



A sobrecarga oxidante como factor de risco associado à obesidade: relação com o glutatono plasmático e com o fenótipo da haptoglobina

Cláudia Marinho¹, Irina Alho¹, João Oliveira¹, Carla Rego², António Guerra², Manuel Bicho¹

1 - Laboratório de Genética, Centro de Metabolismo e Endocrinologia, Faculdade de Medicina de Lisboa.

2 - Departamento de Pediatria, Hospital de São João, Faculdade de Medicina do Porto.

Resumo

Objectivo. Verificar a associação entre o fenótipo da haptoglobina (Hp), uma proteína de fase aguda, e a concentração plasmática de glutatono total (GSht) em adolescentes obesos, como forma de avaliar a capacidade antioxidante de resposta ao processo inflamatório relacionado com a obesidade.

Amostra Populacional. Foram estudados 69 adolescentes obesos, de acordo com o valor de corte de Cole, com média de idades de $11,2 \pm 1,17$ anos e IMC $27,4 \pm 4,8$. O grupo controlo é constituído por 104 adolescentes eutróficos.

Métodos. A determinação do fenótipo da haptoglobina plasmática foi efectuada por electroforese em gel de poliacrilamida e a concentração de GSht foi obtida por espectrofluorimetria, usando o o-ftaldeído (OPT) como fluoróforo.

Resultados. Verificou-se que a concentração de GSht nos adolescentes obesos é significativamente inferior à dos adolescentes do grupo controlo (mediana: $34,65$ vs $48,90$ $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$), estando a razão entre o GSht e a forma oxidada do glutatono (GSht/GSSG), igualmente diminuída (mediana: $7,64$ vs $7,90$; $p = 0,014$). Os adolescentes obesos com o fenótipo Hp1.1 parecem poder estar mais protegidos contra as lesões resultantes da sobrecarga oxidante, uma vez que apresentam níveis de GSht e razões GSht/GSSG significativamente superiores aos adolescentes com fenótipo 2.1 e 2.2.

Conclusões. O GSH é considerado o principal antioxidante celular, sendo essencial no funcionamento dos principais mecanismos de detoxificação e combate à lesão oxidante. A razão GSht/GSSG é um indicador sensível de sobrecarga oxidante. Uma diminuição significativa dos níveis de GSht total e da razão GSht/GSSG indicam que a sobrecarga oxidante pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia da obesidade. Os adolescentes obesos com fenótipo Hp1.1 apresentam valores superiores destes parâmetros pelo que poderão estar mais protegidos contra o processo inflamatório associado à obesidade.

Palavras-chave: Haptoglobina; glutatono; sobrecarga oxidante; obesidade; adolescentes.

Acta Pediatr Port 2008;39(2):57-61

Oxidative stress as a risk factor related to obesity: association with plasma glutathione levels and haptoglobin phenotype

Abstract

Aim. To verify the association between the haptoglobin phenotype (Hp), an acute phase protein and total plasma glutathione levels (GSht) on obese adolescents in order to evaluate the antioxidant response capacity to inflammatory process related with obesity.

Patients. 69 obese adolescents, according to Cole cohort, mean age 11.2 ± 1.17 years and BMI 27.4 ± 4.8 were studied. The control group consists on 104 eutrophic adolescents.

Methods. The haptoglobin phenotype of plasma samples was identified by PAGE and plasma glutathione levels were determined by spectrofluorescence assays, using o-phthaldehyde (OPT) as fluorophore.

Results. Plasma GSht levels of obese adolescents were significantly lower compared to control group (median: $34,65$ vs $48,90$ $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,001$), being the ratio between GSht and the glutathione oxidized form (GSht/GSSG) also significantly decreased (median: $7,64$ vs $7,90$; $p = 0,014$). Obese adolescents with Hp1.1 phenotype might be more protected against oxidative stress injury, since they presented significantly increased levels of total plasma GSH and total GSht/GSSG ratio than Hp 2.1 and 2.2 subjects.

Conclusions. Glutathione is considered the main cellular antioxidant, being essential for the mechanisms of cellular detoxification and protection against oxidative attack. The ratio GSht/GSSG is considered a sensible indicator of

Recebido: 06.12.2006

Aceite: 26.05.2008

Correspondência:

Cláudia Marinho
Laboratório de Genética, Faculdade de Medicina de Lisboa
Av. Prof. Egas Moniz
1649-028 Lisboa
Telf: +351 21 799 94 49; Fax: +351 21 799 94 51
cmarinho@fm.ul.pt

oxidative stress. A significantly decrease on plasma GSH levels and on tGSH/GSSG ratio indicated that oxidative stress seems to play an important role on the obesity physiopathology. Obese adolescents with Hp 1.1 phenotype presented higher levels of these biochemical parameters therefore may be more protect to inflammatory process related with obesity.

Key-words: haptoglobin; glutathione; oxidative stress; obesity; adolescents.

Acta Pediatr Port 2008;39(2):55-61

Introdução

A obesidade é uma doença crónica, sendo um dos componentes associados à síndrome metabólica, cuja incidência tem aumentado largamente nas últimas décadas, afectando não apenas adultos, mas também crianças e adolescentes. Encontra-se associada com alterações metabólicas graves e com um aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular. O tecido adiposo segrega um elevado número de hormonas e citocinas, que não regulam apenas o metabolismo, mas podem influenciar de forma negativa a fisiologia do endotélio^{1,2}.

O índice de massa corporal é considerado, actualmente, como um factor de prognóstico independente de mortalidade^{3,4}.

O glutathione (GSH) é o principal agente antioxidante não enzimático, estando envolvido directa e indirectamente na eliminação de radicais livres e outras espécies reactivas de oxigénio. É um tripéptido endógeno constituído por glutamato, cisteína e glicina, que actua como cofactor dos principais enzimas antioxidantes e destoxicantes celulares, como o peroxidase e os transferases do glutathione⁵. A concentração deste péptido encontra-se reduzida na resposta a situações de sobrecarga oxidante e défice proteico, sendo um excelente marcador de estado patológico nos diferentes tecidos⁶. A razão GSHtotal/GSSG é um parâmetro marcador do estado redox e consequentemente, da capacidade antioxidante celular. Esta razão demonstra o balanço entre o total de glutathione (forma reduzida:GSH e oxidada:GSSG) em relação ao GSSG (forma oxidada que não possui capacidade antioxidante). O GSSG não deve exceder 10% do GSHtotal, pelo que quanto mais elevada for esta razão, maior é a capacidade antioxidante celular⁵.

A haptoglobina (Hp) é uma proteína plasmática cuja principal função fisiológica consiste na captação e remoção da hemoglobina (Hb) para o fígado. Durante a hemólise intravascular, verifica-se a libertação de hemoglobina, a qual é capaz de atravessar o filtro glomerular, causando lesão do rim⁷. A Hb livre pode catalisar reacções de oxidação das LDL e consequentemente, lesar as células endoteliais vasculares⁸. Por outro lado, a libertação do ferro hémico pode aumentar a sobrecarga oxidante, devido ao aumento da geração de formas reactivas de oxigénio, nomeadamente, radical hidroxilo, através da reacção de Fenton⁹.

A ligação da Hp à Hb previne a libertação de ferro hémico, diminuindo a formação de radical hidroxilo e a lipoperoxida-

ção¹⁰, bem como a lesão renal¹¹. Desta forma, a Hp desempenha uma importante função antioxidante, ao proteger contra o potencial oxidante da Hb intersticial^{12,13}.

Esta proteína é considerada de fase aguda, uma vez que a sua síntese se encontra aumentada durante o processo inflamatório, muito provavelmente, como um mecanismo compensatório de resposta antioxidante¹⁴. A haptoglobina apresenta um polimorfismo genético, resultante da expressão concomitante de três alelos, que podem ser agrupados em três grupos de acordo com os padrões de banda observados em electroforese: Hp 1.1, Hp 2.1 e Hp 2.2. Os três genótipos diferem no número de repetições de uma mesma sequência, sendo os fenótipos resultantes diferentes na sua dimensão, estrutura e na capacidade de complexação com a Hb⁷. A expressão do alelo 1 apresenta uma proteína com dimensões inferiores à apresentada pelo alelo 2¹⁵.

Objectivo

O glutathione, por ser o principal antioxidante celular, pode alterar a capacidade de resposta ao processo inflamatório. O principal objectivo deste trabalho é associar a concentração plasmática deste antioxidante com a haptoglobina, uma proteína de fase aguda que sofre alterações na sua função devido aos seus diferentes fenótipos. A hipótese apresentada é que os indivíduos com o fenótipo da haptoglobina com menor afinidade para complexar a hemoglobina (presença do alelo 2) podem estar mais sujeitos às acções oxidantes do ferro livre, e portanto, apresentem concentrações mais baixas de GSH e menor razão GSHtotal/GSSG.

Materiais e Métodos

A amostra populacional em estudo é composta por 69 adolescentes obesos, de acordo com o valor de corte de Cole, com média de idades de $11,7 \pm 2,64$ anos e IMC $27,4 \pm 4,8$. A amostra populacional de controlo é composta por 104 adolescentes eutróficos. A população de obesos representa uma sub-amostra de indivíduos acompanhados clínica e analiticamente em ambulatório hospitalar por obesidade primária. O grupo de controlo é constituído por adolescentes integrados num programa de vigilância de saúde visando particularmente o rastreio de factores de risco cardiovascular. O estudo teve a aprovação da comissão de ética local, tendo sido obtido o consentimento informado dos participantes.

A determinação do polimorfismo genético (fenótipo) da haptoglobina foi realizada a partir da Hp plasmática, por electroforese em gel de poliacrilamida 4,7% em solução tampão TRIS-HCl 0.504M, pH 8.9. As amostras para aplicação no gel ($10\mu\text{L}$) foram preparadas utilizando sacarose 40% (p/v), Hb 28,2mg/mL e plasma, na proporção de 3:2:4, para um volume final de $45\mu\text{L}$. Para a coloração das bandas resultantes da electroforese é usado o método da coloração por contacto, usando o-dianisidina 16mM em ácido acético 50% (v/v) e, posteriormente, peróxido de hidrogénio 0,6% (v/v).

As concentrações de glutathione reduzido (GSH) e oxidado (GSSG) foram determinadas num espectrofluorímetro Shimadzu RF-5000 (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Kyoto,

Japão), após precipitação das proteínas plasmáticas com ácido meta-fosfórico 25%, de modo a obter a concentração total de glutatono plasmático. O método baseou-se no descrito por Hissin e Hilf¹⁶ que utiliza a reacção entre o GSH e orto-ftaldeído (OPT) 1mg/mL em tampão de fosfatos 0,1M-EDTA 0,005M, pH 8 e, entre o GSSG e o OPT em NaHO 0,1N, pH 12, de modo a que a N-etilmaleimida (NEM) 0,04M possa prevenir a interferência do GSH nas medições do GSSG. Os espectros de emissão e de excitação do GSH e do GSSG apresentaram máximos de excitação a 340nm e de emissão a 430nm. Os valores da concentração plasmática de glutatono total são apresentados sob a forma de mediana (intervalo máximo-mínimo) ($\mu\text{mol/L}$).

A análise dos resultados foi efectuada utilizando os programas Primer of Biostatistics (Glantz, Stanton A.; McGraw-Hill Medical; Columbus, OH, EUA) e SPSS versão 14.0 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, EUA). Foram utilizados os testes não paramétricos de χ^2 e Mann-Whitney para comparações entre grupos de variáveis sem uma distribuição normal. A associação entre os níveis de GSht e o fenótipo da Hp foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis. O limiar de decisão de significância estatística escolhido foi de $p < 0,005$.

Resultados

As concentrações plasmáticas de glutatono total foram determinadas em 55 adolescentes obesos e comparadas com as obtidas em 54 adolescentes saudáveis (Quadro I). Verifica-se que a concentração de GSH plasmático total se encontra significativamente diminuída na amostra populacional de adolescentes obesos ($p < 0,001$), verificando-se o mesmo para a razão GShtotal/GSSG ($p = 0,014$), que poderá ser um parâmetro indicativo do processo inflamatório associado à obesidade.

Quadro I – Variação da concentração de GSH total plasmático e dos valores da razão GSht/GSSG em adolescentes obesos e em adolescentes eutróficos.

	Obesos (n=55)	Controlos (n=54)	p (Mann-Whitney)
Idade	11,90 (7,0-17,6)	14,41 (13,1-15,9)	$p < 0,001$
GSH total ($\mu\text{mol/L}$)	38,65 (64,9-8,7)	48,9 (70,1-19,5)	$p < 0,001$
Razão GShtotal/GSSG	6,64 (12,1-2,5)	7,9 (11,6-4,7)	$p = 0,014$

Resultados apresentados como mediana (valor máximo-mínimo).

O polimorfismo genético da haptoglobina foi avaliado por determinação da frequência dos fenótipos 1.1, 2.1 e 2.2 nas duas populações estudadas (Quadro II). A distribuição do fenótipo da Hp não apresenta diferenças significativas entre as amostras populacionais estudadas ($p = \text{ns}$). A frequência do alelo 1 não difere significativamente entre os adolescentes obesos e os adolescentes normais (0,384 vs 0,423; ns) (Quadro III).

Distribuindo a concentração plasmática de GSH pelos diferentes fenótipos da Hp, verifica-se que na amostra populacio-

Quadro II – Avaliação do polimorfismo genético (fenótipo) da haptoglobina em adolescentes obesos e em adolescentes eutróficos (controlo).

Fenótipo da haptoglobina	Adolescentes obesos (n=69)	Controlos (n=104)
1.1	8 (11,6%)	13 (12,5%)
2.1	37 (53,6%)	62 (59,6%)
2.2	24 (34,8%)	29 (27,9%)

Quadro III – Frequência dos alelos 1 e 2 da haptoglobina em adolescentes obesos e adolescentes eutróficos (controlo). (χ^2 ; ns).

Alelo	Adolescentes obesos (n=69)	Controlos (n=104)
1	38,4%	42,3%
2	61,6%	57,7%

nal controlo não existem diferenças significativas de GSH para os diferentes fenótipos (ns). As razões GSH total/GSSG também não diferem significativamente para os três fenótipos, 1.1, 2.1 e 2.2 (ns). Estes resultados estão de acordo com o facto dos adolescentes normais não terem processo inflamatório decorrente e como tal não se encontrarem sujeitos a uma condição de sobrecarga oxidante.

Na amostra populacional de adolescentes obesos, verifica-se que a concentração de glutatono plasmático é significativamente maior nos indivíduos com Hp 1.1 do que nos obesos com Hp 2.1 ou 2.2 ($p = 0,012$). Estes resultados encontram-se representados na Figura 1.

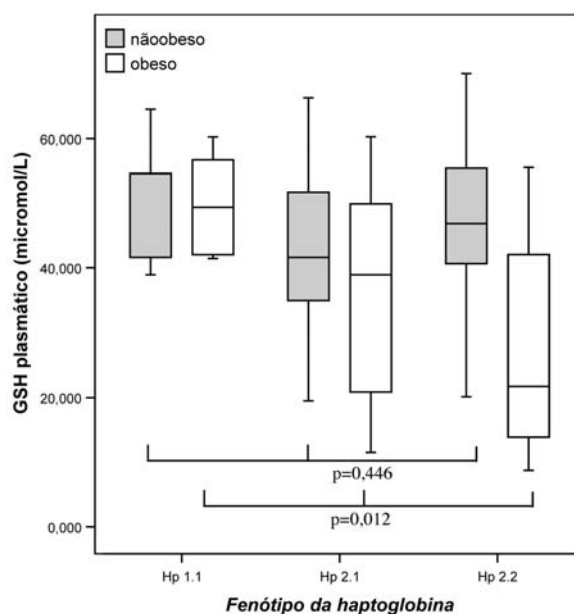


Figura 1 – Distribuição da concentração de glutatono total plasmático (GSht) pelo polimorfismo genético (fenótipo) da haptoglobina em adolescentes obesos e eutróficos. As caixas do gráfico incluem os valores entre o percentil 25 e o 75, sendo que a linha horizontal representa a mediana. As diferenças entre os grupos foram calculadas usando o teste de Kruskal-Wallis.

A razão GSH total/GSSG na população de adolescentes obesos difere significativamente entre os fenótipos da haptoglobina ($p=0,048$). Os adolescentes com fenótipo 1.1 apresentam razões com valores mais elevados (mediana=9.1) do que os que possuem o fenótipo 2.1 (mediana=6.9) e 2.2 (mediana=5.7) (Figura 2). Os adolescentes obesos com fenótipo 1.1 da Hp apresentam, igualmente, concentrações de GSH plasmático significativamente maiores (Figura 1).

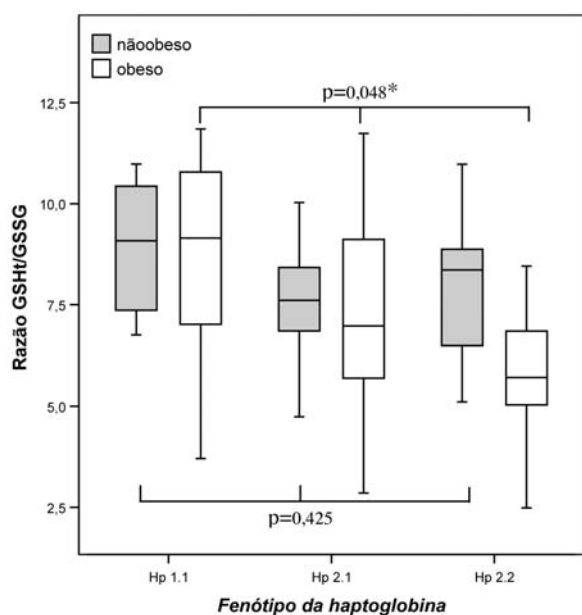


Figura 2 – Distribuição da razão GSH total /GSSG pelo polimorfismo genético (fenótipo) da Hp em adolescentes obesos e eutróficos (* $p < 0,05$; Kruskal-Wallis).

Discussão

No presente estudo verificámos que a concentração plasmática de GSH se encontrava significativamente diminuída nos adolescentes obesos, e que a razão GSH total/GSSG, um indicador sensível de sobrecarga oxidante^{5,6}, também apresenta valores mais baixos nestes adolescentes. O GSH é considerado como o maior responsável pela manutenção do equilíbrio redox intracelular, quer ao actuar como cofactor de reacções de desintoxicação celular catalisadas pela GSH peroxidase e pelas transferases do glutationo, quer como modulador do equilíbrio tiol-persulfureto celular^{5,19}.

A razão entre a forma reduzida e oxidada do GSH tem uma acção importante no estado redox de proteínas com grupos tiólicos. Por outro lado, o estado redox do GSH pode actuar como um terceiro mensageiro, aumentando ou diminuindo, a actividade de diferentes processos biológicos, nomeadamente a catálise enzimática e a síntese proteica²⁰.

A diminuição da concentração plasmática de GSH pode ser um parâmetro de susceptibilidade no combate às acções lesivas decorrentes do processo de sobrecarga oxidante. Trabalhos realizados em cultura de adipócitos, demonstraram que a acumulação de ácidos gordos potencia a sobrecarga oxidante via estimulação do oxidase do NADPH e por diminui-

ção da expressão de enzimas antioxidantes²¹. Em adultos obesos, foi verificado um aumento da geração de espécies reactivas de oxigénio resultante da activação de leucócitos, a qual é responsável por um aumento da lesão oxidante de lípidos, proteínas e aminoácidos².

Os nossos resultados confirmam os estudos onde foi demonstrado que os doentes obesos apresentam diminuição da capacidade de defesa antioxidante, sendo mais susceptíveis à sobrecarga oxidante²², a qual desempenha um papel fundamental na indução da disfunção endotelial associada à obesidade¹.

Apesar da amostra controlo ter idade média significativamente maior que a amostra de adolescentes obesos (mediana 14,4 vs 11,9 anos), segundo outros autores a concentração total de GSH não varia significativamente com a idade nestas faixas etárias^{17,18}. Num estudo realizado por Ono e col. (2001)¹⁸ verificou-se que não existem diferenças significativas na concentração total de GSH entre um grupo de crianças saudáveis com idades compreendidas entre 1-15 anos e o grupo de adultos saudáveis entre os 20 e os 30 anos. O sistema redox do glutationo é afectado apenas durante o primeiro ano de vida e no envelhecimento¹⁷. Desta forma, a variação da concentração de GSH nestas faixas etárias estará directamente dependente do processo inflamatório associado.

O facto de não se observarem diferenças significativas entre a distribuição dos diferentes génotipos da haptoglobina entre os adolescentes obesos e a amostra populacional de adolescentes saudáveis, permite-nos concluir que o polimorfismo da Hp não será um factor de predisposição para a obesidade, no entanto, verifica-se que os adolescentes com fenótipos 2.1 e 2.2 apresentam concentrações de GSH plasmático significativamente mais baixas que os adolescentes que possuem o fenótipo Hp 1.1.

Assim, os adolescentes Hp 1.1 poderão estar mais protegidos contra as lesões oxidantes resultantes do processo inflamatório associado à obesidade, quer por apresentarem concentrações mais elevadas de GSH, quer por este fenótipo apresentar maior afinidade de ligação à hemoglobina resultante da hemólise intravascular, e como tal diminuir de forma mais eficaz as possíveis reacções oxidantes catalisadas pelo ferro da Hb, nomeadamente, a formação de radical hidroxilo, um dos principais agentes iniciadores da lipoperoxidação.

O potencial redutor do GSH contribui igualmente para a reciclagem de outros antioxidantes, como o α -tocoferol (vitamina E), o ascorbato e provavelmente, os β -carotenos^{1,23}. Desta forma, parece vital a manutenção da concentração plasmática e celular do GSH. O GSH plasmático é responsável pelo transporte da cisteína, um dos precursores da síntese deste antioxidante, no plasma e pela sua distribuição nos tecidos. A cisteína é obtida, maioritariamente, a partir da metionina ingerida na dieta, através da via de transulfuração da homocisteína, a qual ocorre principalmente no fígado¹⁹. Uma depleção dos níveis de GSH plasmático, e consequentemente de cisteína, poderá comprometer a síntese de GSH nos tecidos.

Estudos efectuados sobre a suplementação oral deste antioxidante demonstraram que o ascorbato é capaz de reciclar o glu-

tationo oxidado, mas que o precursor com uma acção mais efectiva *in vivo* é a N-acetilcisteína. Suplementos de L-cisteína não são aconselháveis, uma vez que em circulação este aminoácido pode sofrer autooxidação com concomitante geração de espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente radical hidroxilo^{4,24}.

A diminuição da concentração de GSH na obesidade infantil resulta num decréscimo global da capacidade antioxidante destes adolescentes, e como tal, numa susceptibilidade para os efeitos lesivos da sobrecarga oxidante. A associação deste parâmetro com outros factores de risco, nomeadamente genéticos, como é o caso do polimorfismo da haptoglobina, poderá condicionar de forma mais significativa a evolução e progressão da doença.

Conclusões

Com este estudo foi possível verificar que o polimorfismo genético da haptoglobina pode condicionar a resposta inflamatória associada à obesidade, através da sua associação com a concentração plasmática de GSH e com a razão GSHtotal/GSSG.

O nosso estudo vem deste modo confirmar os resultados obtidos anteriormente por outros autores que demonstraram que os doentes obesos apresentam diminuição da capacidade de defesa antioxidante, sendo mais susceptíveis à sobrecarga oxidante.

Referências

- Avogaro A, de Kreutzenberg SV. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta* 2005;360:9-26.
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005;111:1448-54.
- Nieto FJ, Szklo M, Comstock GW. Childhood weight and growth rate as predictors of adult mortality. *Am J Epidemiol* 1992;136:201-13.
- Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. *N Engl J Med* 1992;327:1350-5.
- Reed DJ. Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:603-31.
- Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1405-20.
- Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* 2004;345:35-42.
- Miller YI, Altamentova SM, Shaklai N. Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: antioxidant role of haptoglobin. *Biochemistry* 1997;36:12189-98.
- Sadrzadeh SM, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J Biol Chem* 1984;259:14354-6.
- Gutteridge JM. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1987;917:219-23.
- Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Liu HC, Mao SJ. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* 2004;4:2221-8.
- Lim YK, Jenner A, Ali AB, Wang Y, Hsu SI, Chong SM et al. Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Kidney Int* 2000;58:1033-44.
- Zuwala-Jagiello J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Pol* 2006;53:257-68.
- Yang F, Ghio AJ, Herbert DC, Weaker FJ, Walter CA, Coalson JJ. Pulmonary expression of the human haptoglobin gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:277-82.
- Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996;42:1589-600.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214-26.
- Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* 2002;20:61-6.
- Ono H, Sakamoto A, Sakura N. Plasma total glutathione concentrations in healthy pediatric and adult subjects. *Clin Chim Acta* 2001;312:227-9.
- Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985;25:715-44.
- Gilbert HF. Biological disulfides: the third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem* 1982;257:12086-91.
- 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;114:1752-61.
- Jang Y, Lee JH, Cho EY, Chung NS, Topham D, Balderston B. Differences in body fat distribution and antioxidant status in Korean men with cardiovascular disease with or without diabetes. *Am J Clin Nutr* 2001;73:68-74.
- Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med* 1994;17:333-49.
- Saez G, Thornalley PJ, Hill HA, Hems R, Bannister JV. The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982;719:24-31.