.^{20,21} However, data on vitamin D status and cardiometabolic risk factors either in normal or obese children are still controversial.^{5,22} The

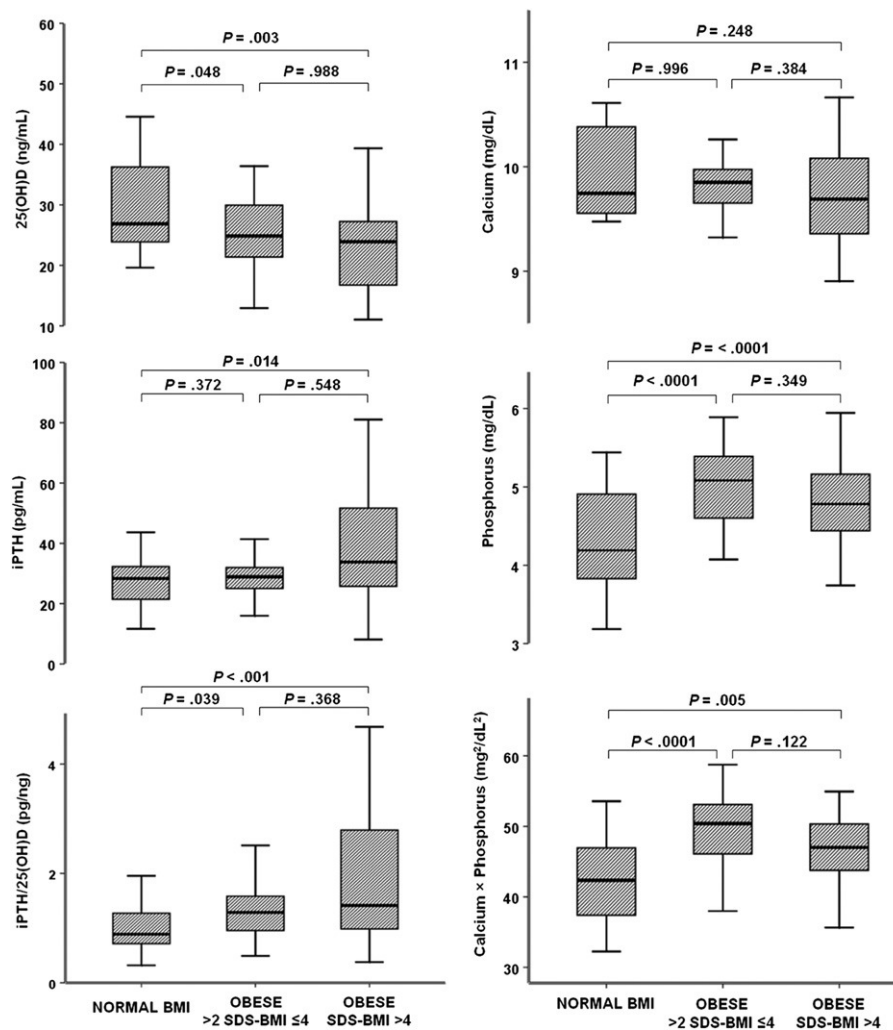


Figure. Serum levels of 25(OH)D, iPTH, 25(OH)D/iPTH ratio, calcium, phosphorus, and the calcium × phosphorus, in children with normal BMI ($n = 39$), obese children with $2 < \text{SDS-BMI} \leq 4$ ($n = 33$), and extremely obese children with $\text{SDS-BMI} > 4$ ($n = 33$). Data are shown as medians and IQRs.

most significant and novel finding of the present study is that insufficient 25(OH)D levels were detected in severely obese children with increased markers of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and endothelial activation, all associated with comorbidity pathogenesis.

In our study, there was an overall sufficiency of 25(OH)D, which may reflect environmental factors. Skin exposure to sunlight, the predominant source of vitamin D through ultraviolet B radiation, is considerable in our region even after accounting for protective measures. Thus, our findings may not be applicable to children residing in other countries, different climates, or in regions with different air pollution levels.

The lowest values of 25(OH)D were found in children with extreme obesity ($\text{SDS-BMI} > 4$), suggesting that obesity status is associated with a lower availability of the fat-soluble 25(OH)D because of its sequestration into excess fat tissue. The serum levels of 25(OH)D in children appear to be related to the amount of visceral fat, which has a greater metabolic

activity and is associated with the development of comorbidities.²² In our study, the HDL-cholesterol and apoprotein A1 levels were low in children with 25(OH)D levels < 20 ng/mL, indicating an unfavorable pattern of circulating lipids that increases metabolic risk. In this sense, there is accumulating evidence that 25(OH)D levels can influence the development and progression of atherosclerosis²³; however, most existing studies focus on adults with advanced lesions. In our study, the children with insufficient values of 25(OH)D show a significant increase in both malondialdehyde plasma levels (an end marker of lipoperoxidation) and myeloperoxidase activity (a major constituent of artery wall macrophages). Both have been associated with the initiation and propagation of reactive species that represent attractive targets for inflammatory cells. In addition, myeloperoxidase is involved in rendering HDL dysfunctional,²⁴ mainly by enriching 3-nitrotyrosine and 3-chlorotyrosine in apoprotein A1. Furthermore, we found a significant correlation between

Table II. Clinical and biochemical data for the 66 obese children stratified according to the 25(OH)D values

	25(OH)D <20 ng/mL (n = 20)	25(OH)D ≥20 ng/mL (n = 46)	P value
Sex (boys)	14	27	.384*
Age (y)	12 (10-13)	11 (8-13)	.206†
Tanner stage	2.3 (0.8)	2.2 (0.9)	.435†
SDS-BMI	4.5 (3.2-5.3)	3.8 (2.9-5.0)	.351†
Relative fat mass (%)	210 (30)	196 (46)	.225†
Relative waist circumference (%)	148 (16)	143 (17)	.285†
SDS systolic blood pressure	1.15 (1.1)	1.2 (1.1)	.762†
SDS diastolic blood pressure	0.73 (0.43-1.55)	0.53 (0.17-1.21)	.201†
eGFR (mL per min per 1.73 m ²)	125 (19)	127 (21)	.643‡
Energy intake (kcal/d)	1964 (460)	1913 (544)	.638‡
Vitamin D intake (μg/d)	5.0 (1.6)	5.2 (1.3)	.488‡
Calcium intake (mg/d)	816 (189)	784 (176)	.556‡
Total cholesterol (mg/dL)	162 (37)	174 (33)	.279‡
HDL-cholesterol (mg/dL)	35 (31-43)	44 (38-51)	.004‡
Triglycerides (mg/dL)	94 (62-157)	83 (66-119)	.779‡
Apoprotein A1 (mg/dL)	103 (93-124)	121 (111-139)	.009‡
Apoprotein B (mg/dL)	74 (25)	81 (22)	.300‡
Uric acid (mg/dL)	4.4 (0.9)	4.5 (1.1)	.112‡
HOMA-IR	3.9 (2.8-7.01)	4.2 (2.8-6.2)	.978‡
25(OH)D (ng/mL)	15.7 (3.0)	28.0 (5.5)	<.0001‡
iPTH (pg/mL)	39 (26-52)	29 (26-36)	.007‡
Calcium (mg/dL)	9.7 (9.4-10.0)	9.8 (9.5-10.2)	.091‡
Phosphorus (mg/dL)	5.0 (0.5)	4.9 (0.5)	.698‡

eGFR, estimated glomerular filtration rate; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance. Values are expressed as the means (SD) or as medians (IQR) for skewed data.

*By a χ^2 test.

†By a Student *t* test.

‡By an ANCOVA that was adjusted for sex, age, and Tanner stage.

25(OH)D values and 3-nitrotyrosine levels. This modified tyrosine residue is a product of protein nitration, which is a reliable and stable marker of nitrosative stress related to inflammatory reactions that occur during atherosclerosis.²⁵ Finally, insufficient levels of 25(OH)D were found in children with higher levels of the pro-inflammatory cytokine interleukin 6. These novel findings suggest a link between 25(OH)D insufficiency and potential pathogenic factors involved in the initiation and development of atherogenic damage and other comorbid associations in obesity.

Notably, sVCAM-1 increases in obese children with 25(OH)D insufficiency. This soluble adhesion molecule is

a specific marker for endothelial dysfunction associated with ongoing stages of atherosclerosis. Moreover, a study carried out in older patients showed high levels of sVCAM-1 associated with calcified aortic stenosis.²⁶ Although a variety of risk factors are associated with vascular calcification, abnormalities in mineral metabolism such as elevated levels of serum phosphorus,²⁷ calcium-phosphorus product, and iPTH¹⁰ undoubtedly play a critical role. Thus, the main factor affecting atherosclerotic risk may not be the low vitamin D status but rather a disturbance in calcium-phosphorus homeostasis.

Our study also showed higher levels of serum phosphorus and calcium phosphorus product in obese children. A higher

Table III. Adipocytokines, markers of oxidative/nitrosative stress, inflammation, and endothelial activation molecules for the 66 obese children stratified according to the 25(OH)D values

	25(OH)D <20 ng/mL (n = 20)	25(OH)D ≥20 ng/mL (n = 46)	P value*
Adiponectin (μg/mL)	0.52 (0.04)	0.51 (0.05)	.526
Leptin (ng/mL)	132 (50)	133 (46)	.583
Malondialdehyde (μmol/L)	0.91 (0.71-1.22)	0.40 (0.22-1.13)	.015
Myeloperoxidase (ng/mL ¹)	60 (40-85)	41 (26-68)	.027
Urinary nitrate (μmol/mmol creatinine)	94 (61-101)	97 (65-128)	.681
Nitrite+nitrate (μmol/L)	32.3 (28.2-36.6)	31.5 (27.5-38.8)	.958
3-nitrotyrosine (μmol/L)	0.65 (0.37-0.99)	0.42 (0.25-0.57)	.037
hs-CRP (mg/L)	2.24 (0.8-5.8)	3.0 (1.1-4.3)	.667
Interleukin 6 (pg/mL)	18.0 (12.2-25.7)	13.7 (10.7-19.3)	.036
Tumor necrosis factor-α (pg/mL)	36.1 (12.5)	33.9 (11.3)	.409
sICAM (ng/mL)	118 (85-150)	98 (69-147)	.983
sVCAM-1 (ng/mL)	412 (52)	372 (60)	.040
Soluble E-selectin (ng/mL)	14.3 (6.2-30.0)	21.5 (10.5-33.2)	.275
VEGF (pg/mL)	72 (42-149)	84 (58-166)	.142

hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule-1; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Values are expressed as the means (SD) or as medians (IQR) for skewed data.

*By an ANCOVA that was adjusted for sex, age, and Tanner stage.

phosphorus intake in obese children may stem from nutritional habits, such as dark (cola) beverages that use phosphorus as a preservative, and can be underestimated in the daily dietary record. Physiologically, phosphorus excretion is highly dependent on kidney function. Alternatively, incipient renal damage in the obese children studied could also explain the related increase in phosphorus values observed, in contrast with other studies carried out in children.²⁸

Higher iPTH values in obese children in our study may be due to a response to the decreased values of 25(OH). In turn, the PTH action can promote bone turnover and bone loss. The link between skeletal demineralization and vascular calcification with increased cardiovascular mortality has been largely established in patients with chronic kidney disease.⁹ Indeed, an association between metabolic risk factors and diminished bone mass in obese adolescents has been demonstrated.²⁹ In this sense, our findings suggest that the oxidative stress and inflammation can provide a link between obesity, bone metabolism, and cardiovascular risk.

There are limits to this study. Association does not imply causality, and our sample is small. However, the population is very homogeneous and bias was avoided by adjusting for age, sex, and Tanner stage. On the other hand, our findings could have important prognostic and therapeutic clinical implications. Novel biomarkers such as serum 25(OH)D can be added to evaluate obese children, and supplementation can be proposed with respect to improving their vascular health. Furthermore, intestinal by-pass is increasingly being considered for treatment of morbidly obese adolescents.³⁰ However, this situation can worsen endothelial dysfunction and accelerate the progression of atherosclerotic lesions and other comorbidities by decreasing intestinal calcium and vitamin D uptake. Hence, vitamin D repletion could be necessary before bariatric surgery. ■

Submitted for publication Jan 18, 2012; last revision received Mar 12, 2012; accepted Apr 23, 2012.

Reprint requests: Pilar Codoñer-Franch, MD, PhD, Department of Pediatrics, Dr Peset University Hospital, Avenida Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain. E-mail: pilar.codoner@uv.es

References

- Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011; 86:50-60.
- Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:387-96.
- Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M. Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism* 2008;57:183-91.
- Pacifico L, Anania C, Osborn JF, Ferraro F, Bonci E, Olivero E, et al. Low 25(OH)D3 levels are associated with total adiposity, metabolic syndrome, and hypertension in Caucasian children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 2011;165:603-11.
- Sacheck J, Goodman E, Chui K, Chomitz V, Must A, Economos C. Vitamin D deficiency, adiposity, and cardiometabolic risk in urban schoolchildren. *J Pediatr* 2011;159:945-50.
- Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB Sr, Gaziano JM, et al. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med* 2007;167:879-85.
- Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine* 2010;77: 552-7.
- Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 2011;158:369-84.
- Lilien MR, Groothoff JW. Cardiovascular disease in children with CKD or ESRD. *Nat Rev Nephrol* 2009;5:229-35.
- Gilardini L, Pasqualinotto L, Di Matteo S, Caffetto K, Croci M, Girola A, et al. Factors associated with early atherosclerosis and arterial calcifications in young subjects with a benign phenotype of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:1684-9.
- Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004;145:439-44.
- McCarthy HD, Cole TJ, Fry T, Jebb SA, Prentice AM. Body fat reference curves for children. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:598-602.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;44:291-303.
- Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M, Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008; 122:398-417.
- Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827:76-82.
- Moshage H. Simple and reliable measurement of nitric oxide metabolites in plasma. *Clin Chem* 2009;55:1881-2.
- Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001;44:834-8.
- Houghton LA, Szymlek-Gay EA, Gray AR, Ferguson EL, Deng X, Heath AL. Predictors of vitamin D status and its association with parathyroid hormone in young New Zealand children. *Am J Clin Nutr* 2010; 92:69-76.
- Hill TR, Cotter AA, Mitchell S, Boreham CA, Dubitzky W, Murray L, et al. Vitamin D status and its determinants in adolescents from the Northern Ireland Young Hearts 2000 cohort. *Br J Nutr* 2008;99:1061-7.
- Rodríguez-Rodríguez E, Navia-Lombán B, López-Sobaler AM, Ortega RM. Associations between abdominal fat and body mass index on vitamin D status in a group of Spanish schoolchildren. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:461-7.
- Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg FA, Aksnes L, Moan J. Vitamin D status in Norwegian children and adolescents with excess body weight. *Pediatr Diabetes* 2011;12:120-6.
- Reis JP, von Mühlen D, Miller ER III, Michos ED, Appel LJ. Vitamin D status and cardiometabolic risk factors in the United States adolescent population. *Pediatrics* 2009;124:371-9.
- Reis JP, von Mühlen D, Michos ED, Miller ER III, Appel LJ, Araneta MR, et al. Serum vitamin D, parathyroid hormone levels, and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009;207:585-90.
- Heinecke JW. The role of myeloperoxidase in HDL oxidation and atherogenesis. *Curr Atheroscler Rep* 2007;9:249-51.
- Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Megías-Vericat J, Tortajada-Girbés M, Alonso-Iglesias E. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* 2011;215:475-80.
- Linhartova K, Sterbakova G, Racek J, Cerbak R, Porazikova K, Rokyta R. Linking soluble vascular adhesion molecule-1 level to calcific aortic stenosis in patients with coronary artery disease. *Exp Clin Cardiol* 2009;14:e80-3.

27. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA. Serum phosphorus levels associated with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:397-404.
28. Celik N, Andiran N. The relationship between serum phosphate levels with childhood obesity and insulin resistance. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2011;24:81-3.
29. Pollock NK, Bernard PJ, Gutin B, Davis CL, Zhu H, Dong Y. Adolescent obesity, bone mass, and cardiometabolic risk factors. *J Pediatr* 2011;158:727-34.
30. Lenders CM, Wright JA, Apovian CM, Hess DT, Shukla RR, Adams WG, et al. Weight loss surgery eligibility according to various BMI criteria among adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:150-5.

50 Years Ago in *THE JOURNAL OF PEDIATRICS*

Acute Renal Failure in Infancy and Childhood

Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharzu J, Mendilaharzu F, Rutty A. *J Pediatr* 1962;61:660-78

The contemporary reader, who is accustomed to the “least publishable unit” style of medical writing, will find this report from the Hospital de Niños de Buenos Aires in Argentina refreshing. This fascinating and important paper contains a wealth of information, much of it very new in the early 1960s.

First of all, the manuscript provides epidemiologic data on 41 children with acute renal failure seen in a single center over about 5 years. The diagnoses are similar to those that would be expected today, with the notable exception of the frequent “acute kidney injury” seen today in the context of multisystem organ failure.

Secondly, this provides one of the first reports of a series of children treated with renal replacement therapy: 6 with peritoneal dialysis and 2 with hemodialysis. Both technologies were just coming into use in the mid-20th century, and this is one of the first detailed descriptions of the techniques in children.

The study provides much information regarding the supportive care of children with renal failure. For example, this is one of the first series articles of children with detailed information on the use of cation exchange resins for hyperkalemia.

Most importantly, however, this is one of the first large, English language reports of childhood hemolytic uremic syndrome, the diagnosis in 28 of the 41 patients. The study competently recognized the frequent diarrheal prodrome and the “mini-epidemics” in which the disease occurred. This observation presaged by over 20 years the first reports of toxin-producing *E coli* as the major cause of hemolytic uremic syndrome. The authors effectively describe the usual time course of recovery of hemoglobin and platelet counts in hemolytic uremic syndrome. They even recognized an “outlier,” a child in whom recurrent bouts of hemolysis occurred until death. Today, we would suspect an abnormality of a complement regulatory protein in this child, and might entertain the use of a biological agent to block the terminal complement pathway.

In 2012, it is likely that some authors would have reported this information in 2 or more papers. Reading this comprehensive study, however, one realizes how much better it is for the reader to have such data available in a single, comprehensive report.

Thomas R. Welch, MD
Department of Pediatrics
Upstate Medical University
Syracuse, New York

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.045>



Plasma resistin levels are associated with homocysteine, endothelial activation, and nitrosative stress in obese youths

Pilar Codoñer-Franch^{a,b,*}, Sandra Tavárez-Alonso^c, Manuel Porcar-Almela^a, María Navarro-Solera^a, Ángela Arilla-Codoñer^a, Eulalia Alonso-Iglesias^c

^a Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, 46017 Valencia, Spain

^b Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2013

Received in revised form 9 October 2013

Accepted 19 October 2013

Available online 29 October 2013

Keywords:

Cardiovascular risk

Children

Endothelial dysfunction

Homocysteine

Nitric oxide

Obesity

Resistin

ABSTRACT

Objective: To evaluate whether serum resistin levels are related to cardiovascular risk in obese children.

Design and methods: Cross-sectional study of 110 children (40 normal weight and 70 severely obese). Clinical and biochemical parameters, including lipid profile, fasting glucose and insulin, and homocysteine, were determined. The levels of adipokines (adiponectin, leptin, and resistin), markers of inflammation (high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP)), endothelial activation (serum concentrations of soluble intercellular and vascular cellular adhesion molecule-1 (sICAM-1, sVCAM-1)), and oxidative/nitrosative stress (malondialdehyde and urinary nitrate/nitrite) were measured.

Results: A partial correlation adjusted by gender, Tanner stage, and body mass index in obese children showed that resistin was significantly related to central obesity ($p < 0.002$), insulin resistance ($p < 0.005$), and homocysteine ($p < 0.001$). No association was found with other metabolic risk factors or hs-CRP levels. Malondialdehyde ($p < 0.043$) and sVCAM-1 ($p < 0.002$) were positively correlated whereas urinary nitrate/nitrite was negatively correlated ($p < 0.007$). In multiple regression analysis homocysteine, sVCAM-1, and urinary nitrate/nitrite remained independent determinants of resistin levels (R^2 adjusted = 0.347, $p = 0.000$).

Conclusions: Resistin could be considered as a promising marker for future cardiovascular disease in obese children.

© 2013 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Obesity confers an increased risk of comorbidities and premature death, mainly due to the accumulation of visceral fat. Thus, adipose tissue is now considered to be an endocrine organ that produces several bioactive molecules, most of which negatively affect the development of cardiometabolic risk. Regarding the background of this complex disorder, a role for oxidative and nitrosative stress is suggested [1].

Resistin was originally described as an adipokine that was found to induce insulin resistance or impaired liver sensitivity to insulin [2]. Thereafter, widespread research on the relationship between resistin, obesity, and associated cardiovascular risk has been conducted, mainly in experimental fields [3,4]. Homocysteine (Hcys), a known independent risk factor for cardiovascular disease, induces resistin expression and secretion from adipocytes [5]. Resistin is also associated with the activation of inflammatory processes [6]. Thus, it has been subsequently

proposed that resistin can act as an effector molecule that leads to an atherosclerotic state, possibly through several mechanisms. It has been shown that resistin has direct effects on endothelial cell activation by inducing the expression of cell adhesion molecules, thereby enhancing leukocyte adhesion [7,8]. Previous “in vitro” experimental studies on endothelial cells and atherosclerotic plaque progression also showed that resistin can impair endothelium-dependent relaxation, promote angiogenesis [9], and induce vascular inflammation [10]. An increase in resistin concentration significantly decreases endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide (NO) production through oxidative stress in cultured human coronary artery endothelial cells [11], suggesting that the effects of resistin can be mediated by oxidative stress. However, the precise role of resistin in the clinical scenario remains to be fully elucidated.

Given that cardiometabolic risk factors continue from early life to adulthood, resistin could be considered as a link between obesity in youth and adult cardiovascular disease. This further issue is still debated. Very few studies have been performed on children in this setting, and recent studies have failed to find an association between resistin levels and obesity in children, as determined by an increase in body mass index (BMI) [12–14]. Moreover, the levels appear to be related to pubertal

* Corresponding author at: Department of Pediatrics, Dr. Peset University Hospital, Avenida Gaspar Aguilar, nº 90, 46017 Valencia, Spain. Fax: +34 963864815.
E-mail address: pilar.codoner@uv.es (P. Codoñer-Franch).

development [15]. To our knowledge, the association between the circulating levels of resistin and the degree of oxidative/nitrosative stress has not been evaluated in youths. Because children present the early stages of the development of complications linked to obesity, we postulated that a dysregulation of this molecule would reflect an association with comorbidities and could have predictive value. We tested the hypothesis that resistin can be a marker for the identification of individuals who are “at risk” for premature atherosclerosis. To achieve this goal, we investigated the relationship of resistin levels with circulating biomarkers of vascular endothelial function and parameters of oxidative and nitrosative stress in a cohort of obese children.

Methods

Subjects

The participants in this cross-sectional study were 110 Spanish children (63 boys) aged between 7 and 14 years. We enrolled 70 severely obese children who were referred to our unit from October 2012 to March 2013 to participate in an outpatient weight-loss program. The definition of BMI-based obesity employed was as proposed by Cole and colleagues for childhood [16]. BMI variability with age and sex was adjusted using the standard deviation score for BMI (SDS-BMI), based on WHO charts [17]. In total, 40 age-matched healthy children from a school health program and with a normal BMI (<85th percentile for age and gender according to reference standards) were selected as a control group for the purpose of comparison of serum resistin levels. Pubertal development (Tanner stage) was clinically assessed. All of the children were instructed to follow a nitrate-restrictive diet (leafy vegetables, cured meat, and sausages) during the 3 days before blood and urine sampling. Children were excluded if they had known genetic abnormalities or underlying systemic diseases or if they were within 1 month of any acute infectious process. The study followed the Helsinki guidelines and all participants and their parents gave their written, informed consent to participate. The protocol was approved by the Ethics Committee of Dr. Peset University Hospital.

Anthropometric and clinical measurements

Weight and height were measured according to a standardized protocol. Waist circumference was determined with non-elastic tape and was measured at the smallest circumference between the costal margin and the iliac crest. Waist-to-height ratio was then calculated. Resting blood pressure was measured in the dominant arm with an electronic sphygmomanometer (Dinamp 200; GE Medical Systems Information Technologies, Inc., Milwaukee, WI, USA), and the average of three measurements was recorded.

Bioelectrical impedance was assessed using a Tanita BC-418MA instrument with eight-contact electrodes (Tanita Europe BV, Hoofddorp, The Netherlands). The fat mass was normalized for height² and used as fat mass index.

Blood sample and urine analysis

Blood and urine samples for analysis were collected simultaneously with routine clinical investigations. Fasting blood samples were collected and centrifuged, and an aliquot of plasma and serum was deep-frozen until experimental determinations. Routine biochemical parameters were measured by automated methods, and insulin and Hcys were measured by an automated electrochemiluminescence immunoassay (Aeroset System® and Architect c8000®; Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Germany). Insulin resistance was assessed using a widely validated mathematical formula for the homeostasis model assessment index (HOMA-IR = insulin (μU/mL) × glucose (mmol/L) / 22.5). A value of 3.16 was considered as the normal limit [1]. Urine was collected in

sterile containers for a 2-hour period after voiding the bladder in the morning.

Assays

High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels were determined by kinetic nephelometry (Immage Nephelometer®; Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Adiponectin, leptin, and resistin were measured in the plasma using the MILLIPLEX MAP Human Adipocyte Magnetic Bead Panel and the HADCYMAG-61K (Millipore, Billerica, MA, USA) in the Luminex 100 IS Analyser System (Luminex Corp, Austin, TX, USA). The coefficients of variation for the three analytes ranged from 6.5% to 10%. The serum concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) were measured with commercial ELISA kits (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Assays were performed according to the manufacturer's instructions, with an interassay coefficient of variation of 8.5% for sVCAM-1 and 9.7% for sICAM-1. The concentration of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in the plasma was measured based on absorbance at 532 nm in a Waters HPLC System (Milford, MA, USA) following isocratic separation in a reverse-phase C-18 column of 5 μm, 4.6 mm × 150 mm; eluted with 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 6.8) and methanol (58:42, v/v) [18].

Because NO is a very labile molecule, its direct measurement in biological samples is difficult. In aqueous solution, NO reacts with molecular oxygen, accumulates in the plasma, and is excreted in the urine as the stable oxidation end-products nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) ions, also known as NO_x, which can be readily measured in biological fluids and have been used in vitro and in vivo as indicators of NO production. The levels of NO end-products were measured using a modified Griess assay. Briefly, the assay involves the enzymatic conversion of nitrate to nitrite by nitrate reductase (*Aspergillus* species), followed by the measurement of nitrite through the formation of a magenta-colored azo dye as a product of the Griess reaction with Griess reagent (1 g/L sulfanilamide, 0.1 g/L N-1-naphthylethylenediamine, and 25 g/L phosphoric acid). Absorbance was read at 540 nm using a Multiskan EX microplate reader (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finland). The conditions were essentially those described by Moshage et al. [19]. All samples were assayed in duplicate. Values of nitrate/nitrite in the urine were expressed relative to levels of creatinine (μmol/mmol) [20].

Statistical analysis

Comparisons of dichotomic values between groups were done by Chi-squared test. Quantitative data are described as the median and interquartile range (25th to 75th percentile). The conformity of data with a normal distribution was controlled with the Kolmogorov-Smirnov test, and skewed variables were log-transformed prior to using parametric tests. Comparisons of continuous values between groups were done by analysis of covariance adjusted by gender and Tanner stage or by Student's t test in the case of age. The significance of the differences between resistin levels in the control and obese groups with or without insulin resistance was tested by analysis of covariance, with gender, Tanner stage, and BMI as covariates, and a post-hoc Bonferroni analysis. A partial correlation coefficient adjusted for gender, Tanner stage, and BMI was determined to identify variables with a statistically significant association with serum resistin levels. Predictors identified in the bivariate analysis with a significance of $p < 0.01$ were included in a multiple linear regression analysis. Collinear variables were not included in the model simultaneously. Backward stepwise elimination was applied to the initial multiple regression model to determine the contribution of factors influencing resistin levels after adjusting for potential confounding variables. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. The data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows, version 17, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The characteristics of the subjects included in this cross-sectional study are summarized in Table 1. All obese children suffered from severe obesity mainly due to central adiposity. However, their fasting glucose and plasma lipid profiles were within the normal range. Furthermore, the obese children showed increased hs-CRP and leptin values. The mean resistin level was not significantly different in obese children compared with control children. However, when obese children were stratified by insulin resistance values, we found significant difference between obese children with insulin resistance and both, normal weight and obese children without insulin resistance (Fig. 1). The correlation of resistin levels with clinical and analytical parameters was investigated after correction for gender, Tanner stage, and BMI in all children and specifically in obese children. The results are presented in Table 2. A partial Pearson correlation analysis showed that resistin was significantly correlated with measures of central obesity, such as relative waist circumference and the waist-to-height ratio. The fat mass index was also consistently associated with resistin levels. There was a positive correlation with insulin resistance, as determined by the surrogate HOMA-IR. Other features of metabolic syndrome (blood pressure and lipid profile), hs-CRP, and adiponectin values did not show an association with resistin levels. However, Hcys and leptin values were positively related to resistin. Furthermore, significant positive correlations were observed between resistin values and both sVCAM-1 and malondialdehyde levels, whereas urinary nitrate/nitrite was negatively correlated with plasma resistin values.

We performed a multiple regression analysis in obese subjects that included all of the parameters in the statistical model that were significantly correlated with plasma resistin levels. The results presented in Table 3 showed that sVCAM-1, Hcys, and urinary nitrate/nitrite remained significantly associated with resistin with an R^2 of 0.347 ($p = 0.000$). Urinary nitrate/nitrite had the strongest association with plasma resistin levels (standardized β coefficient -0.316 , $p = 0.003$).

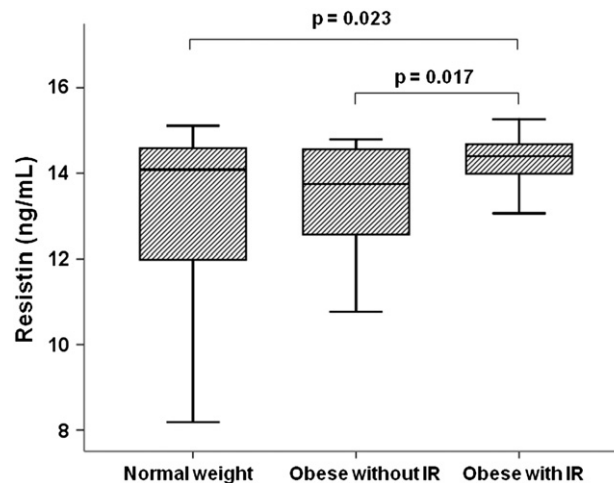


Fig. 1. Serum resistin levels in children with normal weight ($n = 40$), obese children without insulin resistance ($\text{HOMA-IR} < 3.16$, $n = 21$), and obese children with insulin resistance ($\text{HOMA-IR} > 3.16$, $n = 49$). Data are shown as medians and interquartile range.

Discussion

The main finding of the present cross-sectional study is that resistin can be considered as a candidate marker for cardiovascular risk due to resistin's significant associations with Hcys levels, endothelial activation molecules, and NO metabolites in obese children.

Increasing interest in resistin is due to its putative association with insulin resistance. Although the link between resistin, obesity, and insulin resistance appears to be strong in mice, the exact physiological relevance of resistin in humans remains debatable [21]. In adults, resistin has been positively associated with hypertension [22] and triglycerides, whereas resistin was negatively associated with high-density lipoprotein cholesterol concentrations [23]. Among the studies involving children and adolescents, several recent studies have failed to detect increased serum resistin levels in obese, insulin-resistant subjects or in subjects with other components of metabolic syndrome [13]. Our findings confirm that resistin is associated with visceral adiposity, similar

Table 1
Demographic, clinical and laboratory characteristics of the study population.

Variable	Obese ($n = 70$)	Normal weight ($n = 40$)	p-Value
Age (years)	12 (8–13)	11 (8–13)	0.686 ^b
Gender (F/M)	27/43	20/20	0.244 ^a
SDS body mass index	4.2 (2.9–5.0)	−0.45 (−1 to 0.37)	0.000 ^c
Relative waist circumference (%)	144 (131–151)	99 (95–107)	0.000 ^c
Waist-to-height ratio	0.63 (0.57–0.65)	0.44 (0.42–0.47)	0.000 ^c
Fat mass index (kg/m^2)	10.9 (9.2–12.7)	3.5 (2.3–5.0)	0.000 ^c
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.07 (0.93–1.27)	1.34 (1.17–1.58)	0.000 ^c
Triglycerides (mmol/L)	0.94 (0.76–1.55)	0.62 (0.47–0.85)	0.000 ^c
HOMA-IR	4.1 (2.8–6.5)	1.9 (1.1–2.5)	0.000 ^c
SDS systolic blood pressure	1.12 (0.47–2.24)	−0.01 (−0.7 to 0.56)	0.000 ^c
SDS diastolic blood pressure	0.64 (0.18–1.38)	0.0 (−0.46 to 0.27)	0.000 ^c
Homocysteine ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	7.8 (6.8–8.6)	6.6 (5.9–7.0)	0.014 ^c
hs-CRP (mg/L)	2.8 (0.9–4.4)	0.4 (0.2–0.7)	0.000 ^c
sVCAM-1 (ng/mL)	384 (353–425)	372 (332–414)	0.139 ^c
sICAM-1 (ng/mL)	100 (68–150)	61 (36–95)	0.006 ^c
Urinary nitrate/nitrite ($\mu\text{mol}/\text{mmol creatinine}$)	96 (65–113)	67 (55–89)	0.035 ^c
Malondialdehyde ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.81 (0.31–0.89)	0.32 (0.22–0.43)	0.000 ^c
Leptin (ng/mL)	130 (95–177)	14 (8–41)	0.000 ^c
Adiponectin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.52 (0.49–0.55)	0.54 (0.51–0.57)	0.620 ^c
Resistin (ng/mL)	14.3 (13.7–14.7)	14.1 (11.9–14.6)	0.089 ^c

SDS: standard deviation score, HDL: high-density lipoprotein, HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance, hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein, sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1, sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1.

^a By a Chi-squared test.

^b By a Student's t-test.

^c By an ANCOVA that was adjusted for gender and Tanner stage.

Table 2

Partial Pearson's coefficient correlation between resistin levels and clinical and laboratory data in all children included in the study and in the obese children, adjusted for gender, Tanner's stage and body mass index.

	All children ($n = 110$)		Obese children ($n = 70$)	
	R	p-Value	R	p-Value
Relative waist circumference	0.235	0.015	0.376	0.002
Waist-to-height ratio	0.223	0.021	0.338	0.005
Fat mass index	0.293	0.002	0.448	0.000
Log HDL cholesterol	−0.244	0.011	−0.202	0.101
Log triglycerides	−0.009	0.928	−0.036	0.774
Log HOMA-IR	0.260	0.007	0.339	0.005
SDS systolic blood pressure	0.147	0.136	0.026	0.835
SDS diastolic blood pressure	0.009	0.931	−0.167	0.178
Log homocysteine	0.279	0.004	0.382	0.001
Log hs-CRP	0.186	0.055	0.115	0.354
sVCAM-1	0.320	0.001	0.371	0.002
Log sICAM-1	0.266	0.006	0.150	0.227
Log malondialdehyde	0.249	0.010	0.248	0.043
Log urinary nitrate/nitrite	−0.170	0.080	−0.329	0.007
Leptin	0.259	0.007	0.338	0.005
Adiponectin	0.034	0.724	0.110	0.376

HDL: high-density lipoprotein, HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance, SDS: standard deviation score, hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein, sVCAM-1: soluble vascular cell adhesion molecule-1, sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1.

Table 3
Multiple regression analysis for resistin as a dependent variable in obese children.

Independent variables	B coefficient (IC 95%)	β coefficient	t	p-Value
Constant			2.866	0.006
Relative waist circumference	0.020 (0.000, 0.040)	0.200	1.953	0.055
Log homocysteine	3.684 (1.014, 6.353)	0.268	2.756	0.008
Urinary nitrate/nitrite	−0.015 (−0.024, −0.005)	−0.316	−3.125	0.003
sVCAM-1	0.007 (0.001, 0.013)	0.236	2.454	0.017

(R^2 adjusted = 0.347, $p = 0.000$).

Predictor variables included in the analysis: relative waist circumference, Tanner stage, homeostasis model assessment of insulin resistance, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), homocysteine, urinary nitrate/nitrite and leptin.

to the findings of other studies [24]. In contrast to the results of other authors [25], we found an association with insulin resistance. The HOMA-IR values in the children participating in the current study were more elevated than in other studies, which could account for these different results. Furthermore, we have not found an association between resistin and other metabolic risk factors, such as dyslipidemia or increased blood pressure. It is possible that the relationship between resistin and lipids or hypertension becomes evident at older ages, when these entities are relatively more prevalent. It is noteworthy that the association with central obesity and insulin resistance was lost after adjusting for other parameters that influence cardiovascular risk, such as Hcys and indicators of endothelial dysfunction, suggesting that resistin mainly exerts control over the parameters that are directly linked to atherosclerosis development.

It is known that the process of atherosclerosis starts at an early age, but the exact pathophysiological mechanisms that underlie the association between obesity and early atherosclerosis are not fully understood. Earlier studies showed that by directly affect vascular homeostasis, Hcys, a sulfur amino acid formed during the metabolism of methionine, may represent an important mechanistic basis of cardiovascular disease in patients with metabolic syndrome [26]. Research in experimental settings documented that Hcys levels contribute to the induction of resistin expression in mouse adipose tissue that is mediated by the reactive species pathway [5]. Furthermore, Hcys promotes vascular smooth muscle cell migration, a key factor for neointimal formation in atherosclerosis, throughout the effect of resistin [27].

The strength of the association between an elevated Hcys level and cardiovascular disease has been shown to be different between adults and children. Most of the epidemiologic studies on adults support the link between Hcys and atherothrombosis, and subjects with raised Hcys levels have an increased risk of cardiovascular morbidity that is usually concentration dependent. Few data are available for children [28]. Only a slight elevation of Hcys, lower than the threshold established as at risk in adults, was found in the obese children in the present study. Given the relationship between resistin and Hcys, we examined the association of these two parameters. There was a significant correlation between resistin and Hcys in nonobese and obese youths. In addition, Hcys contributed to resistin levels as an important independent factor in a multivariate analysis.

The expression of adhesion molecules such as sVCAM-1 and sICAM-1 on the endothelial cell surface is an initial step in atherogenesis. Resistin activates endothelial cells (via the upregulation of adhesion molecules, endothelial–leukocyte interaction induction, and vascular smooth cell proliferation) and may promote the initiation or perpetuation of the atherosclerotic state [7,8,27,29]. The association of resistin with a biomarker of endothelial function (sVCAM-1) in obese youths found in the current study implies that resistin may be directly or indirectly related to future cardiovascular disease and can be considered as a marker of preclinical atherosclerosis.

NO, a potent vasodilatory molecule, is the key to endothelial function. The reduced bioavailability of NO is involved in atherogenic

properties because it promotes vasoconstriction and increases the recruitment of leukocytes to the endothelium [10]. Thus, decreased NO is an early event involved in the pathogenesis of vascular damage.

NO is rapidly oxidized to nitrite and/or nitrate by oxygen in biological systems, and therefore, the concentrations of nitrite and nitrate end-products (nitrate/nitrite) are routinely used as an index of NO synthesis. Excretory nitrate indicates systemic NO production. It has been demonstrated that resistin affects NO bioavailability by impairing the endothelial nitric oxide synthase system in human coronary artery endothelial cells [11]. Moreover, in this setting, oxidative stress has a predominant additive role of scavenging NO and producing peroxynitrite. Oxidative stress is also involved in the signaling pathway of resistin induction. We have found a negative association between resistin and urinary nitrate/nitrite that implies diminished systemic NO bioavailability linked to higher resistin values. The observed inverse correlation between resistin levels and nitric oxide production may also be relevant in vascular smooth muscle cell proliferation, another well recognized player in the onset and progression of cardiovascular disease. Thus, decreased availability of nitric oxide might promote and trigger vascular smooth muscle cell proliferation in our patients. The implication of resistin in this scenario represents an important point of convergence.

Resistin was also associated with malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation, in the present study. In this sense, there is a link between oxidative and nitrosative stress and resistin values. The novel finding of the relationship between resistin values and parameters of nitrosative stress in obese children is interesting. A growing body of scientific research on the relationship of NO with blood pressure has emerged in recent years, but it is unlikely that this relationship was a predominant factor in the cohort of children studied. Other involved factors could be related. Obesity produces low-grade inflammation that could represent a potential link between metabolic disturbances and vascular complications. However, in contrast to previous adult studies [6], inflammation, as measured by hs-CRP levels, was not associated with resistin levels in our cohort. Resistin levels are increased in children with acute inflammation [30,31], but the effects of proinflammatory molecules on resistin levels are not solely dependent on obesity [24]. Human resistin is indirectly regulated by the inflammatory internal milieu of obesity. Furthermore, the adipocyte is not the major cell type producing resistin in humans, which rather is produced by infiltrating macrophages. It has been mimicked the state of subacute inflammation in the absence of obesity in a transgenic mouse model by selective hepatocellular activation of nuclear factor-kappaB [32]. Therefore, we can hypothesize that resistin induces an inflammatory state that is potentially driven by nuclear factor-kappaB directly [33] and indirectly through cytokines formed downstream from it. This fact constitutes an early event which subsequently will lead to increasing C-reactive protein levels.

The current study has several strengths, including the standardized methods of obtaining clinical and laboratory data and precise measurement. A diet ensuring the accuracy of the measurements of urinary nitrate was used. In the present study, data were adjusted by gender and Tanner stage because an independent association of gender with resistin levels has been demonstrated. In addition, puberty seems to play a role in resistin secretion, as resistin levels are correlated with maturational development rather than with anthropometric measures or chronologic age [14]. Because the relationship between metabolic risk factors and adipokines has been suggested to be mediated by increased adiposity [34], the data in the present study were also controlled by BMI.

Nevertheless, certain limitations should be mentioned. First, because of the study's cross-sectional design, we cannot draw any causal inferences from the data. Continuing longitudinal analysis will evaluate the predictive value of resistin in cardiovascular outcome. More prospective data are needed to determine the predictive value of resistin in cardiovascular morbidity in children. Moreover, the sample size was limited. However, this is a common feature in pediatrics research due to the

specific characteristics of pediatric patients. Few data are available for children with respect to molecules that play crucial roles in atherogenesis to aid early diagnosis. Future translational and clinical research in children, with the aim of unraveling the role of adipose tissue in associated comorbidities, is highly warranted.

Conclusions

The risk factors for cardiovascular diseases begin in childhood. Therefore, research on evaluation and prevention should be addressed at this stage. As endothelial dysfunction and atherosclerosis begin early in life, the identification of biomarkers of prognostic value regarding cardiovascular risk would give better insight into this process, independent of the ulterior process of aging. The present study demonstrated an independent association of cardiovascular markers with serum resistin. In this manner, resistin is a potential predictor of the present and future risk of cardiovascular diseases.

Conflict of interest

None.

References

- [1] Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Megías-Vericat J, Tortajada-Girbés M, Alonso-Iglesias E. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* 2011;215:475–80.
- [2] Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 2003;111:225–30.
- [3] Gentile MT, Vecchione C, Marino G, Aretini A, Di Pardo A, Antenucci G, et al. Resistin impairs insulin-evoked vasodilation. *Diabetes* 2008;57:577–83.
- [4] Yang B, Li M, Chen B, Li TD. Resistin involved in endothelial dysfunction among preclinical Tibetan male young adults. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012;13:420–5.
- [5] Li Y, Jiang C, Xu G, Wang N, Zhu Y, Tang C, et al. Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro. *Diabetes* 2008;57:817–27.
- [6] Fargnoli JL, Sun Q, Olenczuk D, Qi L, Zhu Y, Hu FB, et al. Resistin is associated with biomarkers of inflammation while total and high-molecular weight adiponectin are associated with biomarkers of inflammation, insulin resistance, and endothelial function. *Eur J Endocrinol* 2010;162:281–8.
- [7] Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003;108:736–40.
- [8] Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:415–9.
- [9] Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, et al. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;70:146–57.
- [10] Cho Y, Lee SE, Lee HC, Hur J, Lee S, Youn SW, et al. Adipokine resistin is a key player to modulate monocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells, leading to progression of atherosclerosis in rabbit carotid artery. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:99–109.
- [11] Chen C, Jiang J, Lü JM, Chai H, Wang X, Lin PH, et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H193–201.
- [12] Amirhakimi A, Karamifar H, Moravej H, Amirhakimi G. Serum resistin level in obese male children. *J Obes* 2011;2011:953410.
- [13] Boyraz M, Cekmez F, Karaoğlu A, Cinaz P, Durak M, Bideci A. Relationship of adipokines (adiponectin, resistin and RBP4) with metabolic syndrome components in pubertal obese children. *Biomark Med* 2013;7:423–8.
- [14] Maggio AB, Wacker J, Montecucco F, Galan K, Pelli G, Mach F, et al. Serum resistin and inflammatory and endothelial activation markers in obese adolescents. *J Pediatr* 2012;161:1022–7.
- [15] Gerber M, Boettner A, Seidel B, Lammert A, Bär J, Schuster E, et al. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4503–9.
- [16] Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity: international survey. *BMJ* 2000;320:1240–3.
- [17] WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO child growth standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr* 2006;95(Suppl. S450):76–85.
- [18] Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 2005;115:e500–3.
- [19] Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827:76–82.
- [20] Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 41(6 Pt 1):892–6.
- [21] de Luis DA, Gonzalez Sagrado M, Conde R, Aller R, Izaola O, Primo D. Lack of association of serum resistin levels with metabolic syndrome criteria in obese female patients. *Clin Biochem* 2011;44:1280–3.
- [22] Fang C, Lei J, Zhou SX, Zhang YL, Yuan GY, Wang JF. Association of higher resistin levels with inflammatory activation and endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Chin Med J (Engl)* 2013;126:646–9.
- [23] Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 2007;156:279–84.
- [24] Li M, Fissette A, Zhao XY, Deng JY, Mi J, Cianflone K. Serum resistin correlates with central obesity but weakly with insulin resistance in Chinese children and adolescents. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:424–39.
- [25] Nehus E, Furth S, Warady B, Mitsnefes M. Correlates of resistin in children with chronic kidney disease: the chronic kidney disease in children cohort. *J Pediatr* 2012;161:276–80.
- [26] Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, et al. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* 2006;136(6 Suppl.):1731S–40S.
- [27] Jiang C, Zhang H, Zhang W, Kong W, Zhu Y, Zhang H, et al. Homocysteine promotes vascular smooth muscle cell migration by induction of the adipokine resistin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:C1466–76.
- [28] da Silva NP, de Souza FI, Pendeza AI, Fonseca FL, Hix S, Oliveira AC, et al. Homocysteine and cysteine levels in prepubertal children: association with waist circumference and lipid profile. *Nutrition* 2013;29:166–71.
- [29] Hsu WY, Chao YW, Tsai YL, Lien CC, Chang CF, Deng MC, et al. Resistin induces monocyte-endothelial cell adhesion by increasing ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via p38MAPK-dependent pathway. *J Cell Physiol* 2011;226:2181–8.
- [30] Liu R, He B, Gao F, Liu Q, Yi Q. Relationship between adipokines and coronary artery aneurysm in children with Kawasaki disease. *Transl Res* 2012;160:131–6.
- [31] Gheita TA, El-Gazzar II, El Shazly RI, El-Din AM, Abdel-Rasheed E, Bassyouni RH. Elevated serum resistin in juvenile idiopathic arthritis: relation to categories and disease activity. *J Clin Immunol* 2012;33:297–301.
- [32] Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11:183–90.
- [33] Zhang J, Lei T, Chen X, Peng Y, Long H, Zhou L, et al. Resistin up-regulates COX-2 expression via TAK1-IKK-NF-kappaB signaling pathway. *Inflammation* 2010;33:25–33.
- [34] Rubin DA, McMurray RG, Hackney AC, Harrell JS. Relationship between cardiovascular risk factors and adipokines in adolescents. *Horm Res Paediatr* 2011;76:123–9.

