



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e
Experimental – Fisclinux

Natália Rodrigues Pereira

**A Via L-Arginina – Óxido Nítrico em Plaquetas e Hemácias de Pacientes
com Anorexia Nervosa**

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Natália Rodrigues Pereira

A via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas e hemácias de pacientes com anorexia nervosa

Dissertação apresentada ao Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Orientador: Antônio Cláudio Mendes Ribeiro
Co-orientadora: Tatiana Marlowe Cunha Brunini

Rio de Janeiro
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P436 Pereira, Natália Rodrigues.

A via L-arginina : óxido nítrico em plaquetas e hemácias de pacientes com anorexia nervosa / Natália Rodrigues Pereira. – 2009.
xvi, 79f. il.

Orientadores: Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, Tatiana Marlowe Cunha Brunini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.
Bibliografia: f. 68-79

1. Anorexia nervosa – Teses. 2. Distúrbios alimentares. 3. Arginina – Teses. 4. Óxido nítrico – Teses. 5. Sistema cardiovascular – Doença – Aspectos Nutricionais. I. Ribeiro, Antônio Cláudio Mendes. II. Brunini, Tatiana Marlowe Cunha. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.89-008.441.42 .3

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Natália Rodrigues Pereira

A Via L-Arginina-Óxido Nítrico em Plaquetas e Hemácias de Pacientes com Anorexia Nervosa

Dissertação apresentada ao Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Aprovada em _____

Banca Examinadora:

Dra. Ângela de Castro Resende (Presidente)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dra. Tânia Tano
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dra. Lúcia Emmanoel Novaes Malagris
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Marcos Rochedo Ferraz (Suplente)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dr. Bernard Pimentel Rangé (Suplente)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2009

Dedico esta dissertação aos meus pais, Alfredo e Angela, por sempre estarem ao meu lado e, acima de tudo, por terem me ensinado que a felicidade está na simplicidade da vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu MELHOR AMIGO, pelo dom da Vida e por permitir a realização de mais um de meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, por permitir que eu fizesse parte deste mundo encantador da pesquisa, além de compartilhar comigo parte de seus conhecimentos geniais.

À Prof^a. Tatiana Marlowe Cunha Brunini, minha co-orientadora, por toda ajuda, ensinamento, paciência e carinho.

Aos meus pais, Alfredo e Angela, por valorizarem meus estudos. Não há palavras para expressar o meu amor por vocês!!!

À minha irmã, Marcelle, à minha avó, Irene, e aos meus tios, Angelo e Ivone, por serem, junto aos meus pais, o meu alicerce.

À Mariana Siqueira, uma amiga, mãe, essencial não só nos meus primeiros passos da pesquisa, mas como também na minha vida pessoal.

Aos amigos Monique Moss, Marcella Anjos, Anicet Okinga, Carmen Assumpção e Cristiane Matsuura. Companheiros do dia a dia no laboratório. Com vocês o trabalho fica muito mais simples, prazeroso, além de divertido!!!

Às amigas Paulinha , Vivian e Luiza pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica: Júlia, Thalita, Vanessa, Vanda, Carol e Thais, por toda ajuda nos experimentos e por todo carinho.

À Cristiane e à Daiane, por toda paciência e boa vontade em ajudar nos experimentos.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização desta dissertação.

Três Coisas

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre a começar...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo uma escada...

Do sonho uma ponte...

Da procura um encontro...”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1 L-arginina	17
1.2 A via L-arginina – óxido nítrico e o seu paradoxo	20
1.3 Caracterização da via L-arginina-NO em plaquetas e hemácias	23
1.4 Estresse oxidativo	26
1.5 Anorexia nervosa	28
<u>1.5.1 Definição</u>	28
<u>1.5.2 Etiologia</u>	28
<u>1.5.3 Epidemiologia</u>	29
<u>1.5.4 Diagnóstico</u>	30
<u>1.5.5 Características clínicas</u>	32
<u>1.5.6 Complicações clínicas</u>	33
<u>1.5.7 Prognóstico</u>	35
1.6 A via L-arginina-óxido nítrico, estresse oxidativo e AN	35
2- OBJETIVOS	38
2.1 Objetivos gerais	38
2.2 Objetivos específicos nas plaquetas	38
2.3 Objetivos específicos nas hemácias	38
2.4 Objetivos específicos sistemicamente	38
3- METODOLOGIA	39
3.1 Seleção de controles e pacientes	39
3.2 Avaliação clínica e laboratorial	39
3.3 Isolamento e preparo das plaquetas	40
3.4 Preparo das hemácias	41

3.5 Transporte de L-arginina em plaquetas	42
3.6 Análise cinética	42
3.7 Mensuração da GPMc intracelular	42
3.8 Análise da atividade da NOS plaquetária	43
3.9 Análise da atividade da NOS em hemácias	43
3.10 Extração de proteína e Western Blotting	44
3.11 Dosagem de aminoácidos	45
3.12 Atividade da arginase	45
3.13 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)	46
3.14 Análise da atividade da superóxido dismutase (SOD)	47
3.15 Agregação plaquetária	47
3.16 Dosagem de proteína	47
3.17 Análise estatística	47
4- RESULTADOS	49
4.1 Resultados em plaquetas	49
<u>4.1.1 Transporte de L-arginina em plaquetas</u>	49
<u>4.1.2 Concentração basal da GMPc intraplaquetária</u>	49
<u>4.1.3 Atividade basal da NOS nas plaquetas</u>	50
<u>4.1.4 Expressão das isoformas da NOS em plaquetas</u>	51
<u>4.1.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) em plaquetas</u>	52
<u>4.1.6 Atividade da SOD nas plaquetas</u>	53
<u>4.1.7 Agregação plaquetária</u>	53
4.2 Resultados em hemácias	54
<u>4.2.1 Atividade basal da NOS nas hemácias</u>	54
<u>4.2.2 Expressão das isoformas da NOS em hemácias</u>	55

<u>4.2.3 Atividade da arginase em hemácias</u>	56
<u>4.2.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) em hemácias</u>	56
<u>4.2.5 Atividade da SOD nas hemácias</u>	57
4.3 Resultados sistemicamente	58
<u>4.3.1 Dosagem de aminoácidos</u>	58
<u>4.3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) no soro</u>	60
<u>4.3.3 Atividade da SOD no soro</u>	60
5- DISCUSSÃO	61
6- CONCLUSÃO	66
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8- ANEXOS	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADMA	dimetil-L-arginina-assimétrica
AN	anorexia nervosa
BH ₄	tetrahydrobiopterina
CID	classificação internacional de doenças
DSM	manual diagnóstico e estatístico dos distúrbios mentais
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAD	dinucleotídeo adenina-flavina
FMN	mononucleotídeo flavina
GC	guanilato ciclase
GMPc	guanosina monofosfato cíclica
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GTP	guanosina trifosfato
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IBMX	inibidor de fosfodiesterase
IMC	índice de massa corporal
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IRC	insuficiência renal crônica
K _m	constante de afinidade de Michaelis Menten
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil ester
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
mtNOS	óxido nítrico sintase mitocondrial
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida
NESA	núcleo de estudo e saúde do adolescente
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOHA	N-hidroxi-L-arginina
NOS	óxido nítrico sintase
PPP	plasma pobre em plaqueta
PRP	plasma rico em plaquetas

RTP	reflexos tendíneos profundos
SOD	superóxido dismutase
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGO	transaminase glutâmico oxalacética
TGP	transaminase glutâmico pirúvica
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características principais das três isoformas da NOS

Quadro 2. Critérios diagnósticos para AN, segundo o DSM.IV.TR (2002)

Quadro 3. Critérios diagnósticos para AN, segundo a CID-10 (1993)

Quadro 4. Complicações clínicas da AN

Quadro 5. Composição do anticoagulante ACD

Quadro 6. Composição da solução de Krebs

Quadro 7. Composição da solução Salina

Quadro 8. Composição da solução de Magnésio

Quadro 9. Composição do tampão de extração de proteínas

Quadro 10. Composição do tampão de amostra

Quadro 11. Composição do tampão de corrida

Quadro 12. Composição do tampão de transferência

Quadro 13. Composição do tampão de lise

Quadro 14. Composição do citrato de sódio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos de indivíduos controles e pacientes com AN

Tabela 2. Concentrações plasmáticas dos aminoácidos ($\mu\text{M/L}$) em indivíduos controles (n=4) e nos pacientes com AN (n=4).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. A síntese de L-arginina.

Figura 2. As vias metabólicas da L-arginina.

Figura 3. A via L-arginina-óxido nítrico-GMPc.

Figura 4. Modelo esquemático do sistema γ^+L .

Figura 5. Redução tetravalente do O_2 com formação das espécies reativas de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxila (OH).

Figura 6. Transporte de L-arginina ($V_{m\acute{a}x}$) através do sistema γ^+L em plaquetas de pacientes com AN e controles.

Figura 7. Concentração basal da GMPcíclico intraplaquetária em pacientes com AN e controles.

Figura 8. Produção basal de L-citrulina em plaquetas de pacientes com AN e controles.

Figura 9. Expressão da NOS endotelial em plaquetas de pacientes com AN e controles.

Figura 10. Expressão da NOS induzível em plaquetas de pacientes com AN e controles.

Figura 11. Formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em plaquetas de pacientes com AN e controles.

Figura 12. Atividade da SOD em plaquetas de pacientes com AN e controles.

Figura 13. Agregação plaquetária induzida por diferentes concentrações de colágeno em plaquetas de pacientes com AN e controles.

Figura 14. Produção basal de L-citrulina em hemácias de pacientes com AN e controles.

Figura 15. Expressão da NOS endotelial em hemácias de pacientes com AN e controles.

Figura 16. Expressão da NOS induzível em hemácias de pacientes com AN e controles.

Figura 17. Atividade da arginase em hemácias de pacientes com AN e controles.

Figura 18. Formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de pacientes com AN e controles.

Figura 19. Atividade da SOD em hemácias de pacientes com AN e controles.

Figura 20. Formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em soro de pacientes com AN e controles.

Figura 21. Atividade da SOD em soro de pacientes com AN e controles.

RESUMO

A anorexia nervosa (AN) é um transtorno alimentar com alta morbimortalidade, que atinge principalmente adolescentes do sexo feminino. A AN é caracterizada por uma distorção na imagem corporal que leva a restrição alimentar, e, conseqüentemente, perda de peso e diversas complicações clínicas como um estado de hiperagregabilidade plaquetária. O óxido nítrico (NO) é produzido a partir do aminoácido catiônico L-arginina através de uma família de enzimas denominadas NO-sintases (NOS) e funciona como um protetor cardiovascular modulando várias funções como relaxamento endotelial e função plaquetária. O objetivo dessa dissertação é avaliar a via L-arginina-NO na AN, bem como investigar o ciclo da uréia, a função plaquetária, e o estresse oxidativo em pacientes com AN. O transporte de L-arginina, a produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a atividade e a expressão das isoformas da NOS, iNOS e eNOS, o estresse oxidativo (formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS e atividade da superóxido dismutase - SOD), bem como a atividade plaquetária foram avaliados nas plaquetas dos pacientes com AN. Nas hemácias, a atividade e a expressão da NOS, a atividade da arginase e o estresse oxidativo foram investigados. Os níveis plasmáticos de aminoácidos e marcadores de estresse oxidativo no soro foram também analisados. Nossos resultados demonstram que na AN o influxo de L-arginina via sistema γ^+L , a produção de GMPc e a atividade da NOS estão diminuídos nas plaquetas em relação aos controles. Ainda nas plaquetas dos pacientes com AN, a expressão das isoformas da NOS bem como a atividade plaquetária não se mostrou alterada em relação aos controles. Nas hemácias destes pacientes, observou-se reduzida atividade da NOS e uma elevada função da arginase. A expressão das isoformas da NOS em hemácias não foi afetada pela AN. A concentração plasmática de L-arginina estava reduzida em pacientes com AN. A formação de TBARS nas plaquetas, hemácias e no soro não estava alterada em pacientes com AN enquanto que a atividade da SOD mostrou-se alterada. Assim, apesar da baixa produção de NO, os pacientes anoréticos apresentam um mecanismo cardioprotetor compensatório independente do NO a ser investigado. As descobertas aqui apresentadas contribuem para uma melhor compreensão da fisiopatologia da AN.

Palavras-chave: L-arginina; Óxido Nítrico; Anorexia Nervosa; Doença Cardiovascular.

ABSTRACT

The anorexia nervosa (AN) is an eating disorder with high morbidity, that reaches mainly adolescents of the feminine sex. AN is characterized by a distortion of the corporal image that leading to alimentary restriction, and, consequently, loss of weight and diverse clinical complications such as a state of platelet increased aggregation. The nitric oxide (NO) is produced from the cationic amino acid L-arginine through an enzyme family named NO-synthase (NOS) and functions as a cardiovascular protector modulating many functions as endothelial relaxation and platelet activity. The objective of this thesis is to assess the L-arginine-NO pathway in AN, as well as to investigate the cycle of the urea, the platelet function, and the oxidative stress in patients with AN. The L-arginine transport, the production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), the activity and the expression of isoforms of NOS, iNOS and eNOS, the oxidative stress (formation of thiobarbituric acid-reactive substances – TBARS and superoxide dismutase activity – SOD), as well as the platelet function were assessed in platelets from patients with AN. In erythrocytes, the activity and expression of the NOS, the activity of arginase and the oxidative stress were investigated. Plasma amino acid levels and markers of oxidative stress in serum were also assessed. Our results have demonstrated that in AN the L-arginine influx by y+L system, the production of cGMP and activity of NOS are diminished in platelets in relation to controls. Yet in platelets from patients with AN, the expression of NOS isoforms as well as the platelet activity don't show altered. In erythrocytes from these patients, was seen reduced activity of NOS and raised function of arginase. The expression of NOS isoforms in erythrocytes were not affected by AN. The plasmatic concentration of L-arginine was diminished in AN patients. The TBARS formation in platelets, erythrocytes and serum, were not altered in patients with AN, while that the SOD activity was altered. Therefore, although of the low production of NO, the patients with AN presents an NO-independent compensatory cardioprotector mechanisms to be investigated. The discoveries presented in this study contribute for a better understanding of the physiopathology of AN.

Key words: L-arginine; Nitric Oxide; Anorexia Nervosa; Cardiovascular Disease.

1. INTRODUÇÃO

A anorexia nervosa (AN) é um transtorno alimentar com morbidade significativa (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2006) e taxa de mortalidade entre as mais altas para doenças psiquiátricas (STROBER; FREEMAN; MORRELL, 1997; BIRMINGHAM; SU; HLYNSKY, 2005). As principais características clínicas da AN são redução da ingestão alimentar e distorção da imagem corporal, fazendo com que os pacientes se sintam obesos apesar do seu estado caquético (SCHEBENDACH; MAYER; DEVLIN, 2008). Eventos cardiovasculares, como anormalidades elétricas, disfunção sistólica e diastólica e remodelamento miocárdico, têm importante impacto na morte dos indivíduos com AN (GALETTA; FRANZONI; CUPISTI, 2005; GALETTA; FRANZONI; PRATTICHIZZO, 2003).

O óxido nítrico (NO) é produzido por diferentes tipos de células, afetando processos fisiológicos como a neurotransmissão, defesa celular, regulação da proliferação das células do músculo liso e inibição da adesão e agregação plaquetária. Estes processos são mediados pela ativação da guanilato ciclase (GC) com subsequente aumento nos níveis da guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (MONCADA; HIGGS, 2006; BRUNINI *et al.*, 2007). As hemácias são consideradas o maior armazenador de NO, o qual regula a deformabilidade da membrana da hemácia e inibe a função plaquetária (KLEINBONGARD *et al.*, 2006).

A síntese do NO ocorre através da conversão do aminoácido catiônico semiessencial L-arginina em L-citrulina e NO, pela ação da enzima NO sintase (NOS) (MENDES RIBEIRO *et al.*, 2001; BRUNINI *et al.*, 2006; MONCADA; HIGGS, 2006). Entretanto, para ocorrer a síntese do NO é necessário o transporte da L-arginina do meio extracelular para o intracelular, apesar de a concentração de L-arginina no interior da célula ser muito superior à constante de afinidade de Michaelis Menten (K_m) da NOS (BRUNINI *et al.*, 2007; MANN; YUDILEVICH; SOBREVIA, 2003). Esta situação é denominada de “paradoxo da via L-arginina-NO” (BRUNINI *et al.*, 2005).

Existem três diferentes isoformas de NOS, nomeadas de acordo com o tecido no qual tais enzimas foram primeiramente descritas: NOS tipo I ou neuronal (nNOS), NOS tipo II ou induzível (iNOS) e NOS tipo III ou endotelial (eNOS) (MENDES RIBEIRO *et al.*, 2001, CLOSS *et al.*, 2004; MENDES RIBEIRO; BRUNINI, 2004;

MONCADA; HIGGS, 2006). Já foi descrito um novo subtipo de NOS, a NOS mitocondrial, mas pouco se sabe sobre esta enzima (ELFERING *et al.*, 2002).

Estão presentes em células de mamíferos quatro sistemas de transporte de aminoácidos catiônicos: y^+ , y^{+L} , $B^{0,+}$, e $b^{0,+}$, cada um com características cinéticas específicas e expressão distinta nos diferentes tipos celulares (MANN *et al.*, 2003; VERREY *et al.*, 2004; DEVES; BOYD, 1998).

A arginase, primeiramente descrita no fígado, é uma enzima também envolvida no metabolismo da L-arginina, com uma relevante participação no ciclo da uréia (MORRIS, 1992). Embora alguns estudos relatem alterações na atividade da arginase em doenças como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (RODRIGUEZ *et al.*, 2000), asma (CEYLAN *et al.*, 2005) e insuficiência renal crônica (IRC) (DURAK *et al.*, 2001), não há estudos sobre sua atividade na AN. Existem estudos que sugerem a participação da arginase na biodisponibilidade de L-arginina e, conseqüentemente, na produção de NO (CHICOINE *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2001).

O NO também desempenha um importante papel como radical livre ao reagir com superóxido (O_2^-), formando peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual é potencialmente danoso. A enzima superóxido dismutase (SOD) atua como um antioxidante, catalisando a transformação do superóxido em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na AN, a ingestão inadequada de nutrientes pode causar um aumento do estresse oxidativo, agravando ainda mais a desnutrição (PACKER, 2000; MOYANO *et al.*, 1999).

A morte súbita é comum na AN, devido às complicações cardiovasculares. Como o NO participa da patogênese de desordens cardiovasculares e quase não existem estudos sobre a sua produção em pacientes com AN (VANNACCI; RAVALDI; GIANNINI, 2006), há a necessidade de mais estudos nesta área.

1.1 L-arginina

A L-arginina é um aminoácido catiônico considerado como semiessencial, uma vez que mamíferos adultos podem sintetizá-lo. Entretanto, quando sua síntese está diminuída ou em situações patológicas em que a sua demanda é elevada e durante a fase de crescimento, a L-arginina se torna um aminoácido essencial (REYES *et al.*, 1994; BRUNINI *et al.*, 2005).

Embora macrófagos e células endoteliais produzam L-arginina, a maior parte da sua síntese ocorre no fígado e nos rins, a partir da L-citrulina liberada pelo intestino como produto do metabolismo nitrogenado da glutamina (FEATHERSTON *et al.*, 1973; WU *et al.*, 2008). Como o fígado utiliza a maior parte da L-arginina produzida no ciclo de uréia, a manutenção dos níveis plasmáticos normais de L-arginina (80-120 $\mu\text{mol/L}$) será dependente da sua produção nos rins e ingestão na dieta (1-3 g/dia) (Figura 1). As principais fontes dietéticas de L-arginina são: soja, amêndoa, noz brasileira, castanha, pitu, carne e linguado (LORGERIL, 1997).

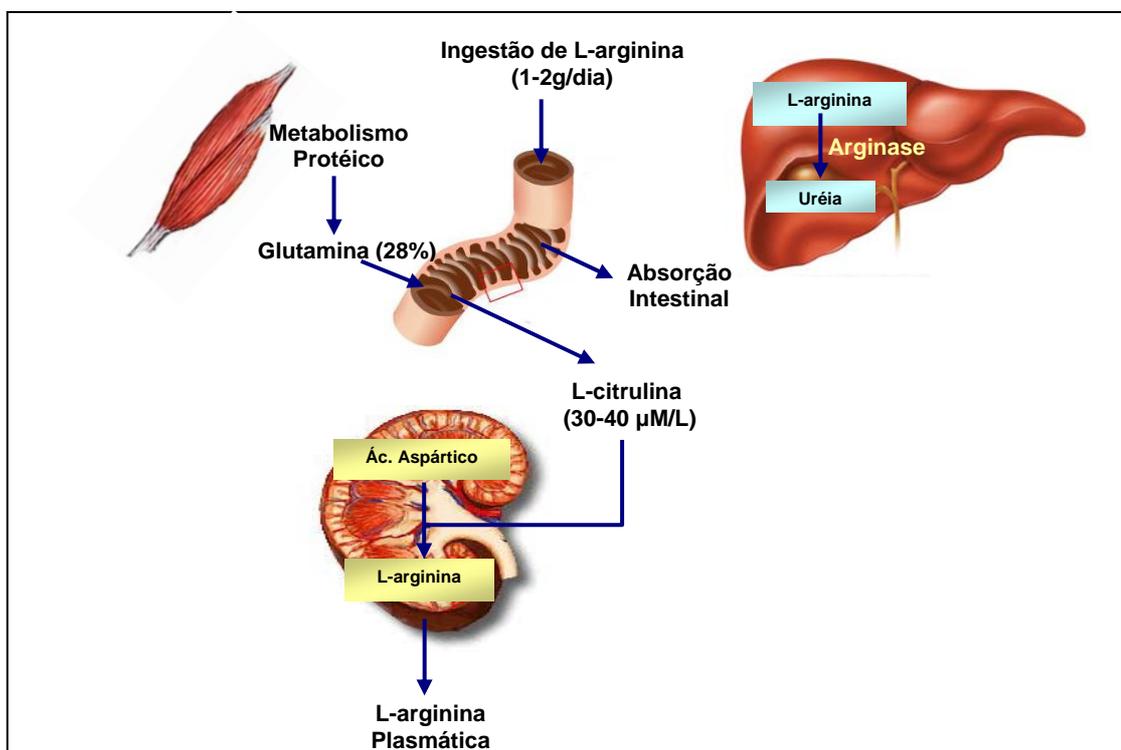


Figura 1. A síntese de L-arginina (Adaptada de REYES *et al.*, 1994).

A L-arginina regula o metabolismo de substratos de energia e a função de múltiplos órgãos, além de participar de uma série de funções fisiológicas, tais como: síntese protéica, biossíntese de aminoácidos e derivados, manutenção do balanço nitrogenado positivo, processo de crescimento, ativação da secreção em glândulas endócrinas (hipófise, pâncreas e adrenal), cicatrização de feridas e ativação da função imune (BARBUL, 1985; WU *et al.*, 2008).

A L-arginina pode exercer efeitos vasculares e inibir diretamente a adesão dos leucócitos na matriz não-endotelial, independente da síntese de NO (WU; MEININGER, 2000; TONG; BARBUL, 2004). Esse aminoácido também aumenta a polarização das membranas das células endoteliais, regula o pH sanguíneo e

intracelular (MORRIS, 2006), estimula a produção de plasmina e a fibrinogénólise (CYLWIK *et al.*, 2005). Como um antioxidante, a L-arginina diminui a liberação de ânions superóxido e a peroxidação lipídica (WU; MEININGER, 2000).

Nos vasos sanguíneos, a ação vasodilatadora do NO é essencial na regulação do tônus vascular. O NO estimula a proliferação e angiogênese das células endoteliais, sendo importante na cicatrização de feridas e microcirculação (KOPPLE, 2003). Além disso, o NO inibe a liberação de endotelina-1 pelas células endoteliais, diminui a adesão de leucócitos, a agregação e a adesão plaquetárias ao endotélio, a produção de superóxido, a expressão de moléculas de adesão das células vasculares e a apoptose das células endoteliais. Logo, o NO exerce efeitos no vasorrelaxamento vascular sistêmico e na angiogênese, além de ser considerado um fator antiaterogênico, antiproliferativo e antitrombótico (WU; MEININGER, 2000; HOENICKA; SCHMID, 2008).

Além de participar da produção de NO, a L-arginina é substrato para outras importantes vias metabólicas, como síntese da agmatina, creatina, ornitina e uréia (WU; MORRIS, 1998; CLOSS *et al.*, 2004; TONG; BARBUL, 2004; HUYNH; CHINDUSTING, 2006). Dentre estas, destaca-se a via da arginase, que catalisa a hidrólise da L-arginina à L-ornitina e à ureia (Figura 2). Outras duas enzimas envolvidas no seu metabolismo são a arginina:glicina amidinotransferase e arginina descarboxilase, envolvidas na síntese de creatina e na produção de L-agmatina, respectivamente (Figura 2) (MORRIS, 2004; CLOSS *et al.*, 2004).

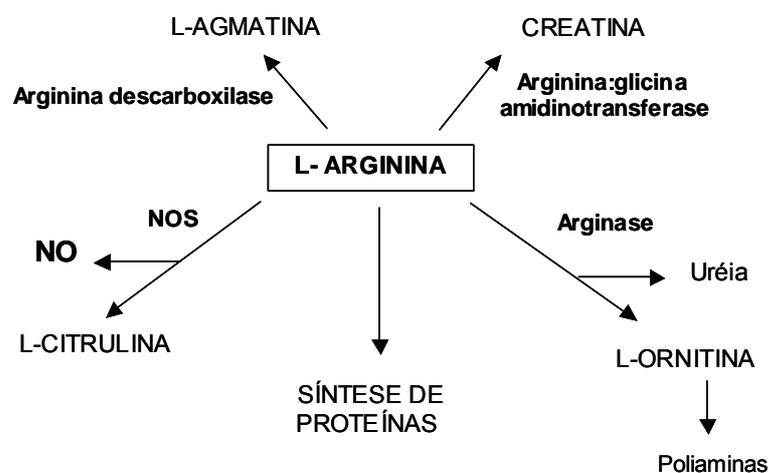


Figura 2. As vias metabólicas da L-arginina.

Foram identificadas duas formas genéticas da arginase, as quais diferem no que diz respeito à distribuição tecidual, à localização subcelular e à reatividade imunológica (JENKINSON; GRODY; CEDERBAUM, 1996). A arginase I é uma enzima citosólica, abundantemente expressa no fígado, responsável por catalisar a etapa final do ciclo da uréia nos hepatócitos, compreendendo o principal meio para eliminação de amônia. A arginase II, por sua vez, é uma proteína mitocondrial expressa em vários tecidos / células extra-hepáticos (rins, cérebro, monócitos e macrófagos) (MORRIS *et al.*, 1997). Nas plaquetas, foi detectada a arginase II (Raghavachari *et al.*, 2007), enquanto a arginase I está presente nas hemácias (VAN DE POLL *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2006; IKEMOTO *et al.*, 1989). Apesar de ambas as isoformas converterem L-arginina em uréia e ornitina, elas possuem propriedades bioquímicas distintas (MORRIS *et al.*, 1992).

É provável que a arginase possa ser essencial na regulação da síntese de NO ao modular as concentrações locais de L-arginina, competindo, desta forma, com a NOS pelo substrato em comum. Foi demonstrado que a inibição da arginase estimula a síntese de NO (CHICOINE *et al.*, 2004) e a expressão excessiva de arginase I ou II suprime a geração de NO nas células endoteliais (LI *et al.*, 2001). Essa hipótese é apoiada também por características bioquímicas de ambas. Embora a afinidade da L-arginina seja muito maior pela NOS purificada (K_m de aproximadamente 2-20 $\mu\text{mol/L}$) que pela arginase (K_m aproximado de 1000-5000 $\mu\text{mol/L}$), a atividade máxima da arginase é cerca de 1000 vezes superior que a da NOS, sugerindo taxas similares de utilização do substrato em concentrações fisiológicas de L-arginina (WU; MORRIS, 1998).

Diversos estudos mostram alterações da atividade e da expressão da arginase em doenças como HAS e IRC (DEMOUGEOT *et al.*, 2005), enquanto o papel da arginase na AN permanece uma área de especulação.

1.2 A via L-arginina – óxido nítrico e o seu paradoxo

Furchgott e Zawadzki (1980) descobriram que a acetilcolina promovia o relaxamento dos vasos apenas se o endotélio estivesse presente e intacto. Subsequentemente demonstraram que as células endoteliais estimuladas pela acetilcolina liberavam um vasodilatador, inicialmente denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), o qual atuava via estimulação do GMPc

e era inibido pela hemoglobina e azul de metileno (FURCHGOTT *et al.*, 1984). Em 1987, o EDRF foi identificado como sendo o NO (IGNARRO *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 2003).

O NO é produzido por diferentes tipos de células, nas quais pode afetar importantes processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, vasodilatação, atividade citotóxica do sistema imune e adesão e agregação plaquetárias (MONCADA *et al.*, 1991; MONCADA; HIGGS, 2006).

Nos mamíferos, o NO é sintetizado a partir do aminoácido catiônico L-arginina por uma família de NOS: Existem três isoformas de NOS: tipo I ou neuronal (nNOS), tipo II ou induzível (iNOS) e tipo III ou endotelial (eNOS), que são produtos de genes distintos, apesar de apresentarem semelhanças em suas propriedades químicas e enzimáticas (MENDES RIBEIRO *et al.*, 2001; CLOSS *et al.*, 2004; BRUNINI *et al.*, 2006; MONCADA; HIGGS, 2006) (Quadro1).

Quadro 1. Características principais das três isoformas da NOS (adaptado de LINCOLN *et al.*, 1997).

	nNOS ou tipo I	iNOS ou tipo II	eNOS ou tipo III
Primeira identificação	Neurônios	Macrófagos	Endotélio
Peso Molecular (kDa)	160	130	133
Localização cromossomial	12p24.2	17cen-q12	7q35-36
Função principal	Neurotransmissão	Imunocitotoxicidade	Relaxamento do músculo liso vascular
Níveis de produção de NO	pmoles	nmoles	pmoles
Regulação da expressão	Estimulada por hormônios sexuais, lesão do tecido nervoso e hipóxia Inibida por citocinas e endotoxina	Expressão induzida por citocinas e endotoxina	Estimulada por hormônios sexuais e stress de cisalhamento Inibida por citocinas e endotoxina e hipóxia

A calmodulina parece ser um fator chave na regulação da enzima através dos níveis de Ca^{++} . Sabe-se que a iNOS é, em parte, independente da regulação pelo Ca^{++} e liga-se completamente à calmodulina (CHO *et al.*, 1992). No entanto, eNOS e nNOS possuem uma alça que desestabiliza a ligação com a calmodulina em baixos níveis de Ca^{++} , reduzindo a atividade da enzima. Desta forma, pode-se afirmar que para que haja atividade máxima tanto da eNOS como da nNOS é necessária uma concentração mínima de Ca^{++} no interior da célula (FLEMING *et al.*, 1999).

Apesar de ser bem estabelecido o papel das três isoformas da enzima NOS, sabe-se que ocorre produção de NO na membrana mitocondrial de diversos tipos celulares como fígado e coração (GHAFOURIFAR *et al.*, 1997; KANAI *et al.*, 2001). A esta enzima tem sido dado o nome de NOS mitocondrial (mtNOS). Embora ainda não se saiba ao certo se a mtNOS é uma nova isoforma ou se é uma variante da nNOS, foi demonstrado que a mtNOS é uma proteína constitutiva, expressa na membrana interna da mitocôndria e que produz NO de forma dependente de Ca^{++} (TATOYAN *et al.*, 1998; ELFERING *et al.*, 2002, VALDEZ *et al.*, 2006).

Os principais fatores que irão determinar a atuação do NO como um mensageiro de funções fisiológicas ou como um agente citotóxico são a concentração de NO presente e o ambiente celular. Em condições fisiológicas, baixos níveis de NO produzidos pelas nNOS e eNOS irão ativar a guanilato ciclase, levando à produção de GMP_c , que está associada a uma série de processos fisiológicos como, por exemplo: relaxamento do músculo liso do vaso endotélio-dependente, inibição da agregação e adesão plaquetárias, e neurotransmissão (MONCADA *et al.*, 1997, HUYNH; CHIN-DUSTING, 2006). No entanto, em elevadas concentrações, especialmente na presença de superóxido, o NO pode inibir vários processos metabólicos pela depleção de energia na célula-alvo e causar dano direto no DNA (LINCOLN *et al.*, 1997; MONCADA; HIGGS, 2006). O mecanismo pelo qual os níveis elevados de GMP_c atenuam a agregação plaquetária não é conhecido, entretanto observa-se que o aumento de GMP_c causa sequestro de Ca^{++} , promovendo redução de Ca^{++} livre disponível para agregação (RADOMSKI *et al.*, 1990; HUYNH; CHIN- DUSTING, 2006).

A L-arginina é convertida a NO e L-citrulina pela NOS através de uma via com duas etapas, uma hidroxilação e uma redução, exigindo a presença de O_2 e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH) (GROSS, 1997;

HUNYNH; CHIN-DUSTING, 2006). A hidroxilação do nitrogênio guanidino terminal da L-arginina ocorre inicialmente e leva à formação de um intermediário que inibe competitivamente a arginase, a N° -hidroxi-L-arginina (LINCOLN, 1997; ASH, 2004). Outros co-fatores necessários para a síntese de NO são o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD), o mononucleotídeo flavina (FMN) e a tetrahidrobiopterina (BH4) (STUEHR, 2004).

Embora os níveis intracelulares normais de L-arginina sejam bem acima do K_m e, portanto, suficientes para sua síntese, a produção de óxido nítrico é dependente da ocorrência do transporte da L-arginina extracelular em diferentes tipos de células e condições patológicas, o que é denominado “paradoxo da via L-arginina-NO” (MANN *et al.*, 2003; BRUNINI *et al.*, 2005; BRUNINI *et al.*, 2003; HUNYNH; CHIN-DUSTING, 2006) (Figura 3).

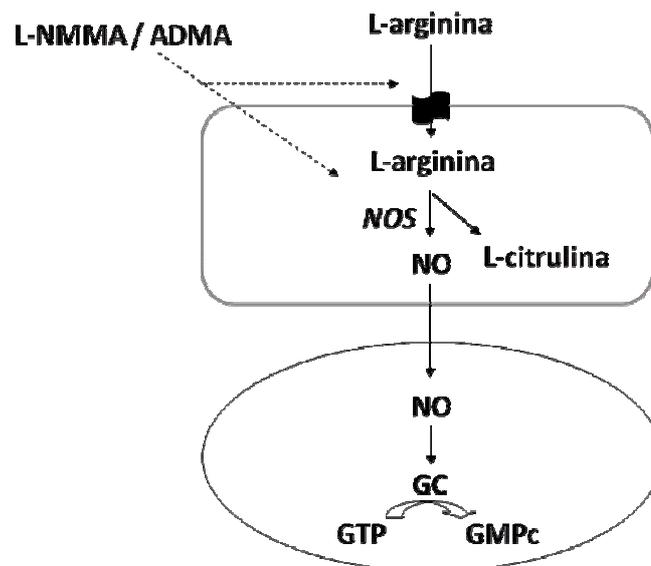


Figura 3. A via L-arginina-óxido nítrico-GMPc (Adaptado de MACALLISTER; VALLANCE, 1998). NOS=óxido nítrico sintase; GC=guanilato ciclase; GTP=guanosina trifosfato; GMPc= guanosina monofosfato cíclica

1.3 Caracterização da via L-arginina-NO em plaquetas e hemácias

Os aminoácidos catiônicos (arginina, lisina e ornitina) são transportados por proteínas mediadoras (carreadores). Em células de mamíferos, esse transporte

ocorre principalmente através de quatro sistemas: y^+ , y^+L , $B^{0,+}$ e $b^{0,+}$ (VAN WINKLE *et al.*, 1988 ; DEVÉS; BOYD, 1998 ; MENDES RIBEIRO *et al.*, 2001).

Por meio de estudos cinéticos, nosso grupo demonstrou previamente a primeira evidência de que o transporte de L-arginina em plaquetas humanas é mediado via sistema y^+L e não pelo clássico sistema de transporte de aminoácidos catiônicos, sistema y^+ (MENDES RIBEIRO *et al.*, 1999). O sistema y^+L foi identificado como um sistema de transporte de alta afinidade e baixa capacidade de transporte [$K_m=10 \mu M$] para aminoácidos catiônicos, que também transporta aminoácidos neutros com elevada afinidade na presença de Na^+ [$K_m= 10 \mu M$] (MENDES RIBEIRO *et al.*, 1999; DEVÉS *et al.*, 1992).

A atividade do sistema y^+L é mediada por no mínimo dois transportadores heterodiméricos: glicoproteína 4F2 (cadeia pesada) associada a um carreador de aminoácidos (cadeia leve), y^+LAT1 ou y^+LAT2 (Figura 4). A cadeia pesada (glicoproteína 4F2) é codificada pela família de genes SLC3, enquanto as cadeias leves (y^+LAT1 ou y^+LAT2) pertencem à família SLC7 (STEIN, 1996; DEVES; BOYD, 1998; CEREC *et al.*, 2006).

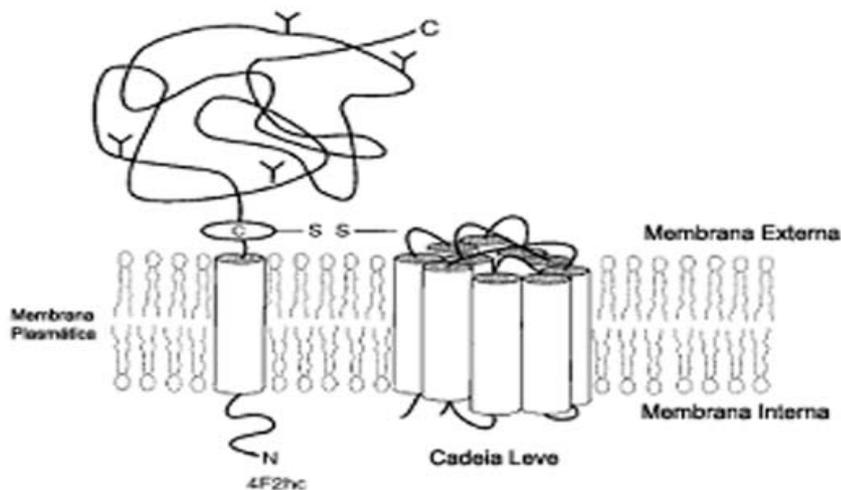


Figura 4. Modelo esquemático do sistema y^+L (Adaptado de DEVES; BOYD, 1998).

O transporte de L-arginina em hemácias humanas é mediado principalmente pelos sistemas y^+ e y^+L (ELLORY, 1982; DEVÉS *et al.*, 1992; BOYD; CRAWFORD, 1992; MENDES RIBEIRO *et al.*, 1997; HANSSEN *et al.*, 1997; MENDES RIBEIRO *et al.*, 2001). O sistema y^+ apresenta menor afinidade e maior capacidade para transportar aminoácidos catiônicos que o sistema y^+L (DEVÉS *et al.*, 1992; BOYD; CRAWFORD, 1992; MENDES RIBEIRO *et al.*, 2001).

O sistema y^+ foi descoberto por um estudo pioneiro iniciado no laboratório de Halvor Christensen, sendo caracterizado como Na^+ -independente e seletivo para aminoácidos catiônicos. Características adicionais do sistema y^+ são a insensibilidade ao pH e a potente ativação pela hiperpolarização e *trans*-estimulação (CHRISTENSEN; CULLEN, 1973).

Estudos de biologia molecular identificaram uma família de proteínas em ratos, codificadas por mCAT incluindo quatro proteínas homólogas que induzem a atividade do sistema y^+ . As proteínas clonadas são: mCAT-1 (alta afinidade, expressa em muitos tecidos e células, exceto fígado); mCAT-2A (variante do mCAT-1 de baixa afinidade, expressa predominantemente no fígado), mCAT 2B (isoforma induzível do mCAT-1, de alta afinidade, induzida em células T, macrófagos, pulmão e testículos) e mCAT-3 (expressa no tecido nervoso) (CLOSS *et al.*, 1993; MACLEOD *et al.*, 1994; CLOSS, 1996; CLOSS *et al.*, 1997; HOSOKAWA *et al.*, 1997). Em humanos, transportadores de aminoácidos catiônicos homólogos aos de ratos foram clonados e as proteínas codificadas como hCAT (YOSHIMOTO *et al.*, 1991; ALBRITTON *et al.*, 1992; CLOSS *et al.*, 1997). Inicialmente, hCAT-1 foi relatado em células T e células somáticas, e, mais recentemente, hCAT-2A e hCAT-2B foram isolados do fígado e da célula do hepatoma, respectivamente (YOSHIMOTO, 1991; ALBRITTON, 1992; CLOSS *et al.*, 1996). Diferentemente do mCAT-1 e mCAT-2B, que apresentam propriedades de transporte muito similares, o hCAT-1 tem afinidade por substrato três vezes maior e é mais sensível à *trans*-estimulação do que o hCAT-2B. O hCAT-2A também apresenta propriedades distintas, mostrando afinidade por substrato 10 a 30 vezes menor, sendo menos sensível à *trans*-estimulação (CLOSS *et al.*, 1997). O hCAT-3 foi identificado e é expresso principalmente no pâncreas, músculo esquelético, coração e placenta (SEBASTIO *et al.*, 1996; SEBASTIO *et al.*, 1997). Similar ao hCAT-1, a atividade do hCAT-3 é diminuída via redução das moléculas de transporte na membrana plasmática (ROTMANN *et al.*, 2006).

Van Winkle *et al.* estudando transporte em blastócitos de ratos distinguiram dois sistemas de transporte de aminoácidos catiônicos: $b^{0,+}$ e $B^{0,+}$. Ambos os sistemas transportam aminoácidos neutros e catiônicos, sendo os sistema $B^{0,+}$ Na^+ -dependente e o $b^{0,+}$ Na^+ -independente (SAIER, 2000; BRUNINI *et al.*, 2005).

As plaquetas expressam ambas as isoformas de NOS, endotelial e induzível (LINCOLN *et al.*, 1997; MENDES RIBEIRO *et al.*, 2001; MOSS *et al.*, 2004; DEMÉZIO

DA SILVA *et al.*, 2005). A via L-arginina-óxido nítrico foi demonstrada em plaquetas pela primeira vez por Radomski, Palmer e Moncada, envolvendo a isoforma da NOS Ca^{++} -dependente, eNOS (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1990). Posteriormente, Mehta *et al.* (1995) foram capazes de demonstrar a presença da isoforma óxido nítrico sintase induzível através da incubação das plaquetas com citocinas. Na ausência de Ca^{++} , a L-arginina foi convertida a citrulina e óxido nítrico, indicando a presença da iNOS, isoforma da NOS Ca^{++} -independente (MEHTA *et al.*, 1995).

As hemácias parecem conter tanto NOS induzível como endotelial (CHEN; MEHTA, 1998; DELICONSTANTINOS *et al.*, 1995). O NO liberado das hemácias afeta a fluidez da membrana e a deformabilidade das hemácias, o que é necessário para a passagem do sangue pela microvasculatura (KLEINBONGARD *et al.*, 2006). Similarmente às plaquetas, Kang *et al.* (2000) demonstraram a presença de NOS (induzível e endotelial) em hemácias humanas, mas não obtiveram resultados ao tentar demonstrar a atividade destas enzimas nas células circulantes de adultos normais, sugerindo assim que as hemácias tivessem NOS inativas. Ao contrário deste estudo, Kleinbongard *et al.* (2006), evidenciaram que as hemácias humanas expressam a NOS endotelial ativa e funcional, sendo localizada na membrana plasmática e no citoplasma das hemácias. Análises adicionais demonstraram ainda que esta enzima parece estar localizada apenas na parte interna da membrana das hemácias. Entretanto, o mesmo grupo não detectou as isoformas induzível e neuronal nas hemácias. Devido a essas controvérsias, a presença, localização e atividade da NOS nas hemácias humanas permanece incerta.

1.4 Estresse oxidativo

A biodisponibilidade de NO depende não somente da sua síntese como também da sua degradação, mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o ânion superóxido. Este ânion, ao reagir com o NO, produz o oxidante peroxinitrito, reduzindo a biodisponibilidade do NO (GRYGLEWSKI; PALMER; MONCADA, 1986; ZHANG *et al.*, 2009).

Os radicais livres podem ser descritos como átomos ou moléculas altamente reativas que contêm um número ímpar de elétrons na sua última cadeia eletrônica.

O termo radical livre, contudo, não é o ideal para designar os agentes reativos patogênicos, uma vez que nem todos possuem elétrons não pareados em sua última camada, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KOPÁNI *et al.*, 2006). Visto que a maioria desses agentes é derivada do metabolismo aeróbio, são denominadas EROs. Em condições fisiológicas normais, durante o metabolismo aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, resultando na formação de H_2O . No decorrer desse processo, são formados intermediários reativos, que são os radicais O_2^- , hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 5). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada de quatro elétrons.

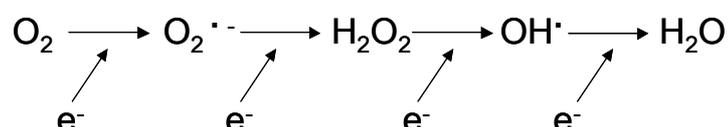


Figura 5. Redução tetravalente do O_2 com formação das espécies reativas de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxila (OH).

As células contêm mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos contra a alta reatividade das EROs (SEDDON; LOOI; SHAH, 2007). A primeira linha de defesa compreende os mecanismos intracelulares enzimáticos, incluindo a superóxido desmutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px) (NAKAMURA; OMAZE, 2008; BALLATORI, 2009). Outras substâncias antioxidantes são as vitaminas E (tocoferol) e C (ácido ascórbico). O tocoferol confere proteção à membrana celular ao atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a peroxidação e o ácido ascórbico neutraliza diretamente as EROs (BAHIA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2008).

Um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de EROs acarreta o estresse oxidativo. Os efeitos tóxicos do O_2 são resultantes da oxidação de componentes celulares como os tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados (iniciando a peroxidação lipídica) (INAGI, 2006; BAHIA *et al.*, 2006). O processo de peroxidação lipídica afeta primariamente as membranas celulares e, ao afetar a sua estrutura, compromete a seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias

tóxicas à célula, podendo, em última instância, levar à alteração do DNA, formação de produtos citotóxicos e morte celular (BENZIE, 1996; BARBOSA *et al.*, 2008).

As EROs estimulam a proliferação celular e podem aumentar o efeito proliferativo e vasoconstritor da angiotensina II, através da inativação do NO, agente antiproliferativo e vasodilatador. A angiotensina II, por sua vez, causa vasoconstrição e liberação de endotelina, além da geração de EROs. A célula endotelial pode gerar ânion superóxido através da angiotensina II, da LDL oxidada, da eNOS, da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias e das oxidases vasculares (NADPH Oxidase) (FRIDOVICH, 1999; DA LUZ, 2005; BAHIA *et al.*, 2006; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008).

1.5 Anorexia nervosa (AN)

1.5.1 Definição

A AN é definida como sendo uma condição caracterizada por autoinanição voluntária e perda de peso, que é considerada pelo paciente como um sinal de alcance extraordinário de autodisciplina, enquanto o ganho de peso é percebido como uma perda inaceitável de autocontrole (SCHEBENDACH; ANDERSON, 2005). Outra definição aceita para AN seria de uma doença mental potencialmente séria, tendo como característica fundamental a perda acentuada de peso por restrição alimentar (ROYAL AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND COLLEGE OF PSYCHIATRISTS, 2004).

Paul-Laurent Assoun, baseado na psicanálise, enfoca a anorexia como uma síndrome histérica que exprime algo essencial da feminilidade:

A anoréxica apresenta um espetáculo que responde à perplexidade de Freud, já que, em sua pretensão fantasística, ela é aquela que, por excelência, sabe o que quer(...)Na verdade, o que ela não sabe é que esse querer férreo se apoia numa negação do desejo. Donde a forma peculiar de Verleugnung (renegação) que confere a essa estrutura neurótica sua coloração perversa. O querer garante a presunção do saber absoluto, mas esse corpo subjogado constitui uma barreira para algo que não quer se expressar, que é o desejo pelo outro (AUSSON, 1993).

1.5.2 Etiologia

Atualmente, a natureza multifatorial da etiologia dos transtornos alimentares é amplamente reconhecida (NUNES, 2006), incluindo uma diversidade de fatores que interagem entre si de modo complexo para produzir e, muitas vezes, perpetuar a

doença. Estes fatores podem ser divididos em fatores predisponentes, precipitantes e mantenedores da AN (COOPER, 1995).

Os fatores predisponentes são aqueles que aumentam a probabilidade de aparecimento da AN, mas não a tornam inevitável. Estes são categorizados em três grupos: individual, familiar/hereditário e sócio-cultural (MORGAN, 2002). Já os fatores precipitantes são aqueles que marcam o aparecimento dos sintomas da AN. A dieta para emagrecer é o mais freqüente deles, mas isoladamente não é suficiente para produzir esse transtorno, precisando interagir com os fatores predisponentes (CLAUDINO; ZANELLA, 2005). Por fim, os fatores mantenedores irão determinar se o transtorno vai perpetuar ou não. Estes fatores incluem o papel das alterações fisiológicas e psicológicas produzidas pela desnutrição e pelos constantes episódios de compulsão alimentar e purgação. (MORGAN, 2002; CLAUDINO; ZANELLA, 2005).

1.5.3 Epidemiologia

A epidemiologia da AN não se encontra completamente estabelecida, pois o diagnóstico e a notificação dos casos são comprometidos pelo fato de o próprio paciente, geralmente, não se considerar doente (NARDI; BUENO, 2002).

Esse transtorno ocorre preferencialmente em mulheres jovens, sendo raro em indivíduos negros (HUSE; LUCAS, 2003). Estudos clínicos demonstraram que somente 5 a 10% dos pacientes são do sexo masculino, com uma taxa de incidência em torno de 8: 100.000 habitantes por ano e prevalência pontual em mulheres jovens ocidentais de aproximadamente 0,3%, o que equivale a 3 casos para cada 1.000 mulheres nessa população (CLAUDINO; ZANELLA, 2005). Uma incidência média anual na população em geral de 18,5: 100.000 (DP= 21,01) entre mulheres e de 2,25: 100.000 (DP= 2,63) por ano entre homens foi evidenciada por uma revisão sistemática de 12 estudos (PAWLUCK, 1998).

O início dos primeiros sintomas da AN ocorre de forma bimodal, entre 13-14 e 17-18 anos (SALVADOR, 2004). O sexo masculino costuma desenvolver o transtorno alimentar mais tardiamente do que o sexo feminino, uma vez que a puberdade começa e termina cerca de um ano e meio a dois anos mais tarde nos meninos que nas meninas (MELIN; ARAÚJO, 2002).

A maior parte dos pacientes com AN se encontra em classes sociais mais elevadas (SALVADOR, 2004). A AN parece mais prevalente em países industrializados que adotam e idealizam o tipo corporal magro, como Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Europa, Austrália, Japão e Nova Zelândia (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000b), ao contrário de algumas sociedades não-ocidentais, que valorizam como belo o excesso de peso (MILLER; PUMARIEGA, 2001). Recentemente, uma revisão sugeriu que a AN está sendo identificada mesmo em países em desenvolvimento do terceiro mundo (MILLER; PUMARIEGA, 2001). Em outro estudo de revisão bibliográfica sobre a prevalência dos transtornos alimentares, foi demonstrado que a prevalência de AN em países ocidentais varia de 0,1% a 5,7%, enquanto a prevalência é muito menor nos países orientais e varia de 0,002% a 0,9% (MAKINO; TSUBOL; DENNERSTEIN, 2004).

A taxa de mortalidade na AN é bastante alta quando comparada a de indivíduos de mesma idade e sexo sem AN, podendo alcançar 21% (CLAUDINO; ZANELLA, 2005). Uma meta-análise sobre AN realizada por Steinhausen, incluiu 119 artigos e concluiu que o início da desordem durante a adolescência estava associado a uma menor taxa de mortalidade, sendo a idade na qual se iniciou o transtorno mais importante que a duração do mesmo. Essa revisão também sugeriu que existem mais mortes por suicídios e outras causas desconhecidas do que mortes relacionadas diretamente à AN (STEINHAUSEN, 2002).

1.5.4 Diagnóstico

O diagnóstico de AN não é uma tarefa difícil. Deve-se suspeitar desse transtorno quando a perda de peso não possa ser explicada por doença física (HUSE; LUCAS, 2003). Os critérios diagnósticos para AN segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (DSM-IV.TR, 2002) e a 10ª edição da Classificação Internacional de Doenças (OMS - CID-10, 1993) são apresentados nos quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2. Critérios diagnósticos para AN, segundo o DSM.IV.TR (2002)

A. Recusa a manter o peso corporal em um nível igual ou acima do mínimo normal adequado à idade e à altura ($\geq 85\%$ do esperado).
B. Medo intenso de ganhar peso ou de se tornar obeso, mesmo estando com peso abaixo do normal.
C. Perturbação no modo de vivenciar o peso ou a forma do corpo, influência indevida do peso ou da forma do corpo sobre a autoavaliação, ou negação do baixo peso corporal atual.
D. As mulheres pós-menarca podem apresentar amenorréia, isto é, ausência de pelo menos três ciclos menstruais consecutivos.

Quadro 3. Critérios diagnósticos para AN, segundo a CID-10 (1993)

a) Peso corporal mantido em pelo menos 15% abaixo do esperado ou Índice de Massa Corporal (IMC) = $17,5 \text{ Kg/m}^2$ ou menos.
b) Perda de peso autoinduzida por abstenção de “alimentos que engordam” e um ou mais do que se segue: vômitos autoinduzidos; purgação autoinduzida; exercício excessivo; uso de anorexígenos e/ou diuréticos.
c) Distorção da imagem corporal.
d) Transtorno endócrino generalizado envolvendo o eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonadal que se manifesta, por exemplo, como amenorréia nas mulheres e como perda do interesse e potência sexual nos homens.
e) Se o início é pré-puberal, a sequência de eventos da puberdade é demorada ou mesmo retardada.

O DSM.IV.TR (2002) propõe uma classificação para AN em subtipos de acordo com a presença ou ausência de compulsões periódicas ou purgações regulares durante o episódio atual de AN.

SUBTIPO RESTRITIVO – caracteriza-se por perda de peso alcançada principalmente através de dietas, jejuns ou exercícios excessivos. Durante a perda de peso, esses indivíduos não se envolvem, com regularidades, em compulsões periódicas ou purgações.

SUBTIPO COMPULSÃO PERIÓDICA / PURGATIVO – quando o indivíduo se envolve regularmente em compulsões periódicas ou purgações durante a perda de peso.

1.5.5 Características Clínicas

Uma das características clínicas mais notável em pacientes com AN é a sua constituição física caquética pré-pubescente, que faz com que pareçam mais jovens do que são. Bradicardia (frequência cardíaca abaixo de 60 batimentos por minuto) e hipotensão importante (pressão arterial sistólica abaixo de 70 mmHg) estão frequentemente presentes. Os pacientes são hipotérmicos e geralmente usam mais roupas que o apropriado ao ambiente (SCHEBENDACH; ANDERSON, 2005).

O amarelamento da pele, associado à hiper胡萝卜素emia, é evidenciado em alguns pacientes com AN, bem como a hipertrofia das glândulas salivares, particularmente das glândulas parótidas (SCHEBENDACH; ANDERSON, 2005). Os indivíduos que induzem vômito podem ter erosão do esmalte dentário e alguns têm cicatrizes ou calos no dorso das mãos, causados pelo contato com os dentes quando as utilizam para induzir o vômito (DSM.IV.TR, 2002). As unhas desses pacientes podem se encontrar quebradiças e com crescimento lento, favorecendo o desenvolvimento de onicomicoses (ASSUMPÇÃO; CABRAL, 2002). Outros sinais e sintomas físicos, bioquímicos e hematológicos presentes com frequência nos pacientes com AN são: tontura; cabelo seco e quebradiço; diminuição de leucócitos e glicose, e aumento do colesterol; constipação; acrocianose; amenorréia; perda muscular; diminuição dos reflexos tendíneos profundos (RTP); osteoporose; pele seca; edema; e retardo no crescimento (SCHEBENDACH; ANDERSON, 2005).

Os pacientes com AN podem apresentar certo grau de deficiência neuropsicológica, incluindo anormalidades na velocidade psicomotora, aumento da atenção seletiva para informação relacionada à comida e à aparência, e déficits na atenção, na visão de espaço e na visão construtiva. Os déficits na função cognitiva desses pacientes podem estar associados à restrição alimentar e às alterações biológicas consequentes da acentuada perda de peso (DUSHESNE, 2004).

1.5.6 Complicações Clínicas

Embora os transtornos alimentares sejam classificados dentro das enfermidades psiquiátricas, estão associados a várias complicações clínicas e a taxas de morbidade e de mortalidade consideráveis. Dependendo da extensão e da gravidade dessas complicações clínicas, as mesmas podem causar efeitos letais para o indivíduo (NUNES *et al.*, 2006).

Os pacientes com AN desenvolvem complicações clínicas a nível endócrino, cardiovascular, ósseo, hidroeletrolítico, hematológico, pulmonar, renal, gastrointestinal e metabólico (SCHEBENDACH; ANDERSON, 2005) (Quadro 4).

Quadro 4. Complicações clínicas da AN.

	COMPLICAÇÃO
CARDIOVASCULAR	↓ Frequência cardíaca ↓ Pressão arterial ↓ Massa ventricular esquerda ↑ Agregação plaquetária
ENDÓCRINA	Síndrome de baixa quantidade de T ₃ Hormônios sexuais
GASTRINTESTINAL	Constipação intestinal ↓ Esvaziamento gástrico ↓ Motilidade intestinal
ÓSSEA	Osteopenia Osteoporose
METABÓLICA	↑ Colesterol sérico ↓ Glicose sérica ↓ Taxa de metabolismo basal
HEMATOLÓGICA	Leucopenia Anemia Trombocitopenia
PULMONAR	Edema agudo de pulmão Pneumonia de aspiração
HIDROELETROLÍTICA	Hipopotassemia Desidratação Hipocloremia Hipomagnesemia
RENAL	↓ Concentração urinária Azotemia pré-renal Cálculos renais

1.5.7 Prognóstico

O curso e a evolução da AN são extremamente variáveis (HUSE; LUCAS, 2003), estando tal transtorno associado à mortalidade mais elevada de todas as doenças psiquiátricas. A taxa de mortalidade varia de 5% a 15% (BROWN; MEHLER; HARRIS, 2000; WALSH *et al.*, 2000).

O suicídio é a maior causa de morte entre as pessoas com AN (BULIK *et al.*, 2008). Franko e Keel (2006) revisaram extensivamente artigos publicados sobre suicídio e tentativa de suicídio em pessoas com transtornos alimentares, e verificaram que a tentativa de suicídio é observada em 3 a 20% dos pacientes com AN. Pompili *et al.* (2005) revisaram nove estudos de suicídio em AN e constataram que o número de suicídios foi oito vezes maior nas pessoas com AN que na população geral de mulheres jovens (14 – 25 anos).

O tratamento precoce e mais eficaz da AN tem levado à diminuição da mortalidade, mas os estudos de acompanhamento sugerem que dois terços dos pacientes terão preocupações mórbidas e contínuas com relação ao alimento e ao peso (APA, 2000b).

Em uma revisão bibliográfica com mais de cem estudos, foi evidenciado que somente cerca de 50% das pacientes se recuperam totalmente. Outros 30% experimentam uma recuperação parcial caracterizada por algum tipo de resíduo ou distúrbio no comportamento alimentar e por falta de habilidade para manter o peso. Finalmente, nos 20% restantes, a doença assume uma forma crônica, não apresentando qualquer sinal de remissão (ABREU; FILHO, 2004).

Os melhores fatores preditivos para a recuperação são a taxa de ganho de peso corporal ideal e a duração do quadro de anorexia (HERZOG *et al.*, 1993), além do início do tratamento próximo ao surgimento dos sintomas, o amadurecimento pessoal e os tratamentos que promovam atmosfera acolhedora e compreensiva (CLAUDINO; ZANELLA, 2005).

1.6 A via L-arginina-óxido nítrico, estresse oxidativo e AN

Uma das principais características clínicas da AN é a redução da ingestão alimentar levando a uma constituição física caquética, que é vista distorcidamente como excesso de peso pelos pacientes acometidos por tal transtorno

(SCHEBENDACH; MAYER; DEVLIN, 2008). O NO é um neurotransmissor envolvido na regulação do balanço energético corporal e na ingestão alimentar. A maioria de suas ações se deve à produção do GMPc através da ativação da GC (NELSON; CHIAVEGATTO, 2001; NISOLI *et al.*, 2003).

O NO participa na regulação do apetite. Morley e Flood (1994) demonstraram que uma única administração do inibidor da NOS N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) em ratos privados de alimentação reduziu, a curto prazo, a ingestão alimentar. Estudos subsequentes sobre o controle alimentar em ratos (SQUADRITO *et al.*, 1993) e galinhas (CHOI *et al.*, 1994) resultaram em observações semelhantes, mostrando que o NO participa no controle do comportamento alimentar.

Em contraste com os estudos anteriores, Vozzo *et al.* (1999) demonstraram que os análogos da L-arginina N^G-Monometil-L-Arginina (L-NMMA) e N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) não exercem efeito no apetite ou na ingestão alimentar de humanos a curto prazo. O mesmo grupo sugere que a discrepância aparente entre a supressão de ingestão alimentar em animais pela administração de análogos da L-arginina e a ausência de tal efeito em humanos pode ser devido a diferenças de espécies (VOZZO *et al.*, 1999). Portanto, há necessidade de mais estudos para validação da associação do NO com a regulação da ingestão alimentar em humanos.

Com relação às complicações cardiovasculares, ocorrem alterações a nível plaquetário em pacientes com AN, tais como mudanças na atividade dos α e β adrenoreceptores nas plaquetas – estimulação e inibição, respectivamente – e aumento da liberação de tromboxano A₂, o que resulta num estado de hiperagregabilidade das plaquetas induzidas pela adrenalina (GILL *et al.*, 1992; MIKHAILIDIS *et al.*, 2004). Entretanto, não existem estudos da via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de pacientes com AN.

Os radicais livres são constantemente produzidos como consequência de reações endógenas. Supõe-se que a produção de radicais livres em excesso possa ser um mecanismo patogênico importante para a desnutrição na AN (ROEDIGER, 1995; SHARDA, 2006). Além de ser uma situação crônica de estresse físico e psicológico, com produção excessiva de radicais livres, a AN envolve a ingestão insuficiente de vitaminas antioxidantes e oligoelementos que são cofatores de enzimas antioxidantes, bem como uma concentração deficiente de certos substratos, como a glutatona (MOYANO *et al.*, 1999).

Moyano *et al.* sugere certo grau de dano oxidativo na AN, que leva à inativação e ao prejuízo do desempenho cardioprotetor do NO (Moyano et al., 1997; Inagi, 2006). Esta alteração pode causar a morte pacientes com anorexia nervosa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar a atividade da via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas e hemácias de pacientes com AN, bem como avaliar a expressão da enzima óxido nítrico sintase, o ciclo da uréia, a função plaquetária e o estresse oxidativo.

2.2 Objetivos específicos nas plaquetas

- Estudar o transporte de L-arginina;
- Avaliar a expressão das isoformas da enzima NOS;
- Analisar a atividade total das NOS;
- Determinar as concentrações intraplaquetárias de GMPc;
- Investigar a agregação plaquetária e sua relação com a via L-arginina-NO-GMPc;
- Quantificar a presença do estresse oxidativo.

2.3 Objetivos específicos nas hemácias

- Avaliar a expressão das isoformas da enzima NOS;
- Analisar a atividade da NOS;
- Investigar a atividade da arginase;
- Quantificar a presença do estresse oxidativo.

2.4 Objetivos específicos sistemicamente

- Quantificar a presença do estresse oxidativo;
- Determinar o perfil de aminoácidos.

3. METODOLOGIA

3.1 Seleção de controles e pacientes

Participaram do estudo 11 pacientes com AN e 12 indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade. Os pacientes eram provenientes do Núcleo de Estudos e Saúde do Adolescente (NESA) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)/UERJ.

Os critérios de exclusão foram cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, diabetes mellitus, transfusão recente, infecção e uso de medicamentos antiagregante plaquetários.

O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (processo 1485-CEP/HUPE) (Anexo 1), e o consentimento dos pacientes (Anexo 2).

3.2 Avaliação clínica e laboratorial

Os dados clínicos necessários ao estudo referentes aos pacientes foram coletados utilizando-se o Protocolo de Avaliação dos Distúrbios Alimentares e o Protocolo do Laboratório de Transporte de Membrana criado previamente (Anexos 3 e 4, respectivamente). As avaliações bioquímicas e hematológicas foram feitas no laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Tabela 1. Dados clínicos de indivíduos controles e pacientes com AN

Dados	Controles	Pacientes com AN
Idade (anos)	16,25 ± 0,57	15,09 ± 0,57
Índice de Massa Corporal (Kg/m ²)	19,94 ± 0,47	15,15 ± 0,69 *
Hematócrito (%)	39,56 ± 0,79	38,37 ± 0,98
Hemoglobina (g/dL)	13,45 ± 0,26	12,80 ± 0,33
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	252,2 ± 14,83	257,9 ± 22,40
Uréia (mmol/L)	25,80 ± 2,42	19,00 ± 2,71
Creatinina (mmol/L)	0,75 ± 0,04	0,74 ± 0,01
Sódio (mmol/L)	135,2 ± 1,85	140,3 ± 1,22 *
Potássio (mmol/L)	4,10 ± 0,10	4,20 ± 0,06
Albumina (g/dL)	4,85 ± 0,20	4,72 ± 0,11
Glicose (mg/dL)	85,73 ± 2,11	83,11 ± 5,25
Colesterol total (mg/dL)	161,7 ± 8,44	157,9 ± 17,98
Triglicerídeos (mg/dL)	73,45 ± 7,17	77,83 ± 30,63
Transaminase glutâmico oxalacética -TGO (U/L)	18,20 ± 1,98	22,44 ± 2,52
Transaminase glutâmico pirúvica - TGP (U/L)	13,00 ± 3,89	19,50 ± 6,49

*p<0,05

3.3 Isolamento e preparo das plaquetas

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção e transferidas para tubos de polipropileno, nos quais o sangue foi misturado com anticoagulante ACD (Quadro 5). Todas as etapas de isolamento e preparo das plaquetas foram realizadas em temperatura ambiente. A primeira centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804 R) das amostras foi realizada durante 15 minutos a 200g, para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o plasma rico em plaquetas foi transferido para tubos de polipropileno e centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 900g por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e as plaquetas ressuspensas em solução Kreb's (mmol) (Quadro 6).

Quadro 5. Composição do anticoagulante ACD

	mM	g/L
Citrato trisódico	85,9	25
Ácido cítrico	73,7	15
Glicose	111	20

pH=4

Quadro 6. Composição da solução de Kreb's

	mM	g/L
NaCl	119	6,954
MgCl ₂	1,2	0,244
KCL	4,6	0,343
CaCl ₂	1,5	0,187
NaHCO ₃	15	1,26
Glicose	11	1,98
NaH ₂ PO ₄	1,2	0,187

pH=7,4

3.4 Preparo das hemácias

O sangue foi coletado por venopunção e transferido para tubos de polipropileno, nos quais o mesmo foi misturado com anticoagulante ACD. A primeira centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804 R) foi realizada durante 15 minutos a 200g, para a separação do plasma. As hemácias foram lavadas com solução salina (Quadro 7) e centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5804 R) três vezes em 2000g durante 5 minutos. As hemácias foram utilizadas imediatamente ou dentro das 24 horas seguintes.

Quadro 7. Composição da solução Salina

	mM	g/L
NaCl	145	8.47
MOPS	10	2.09
Glicose	5	0.9

pH= 7,4

3.5 Transporte de L-arginina em plaquetas

Os influxos de L-arginina foram realizados de acordo com um protocolo estabelecido no grupo do Laboratório de Transporte de Membrana há mais de 10 anos (MENDES RIBEIRO *et al.*, 1999). Para os experimentos de transporte de L-arginina em plaquetas, uma concentração de L-leucina (10 μM) foi usada para inibir competitivamente o sistema de transporte y^+L . Em seguida, L-arginina tritiada (1-50 μM) foi adicionada à suspensão de plaquetas, que foi incubada por 5 minutos a 37°C. O sangue foi então centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804 C) rapidamente e lavado com Krebs's, as células lisadas com Triton X-100 (Sigma) e a radioatividade foram contadas em um analisador de cintilação (Bekman-Coulter).

3.6 Análise cinética

A cinética de um transporte mediado por um carregador é a expressão da equação de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{[S] \cdot V_{\max}}{K_m + [S]}$$

Na qual:

V= velocidade do fluxo

V_{\max} = velocidade máxima do fluxo

[S] = concentração do substrato

K_m = concentração do substrato que corresponde à metade do V_{\max}

Para o cálculo da equação de Michaelis-Menten e para determinar o V_{\max} e K_m , foi utilizado o programa comercial Enzfitter (Elsevier).

3.7 Mensuração da GPMc intracelular

Inicialmente, as plaquetas foram pré-incubadas com 200 μM de IBMX (inibidor de fosfodiesterase) por 30 minutos. Em seguida, o ácido perclórico foi adicionado à suspensão de plaquetas, as células foram lisadas em ultrassom (MaxiClean 1400), por 15 minutos, e, a seguir, congeladas rapidamente em nitrogênio. Posteriormente,

as células fragmentadas passaram por uma centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5417 C), 2000g por 20 minutos. Os sobrenadantes contendo GMPc foram coletados e estocados a -80°C , até a leitura por um ensaio enzimático utilizando o método ELISA (Kit Cayman – Biotrak II, GE Health - EUA).

3.8 Análise da atividade da NOS plaquetária

A atividade basal da NOS foi avaliada em plaquetas de pacientes com AN e controles pela conversão de L-[^3H]-arginina em L-[^3H]-citrulina. L-[^3H]-arginina foi adicionada à suspensão de plaquetas, que foi incubada por 45 minutos a 37°C . A reação foi interrompida por rápida centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5417 C), seguida por lavagem com solução de Krebs. As plaquetas foram lisadas com Triton (Sigma) e transferidas para uma coluna contendo a resina Dowex (Sigma). A L-[^3H]-citrulina foi removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade contada.

3.9 Análise da atividade da NOS em hemácias

A atividade basal da NOS foi avaliada em hemácias pela conversão de L-[^3H]-arginina em L-[^3H]-citrulina (BRUNINI *et al.*, 2003). L-[^3H]-arginina foi adicionada à suspensão de hemácias, que foi incubada por 2 horas a 37°C . A reação foi interrompida por rápida centrifugação, seguida por lavagem com solução de MgCl (Quadro 8), por duas vezes. As hemácias foram lisadas com Triton X-100 (Sigma) e as proteínas precipitadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (Sigma). Após nova centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5417 C), o sobrenadante foi transferido para uma coluna contendo a resina catiônica Dowex (Sigma). A L-[^3H]-citrulina foi removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade contada.

Quadro 8. Composição da solução de Magnésio

	mM	g/L
MgCl_2	107	21.75
MOPS	10	2.09

pH=7.4

3.10 Extração de proteína e Western Blotting

Foi avaliada a expressão das isoformas endotelial e induzível da NOS em plaquetas e hemácias através de Western Blotting.

As proteínas foram extraídas a partir do isolamento de plaquetas e hemácias de pacientes e controles por centrifugação. A dissolução dos pellets de plaquetas e hemácias foi realizada em tampão de extração de proteínas (Quadro 9) contendo inibidores de proteases (*Protease inhibitor Cocktail* – Sigma EUA), seguida por rápido congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido. Então as amostras foram submetidas a um banho de ultrassom (MaxiClean 1400) por 15 minutos e centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5417 C) a 2000g por 15 minutos a 4°C para a remoção de debris celulares e o sobrenadante foi armazenado a -80°C até a sua utilização.

Os ensaios de western blotting foram realizados com 20 µg de proteína dos lisados de plaquetas e hemácias suspensos em tampão de amostra (Quadro 10) após desnaturação das proteínas por encubação a 90°C por 10 minutos.

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida NuPAGE® Novex Bis-Tris 10% (Invitrogen - CA), e as proteínas separadas por eletroforese a 200V por 60 minutos, utilizando-se tampão de corrida (Quadro 11). A transferência para as membranas de PVDF (Invitrogen - CA) foi feita em tampão de transferência (Quadro 12) com voltagem de 40V por 3h para os ensaios de NOS.

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais para eNOS e iNOS (BD Biosciences – UK) na concentração de 1:1000 e anticorpos para β-Tubulina (Santa Cruz Biotechnology; 1:500). O procedimento empregado para detecção, por sua vez, foi o sistema baseado em quimioluminescência Westenbreeze (Invitrogen - CA). Foram utilizados como padrão de peso molecular o Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (GE Healthcare – EUA) e como controles positivos lisados de macrófagos e células endoteliais, rim e fígado (BD Biosciences Pharmingen).

As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o programa Adobe Photoshop 7.0.

Quadro 9. Composição do tampão de extração de proteínas

Reagente	Concentração
NP-40	1%
Tris-HCl	20 mM
NaCl	400 mM
EDTA	1 mM

pH = 7,5

Quadro 10. Composição do tampão de amostra

Reagente	Concentração
Tris	200 mM
SDS	8%
Glicerol	40%
β -mercaptoetanol	8%
Azul de bromofenol	0,4%

pH= 6,8

Quadro 11. Composição do tampão de corrida

Reagente	Concentração
Tris	250 mM
Glicina	1,92 M
SDS	1%

Quadro 12. Composição do tampão de transferência

Reagente	Concentração
Glicina	0,2 M
Tris	25 mM
SDS	0,1%
Etanol	18%

3.11 Dosagem de aminoácidos

A concentração de aminoácidos foi dosada pelo laboratório DLE Medicina Laboratorial, através do método de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), utilizando plasma heparinizado.

3.12 Atividade da arginase

A atividade da arginase foi avaliada em hemácias de pacientes e controles. As hemácias foram isoladas por centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804 R) e submetidas a um tampão de lise (Quadro 13) contendo inibidores de proteases, seguido por um processo de ruptura das células por ultrassom (MaxiClean 1400). As

amostras foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5417 C) a 2000g por 15 minutos a 4°C, para a retirada de debris celulares, e o sobrenadante foi armazenado para dosagem de proteína.

Uma alíquota do lisado de hemácias foi incubada com uma solução de cofatores da arginase (Tris-HCl 9mM, MnCl₂ 1 mM) e [C¹⁴]-L-arginina 100 µM por 2 horas a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de solução de uréia 100 mM e acetato de sódio 250 mM a 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma coluna contendo resina Dowex 50W-X8 (Sigma) para remover a arginina não metabolizada e a [C¹⁴]-uréia foi quantificada pela leitura em um contador de cintilação (Bekman-Coulter).

Quadro13. Composição do tampão de lise

Reagente	Concentração
Tris-HCl	50 mM
CHAPS	10 mM
EDTA	2 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Pepstatina	1 µM
Leupeptina	2 µM

pH = 7,4

3.13 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como um marcador de peroxidação lipídica, a formação das TBARS foi utilizada durante uma reação de aquecimento do ácido tiobarbitúrico, como descrito anteriormente por Draper *et al.* (1993). Resumidamente, as amostras de plaquetas, soro e hemácias foram misturadas com 1mL de ácido tricloroacético 10% e 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e, depois, foram aquecidas em um banho de água fervente durante 30 minutos. As TBARS foram determinadas através da absorbância a 532 nm (Biotrak II, GE Health - EUA) e foram expressas como equivalentes de malondialdeído (nm / mg de proteína) (DRAPER *et al.*, 1993).

3.14 Análise da atividade da superóxido dismutase (SOD)

As plaquetas, o soro e as hemácias foram utilizados para determinar a atividade da SOD, que foi analisada através da mensuração da inibição da auto-oxidação da adrenalina em uma absorvância de 480 nm (GE Health - EUA).

3.15 Agregação plaquetária

No protocolo utilizado nesse estudo (NASEEM; BRUCKDORFER, 1995; DEMÉZIO DA SILVA, 2005), o sangue coletado foi inicialmente anticoagulado com citrato de sódio a 3,8% (Quadro 14) e posteriormente centrifugado a 180g por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido por centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 800g por 10 minutos. A concentração plaquetária do PRP foi ajustada com o PPP para uma contagem constante de $1,5 \times 10^8$ /mL. A agregação foi induzida por colágeno (2, 4 e 8 μ g/L) e a resposta monitorada por 5 minutos em um agregômetro de 4 canais (Chrono-Log). Os testes foram feitos a 37^o C com uma velocidade de rotação de 900 rpm. A agregação máxima foi expressa em percentual.

Quadro 14. Composição do citrato de sódio

	mM	g/L
Citrato trisódico	130,5	38

pH=4

3.16 Dosagem de proteína

A mensuração das proteínas foi feita através de um ensaio colorimétrico, utilizando-se o kit BCATM Protein Assay (Pierce-USA).

3.17 Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados em forma de média \pm EP. O $V_{m\acute{a}x}$ e o K_m dos sistemas de transporte, bem como o transporte com características cinéticas

de difusão, foram determinados através da equação Michaelis-Menten, utilizando o programa Enzfitter (Elsevier).

Foi utilizado o teste t de Student para comparar os dois grupos e a significância estatística foi determinada quando $p < 0,05$. Os cálculos estatísticos e o preparo dos gráficos foram realizados através do programa de computador GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Prism Program, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Resultados em plaquetas

4.1.1 Transporte de L-arginina em plaquetas

Utilizando-se o aminoácido neutro L-leucina (10 mM) para isolar o sistema de transporte γ^+L , pôde-se observar que o influxo de L-arginina ($V_{m\acute{a}x}$) nas plaquetas dos pacientes com AN ($14,2 \pm 1,6$ pmol/ 10^9 céls/min; n = 8) estava reduzido em relação aos controles ($21,6 \pm 2,9$ pmol/ 10^9 céls/min; n = 8) (Figura 6). O K_m do sistema γ^+L para a L-arginina não se mostrou diferente nos pacientes com AN ($23,2 \pm 6,1$ μ mol/L vs $14,8 \pm 3,0$ μ mol/L).

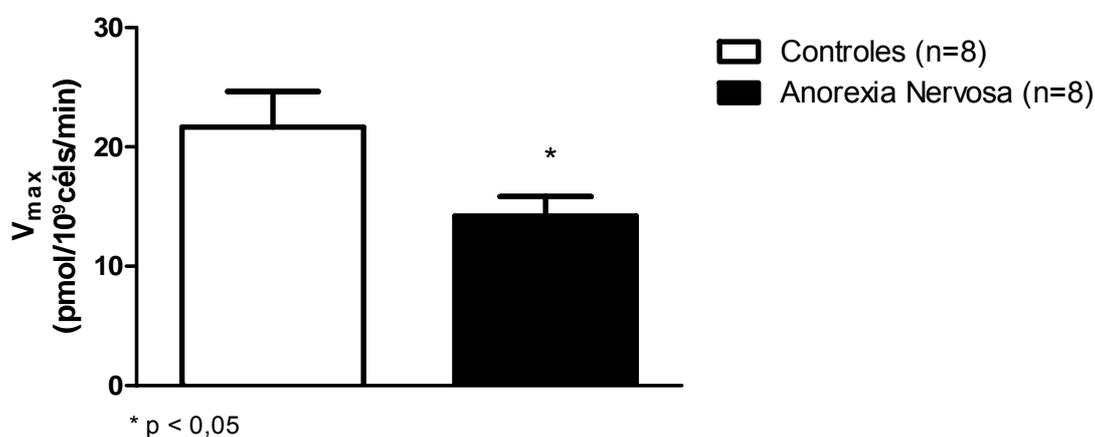


Figura 6. Transporte de L-arginina ($V_{m\acute{a}x}$) através do sistema γ^+L em plaquetas de pacientes com AN e controles.

4.1.2 Concentração basal da GMPc Intraplaquetária

A concentração basal intraplaquetária de GMPc (pmol/ 10^8 céls) estava reduzida em plaquetas de pacientes com AN ($0,58 \pm 0,06$; n=8), comparada com a de controles ($0,95 \pm 0,11$; n=8) (Figura 7).

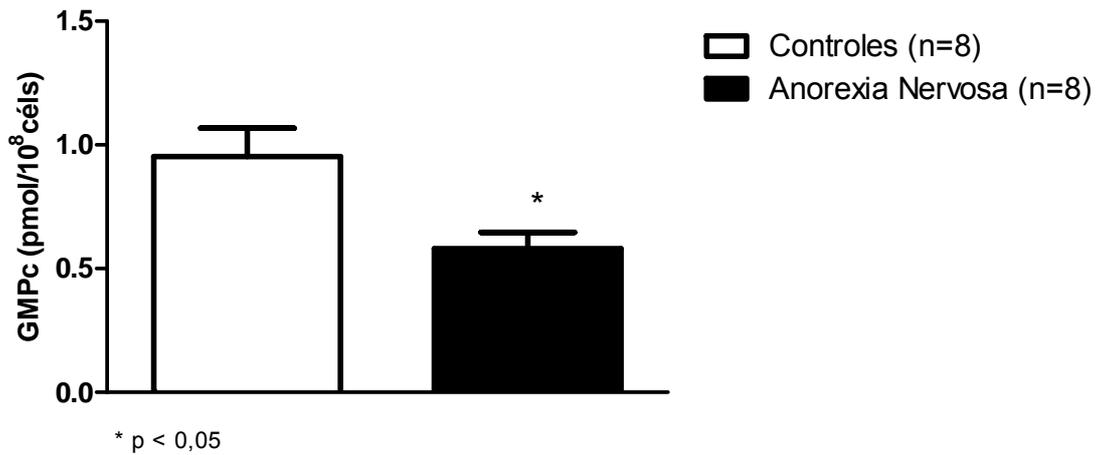


Figura 7. Concentração basal da GMPcíclico intraplaquetária em pacientes com AN e controles.

4.1.3 Atividade basal da NOS nas plaquetas

A atividade basal da NOS, avaliada através da produção basal de L-citrulina plaquetária, pmol/10⁸ céls, estava diminuída em pacientes com AN ($0,08 \pm 0,04$; n=8), em relação aos controles ($0,19 \pm 0,04$; n=8) (Figura 8).

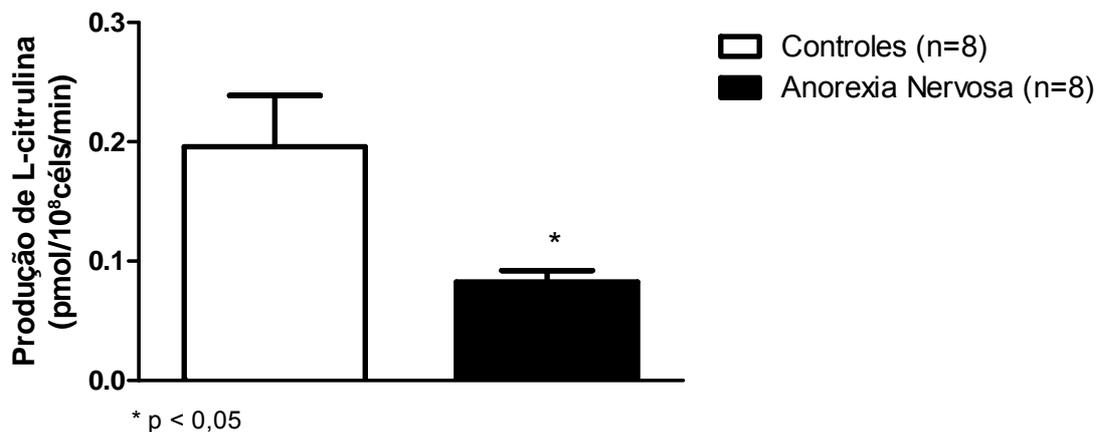


Figura 8. Produção basal de L-citrulina em plaquetas de pacientes com AN e controles.

4.1.4 Expressão das isoformas da NOS em plaquetas

A avaliação da expressão da enzima NOS endotelial realizada por western blotting, apresentada em unidades arbitrárias, mostra que as plaquetas humanas expressam essa enzima de forma constitutiva, e que não há diferença significativa entre pacientes com AN ($0,59 \pm 0,02$; $n=5$) e controles ($0,51 \pm 0,04$; $n=5$) (Figura 9).

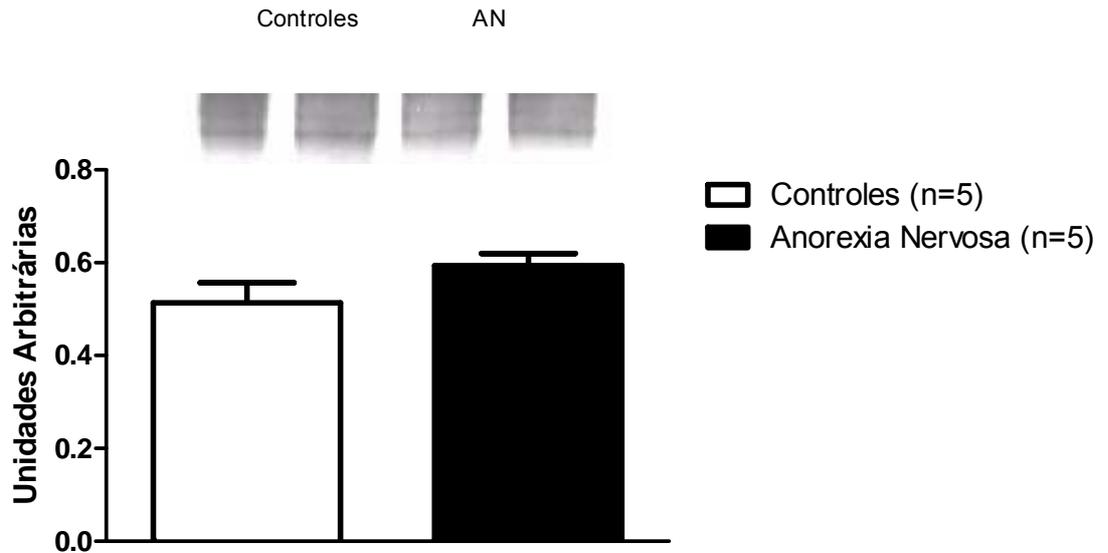


Figura 9. Expressão da NOS endotelial em plaquetas de pacientes com AN e controles.

O western blotting de lisado de plaquetas mostrou que tanto pacientes com AN como controles expressam a enzima NOS induzível e, da mesma forma que a isoforma endotelial, não há diferença significativa entre pacientes com AN ($1,17 \pm 0,10$) e controles ($0,83 \pm 0,17$) (Figura 10).

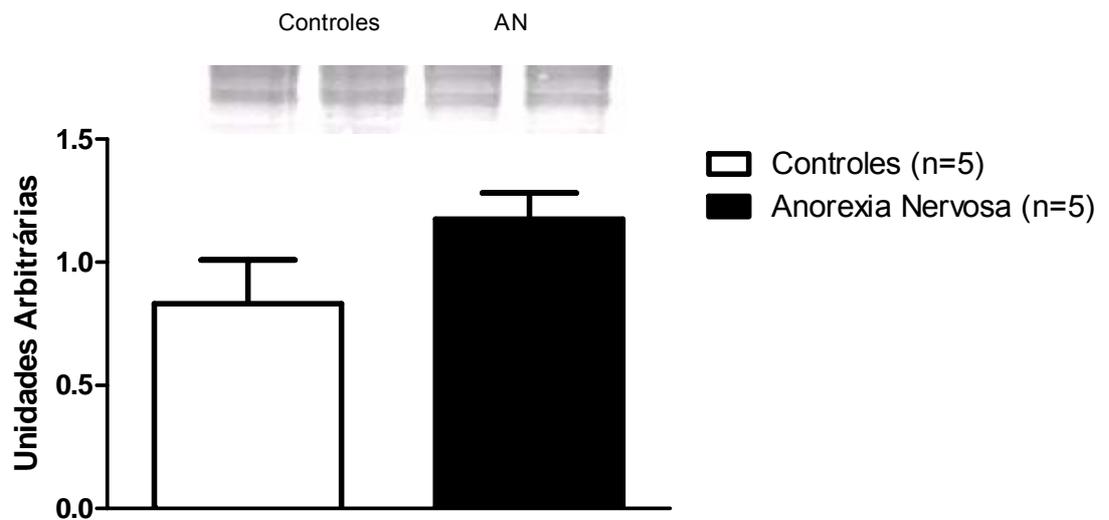


Figura 10. Expressão da NOS induzível em plaquetas de pacientes com AN e controles.

4.1.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em plaquetas

A formação de TBARS, um marcador de peroxidação lipídica, não mostrou diferença significativa nas plaquetas de pacientes com AN ($0,009 \pm 0,002$ nMol/mg de proteína; n=8), quando comparada aos controles ($0,011 \pm 0,001$ nMol/mg de proteína; n=8) (Figura 11).

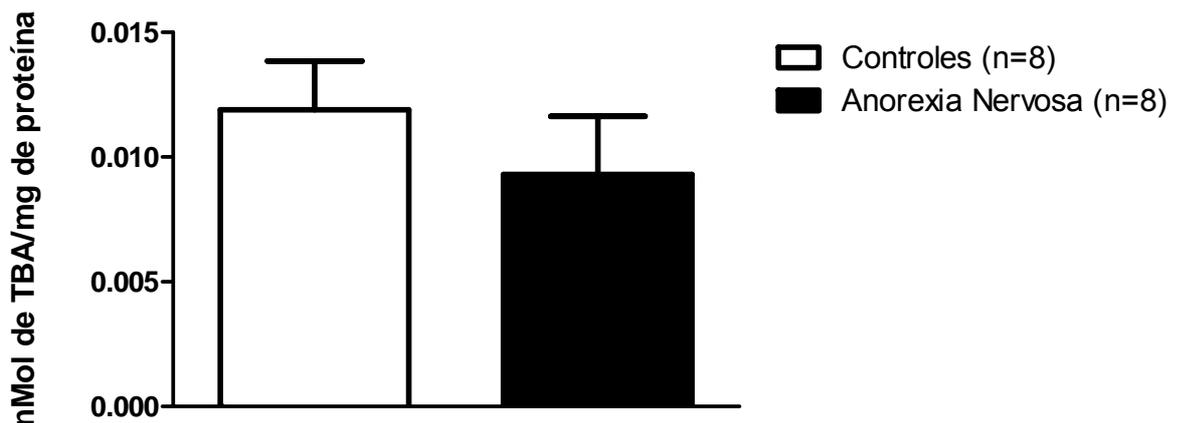


Figura 11. Formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em plaquetas de pacientes com AN e controles.

4.1.6 Atividade da SOD nas plaquetas

A atividade da SOD, através da mensuração da inibição da auto-oxidação da adrenalina, mostrou-se reduzida nas plaquetas de pacientes com AN ($0,016 \pm 0,003$ U/mg de proteína; $n=8$), em relação aos controles ($0,042 \pm 0,011$ U/mg de proteína; $n=8$) (Figura 12).

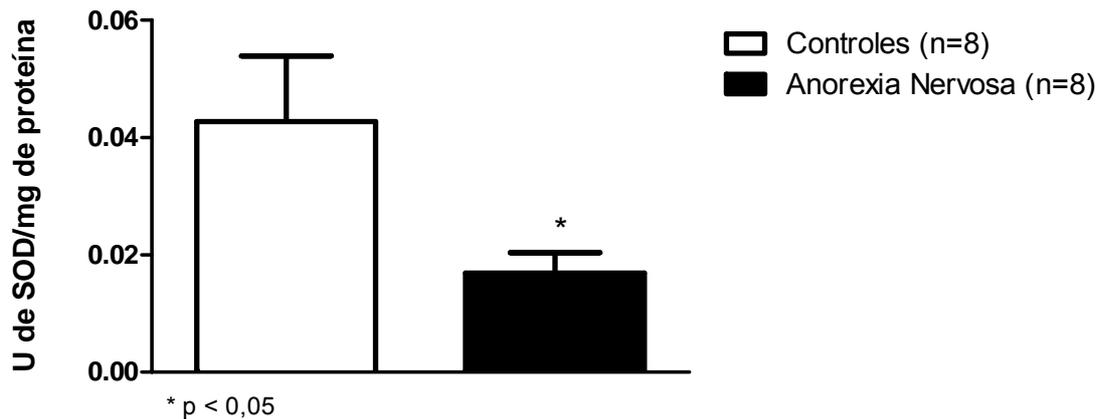


Figura 12. Atividade da SOD em plaquetas de pacientes com AN e controles.

4.1.7 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária (%) em PRP induzida por concentrações crescentes de colágeno (2, 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$) não se mostrou diferente nos pacientes com AN (61 ± 7 ; 70 ± 6 ; 83 ± 4 ; $n=8$), quando comparada aos controles (63 ± 7 ; 76 ± 2 ; 86 ± 1 ; $n=8$) (Figura 13).

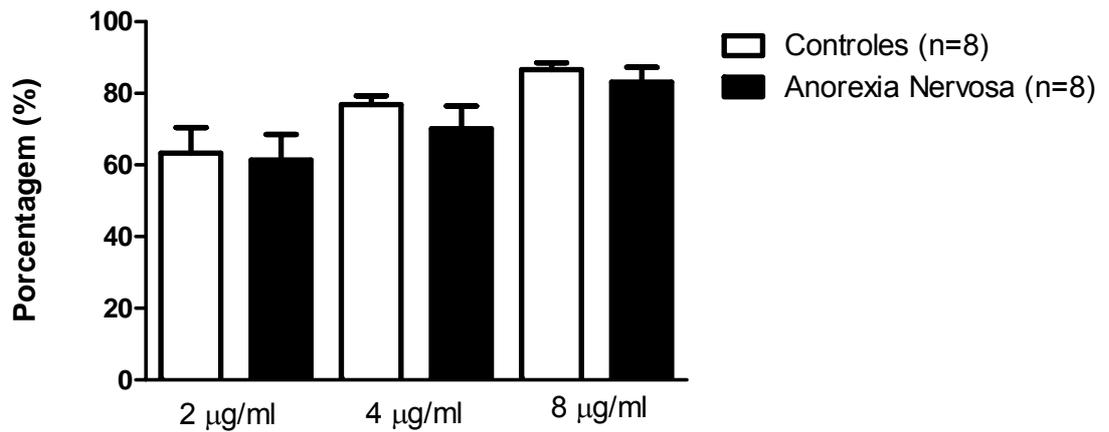


Figura 13. Agregação plaquetária induzida por diferentes concentrações de colágeno em plaquetas de pacientes com AN e controles.

4.2 Resultados em hemácias

4.2.1 Atividade basal da NOS nas hemácias

A atividade basal da NOS, avaliada através da produção basal de L-citrulina em hemácias, $\text{pmol}/10^8\text{cél/s}$, estava reduzida em pacientes com AN ($3,8 \pm 0,4$; $n=8$), em relação aos controles ($8,2 \pm 1,4$; $n=8$) (Figura 14).

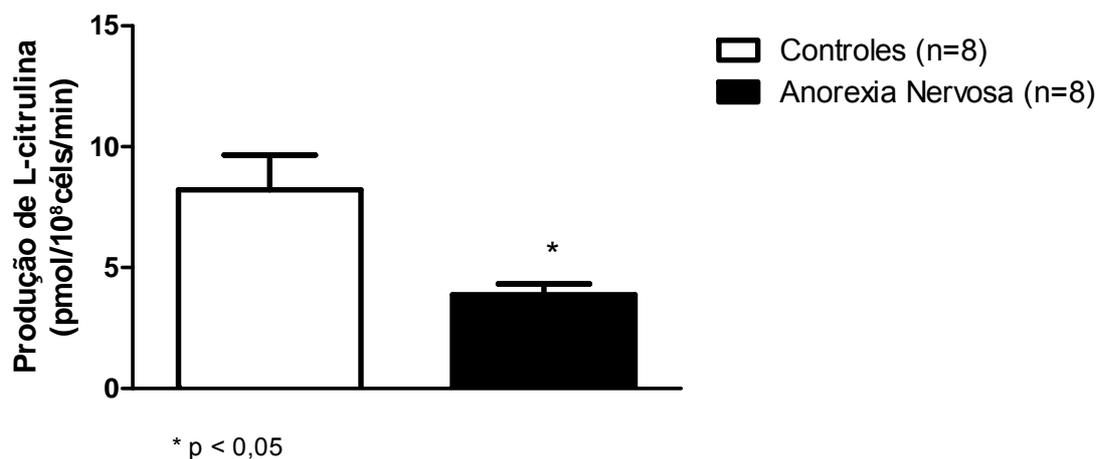


Figura 14. Produção basal de L-citrulina em hemácias de pacientes com AN e controles.

4.2.2 Expressão das isoformas da NOS em hemácias

A expressão da enzima NOS endotelial em hemácias, avaliada por western blotting, foi visualizada em 2 de 5 amostras tanto de pacientes com AN ($1,08 \pm 0,05$; $n=2$) como de controles ($0,74 \pm 0,14$; $n=2$). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Figura 15).

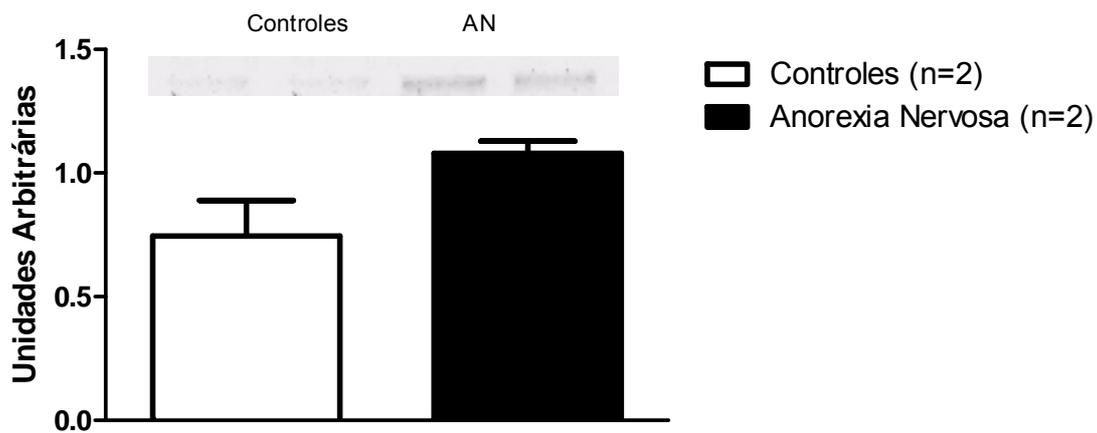


Figura 15. Expressão da NOS endotelial em hemácias de pacientes com AN e controles.

Da mesma forma que a isoforma endotelial, a isoforma induzível só foi visualizada em 2 de 5 amostras de hemácias de pacientes com AN ($0,85 \pm 0,11$; $n=2$) e controles ($0,86 \pm 0,09$; $n=2$). Também não se verificou diferença (Figura 16).

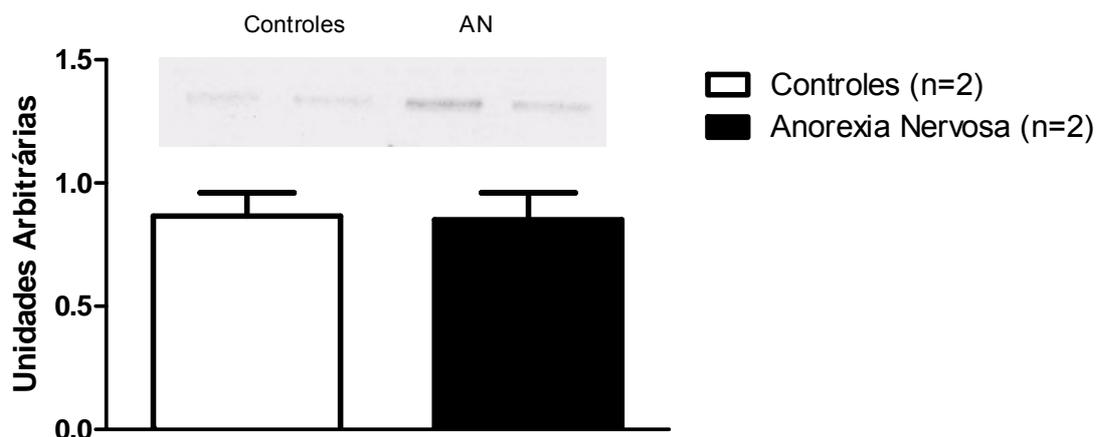


Figura 16. Expressão da NOS induzível em hemácias de pacientes com AN e controles.

4.2.3 Atividade da arginase em hemácias

A atividade da arginase (pmol uréia/mg proteína/2h), avaliada através da conversão da [C¹⁴]L-arginina em [C¹⁴]-uréia, mostrou-se elevada em plaquetas de pacientes com AN ($0,09 \pm 0,02$; n=8) em relação aos controles ($0,01 \pm 0,00$; n=8) (Figura 17).

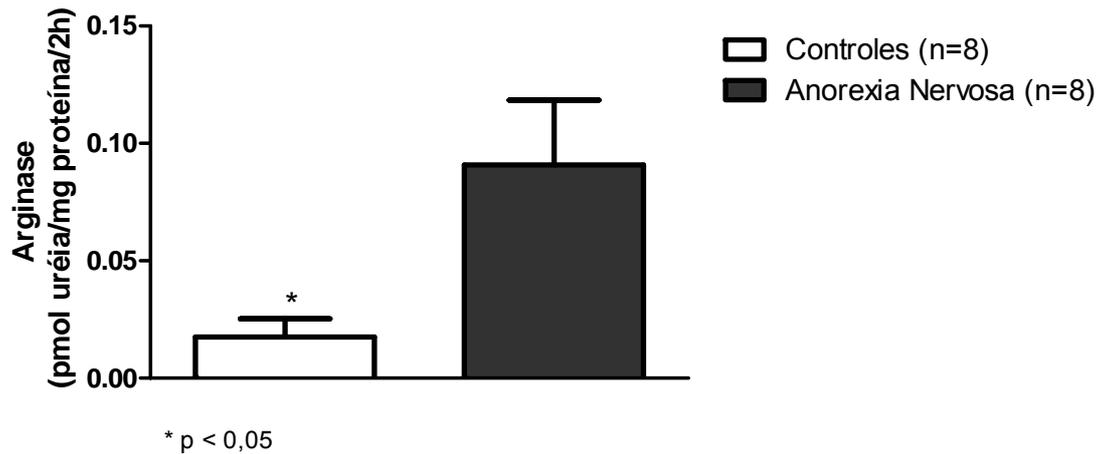


Figura 17. Atividade da arginase em hemácias de pacientes com AN e controles.

4.2.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) em hemácias

A formação de TBARS em hemácias não mostrou diferença significativa nos pacientes com AN ($0,001 \pm 0,000$ nMol/mg de proteína; n=8), quando comparada aos controles ($0,003 \pm 0,001$ nMol/mg de proteína; n=8) (Figura 18).

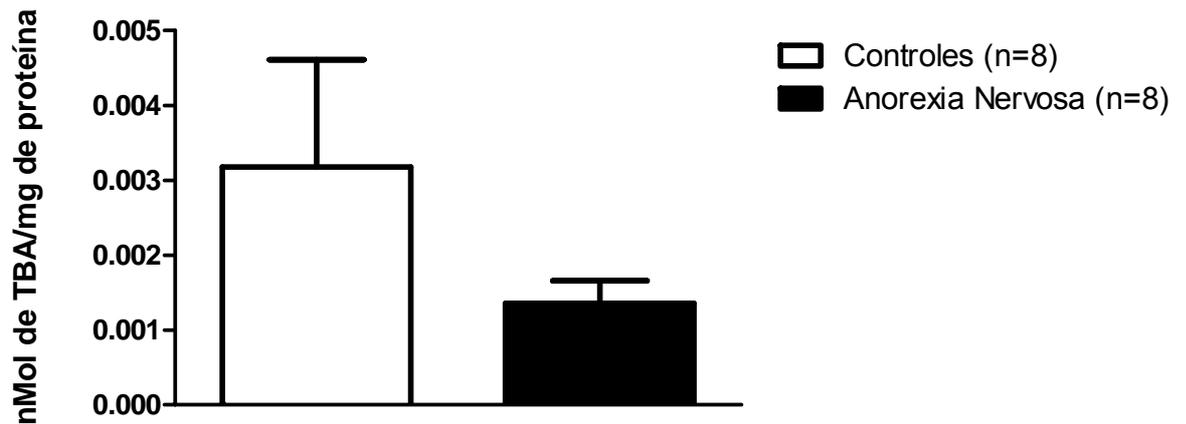


Figura 18. Formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em hemácias de pacientes com AN e controles.

4.2.5 Atividade da SOD nas hemácias

A atividade da SOD nas hemácias, diferente das plaquetas, mostrou-se elevada em pacientes com AN ($0,42 \pm 0,07$ U/mg de proteína; n=8), em relação aos controles ($0,12 \pm 0,02$ U/mg de proteína; n=8) (Figura 19).

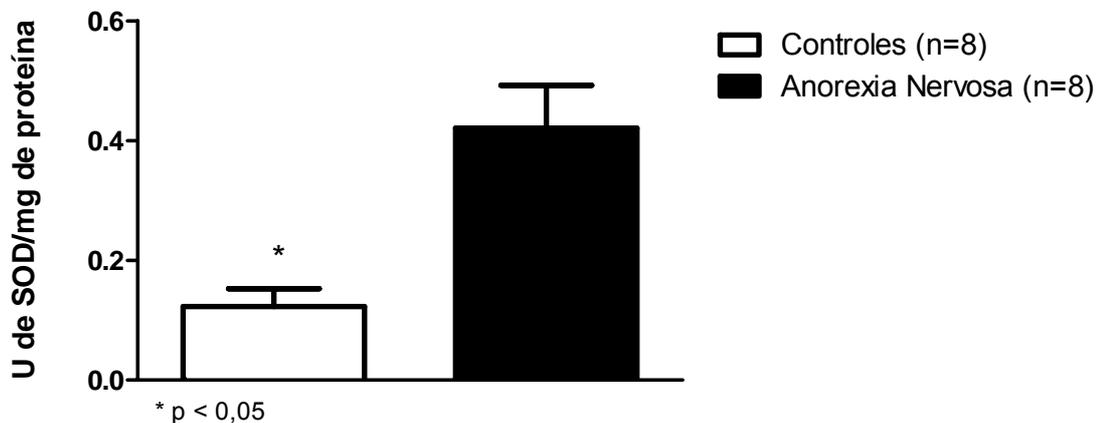


Figura 19. Atividade da SOD em hemácias de pacientes com AN e controles.

4.3 Resultados sistemicamente

4.3.1 Dosagem de aminoácidos

Foi analisado um total de 19 aminoácidos como mostra a Tabela 2, mas só o aminoácido arginina ($\mu\text{M/L}$) diferiu entre os grupos. Os pacientes com AN apresentaram concentração plasmática de arginina reduzida ($70,3 \pm 4,5$; $n=4$), quando comparados aos controles ($49,8 \pm 6,5$; $n=4$).

Tabela 2. Concentrações plasmáticas dos aminoácidos ($\mu\text{M/L}$) em indivíduos controles (n=4) e nos pacientes com AN (n=4).

Aminoácidos	Controles	Pacientes com AN
Ácido Aspártico	22,5 \pm 4,7	17,5 \pm 3,0
Ácido Glutâmico	62,2 \pm 9,4	66,8 \pm 14,1
Alanina	238,8 \pm 30,1	310,0 \pm 69,9
Arginina	70,3 \pm 4,5	49,8 \pm 6,5*
Asparagina	51,1 \pm 5,9	60,3 \pm 10,2
Fenilalanina	69,1 \pm 4,5	68,3 \pm 13,9
Glicina	244,5 \pm 60,3	254,9 \pm 83,4
Glutamina + Histidina	764,5 \pm 31,3	679,8 \pm 28,8
Isoleucina	82,4 \pm 10,4	80,4 \pm 5,7
Leucina	84,8 \pm 6,3	105,1 \pm 17,7
Lisina	145,8 \pm 24,7	133,0 \pm 9,8
Metionina	24,3 \pm 7,1	33,3 \pm 5,7
Ornitina	79,75 \pm 18,7	62,1 \pm 7,5
Serina	137,3 \pm 27,2	153,8 \pm 17,0
Taurina	129,2 \pm 26,4	130,7 \pm 36,0
Tirosina	56,0 \pm 9,2	61,3 \pm 14,6
Treonina	170,3 \pm 45,9	144,7 \pm 40,3
Triptofano	54,8 \pm 6,0	64,7 \pm 3,8
Valina	197,3 \pm 30,9	180,3 \pm 18,2

* $p < 0,05$

4.3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro

A formação de TBARS no soro, da mesma forma que nas plaquetas e nas hemácias, não mostrou diferença significativa nos pacientes com AN ($0,0010 \pm 0,0001$ nMol/mg de proteína; n=8), em relação aos controles ($0,0008 \pm 0,0000$ nMol/mg de proteína; n=8) (Figura 20).

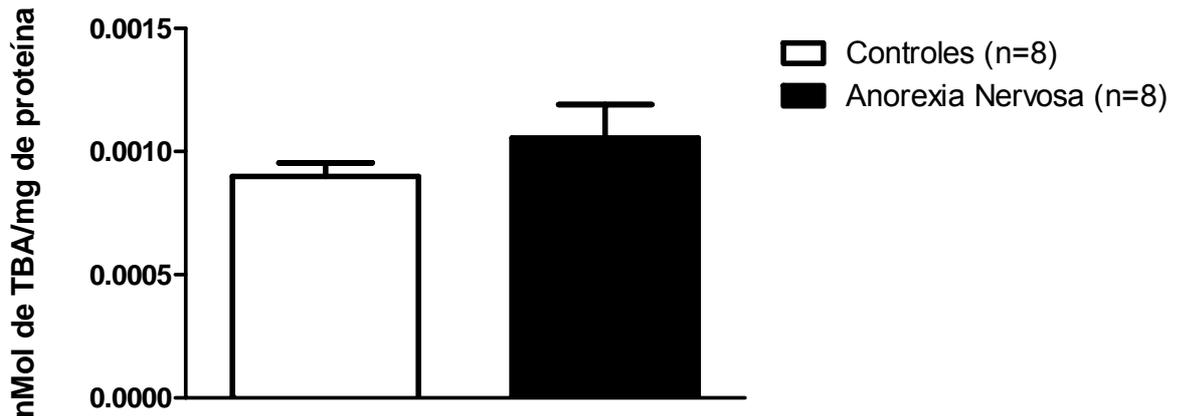


Figura 20. Formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em soro de pacientes com AN e controles.

4.3.3 Atividade da SOD no soro

A atividade da SOD mostrou-se reduzida no soro de pacientes com AN ($3,87 \pm 0,45$ U/mg de proteína; n=8), em relação aos controles ($8,21 \pm 1,44$ U/mg de proteína; n=8) (Figura 21).

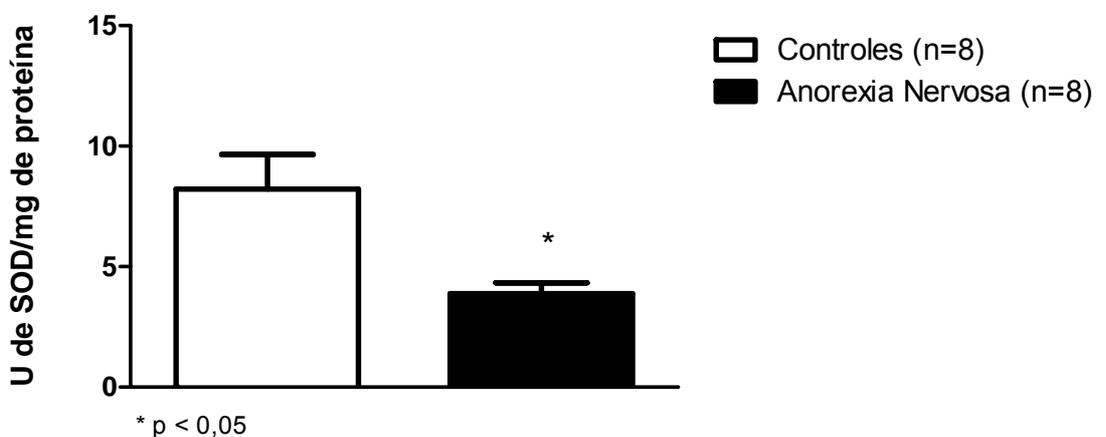


Figura 21. Atividade da SOD no soro de pacientes com AN e controles.

5. DISCUSSÃO

O NO é relativamente novo na farmacologia, já que seu papel fisiológico foi comprovado há apenas 25 anos atrás. Estudos relacionando o NO com a AN ainda são escassos. Sabe-se que as doenças cardiovasculares são representativas nas mortes de pacientes com AN. Dessa forma, o estudo da fisiopatologia desse transtorno é de grande importância para que novas terapêuticas possam ser empregadas a fim de reduzir morbidade e mortalidade.

No presente estudo através do IMC médio das pacientes anoréticas (Tabela 1), comprovou-se a grave condição de desnutrição que estas pacientes estão submetidas. Verificou-se também um estado de hipernatremia em tais pacientes, o qual já havia sido observado por Nogal *et al.* (2008). Esta hipernatremia pode ser justificada em parte pela desidratação presente nos pacientes com AN (HANNAN *et al.*, 1990; NOGAL *et al.*, 2008).

Os resultados desta dissertação fornecem a primeira evidência de que a produção de NO está diminuída na AN como evidenciado pela diminuída produção de citrulina e GMPc nas plaquetas e diminuída produção de citrulina nas hemácias de pacientes com AN, quando comparados a controles. Este achado contrasta com o estudo de Vannacci *et al.* (2006), que demonstraram uma produção aumentada de NO na AN. A divergência entre os resultados dos estudos, provavelmente, deve-se ao fato de Vannacci *et al.* terem usado como marcador da síntese de NO o nitrito plasmático, o qual pode ser afetado pelo estado catabólico severo dos pacientes com AN e pela dieta.

A produção diminuída de NO observada no presente estudo, pode ser explicada, em parte, por um reduzido influxo de L-arginina via sistema y+L em plaquetas. Entretanto, tal análise não foi realizada em hemácias. Um fator que pode limitar esta capacidade de transporte é a baixa concentração de L-arginina no plasma, a qual foi primeiramente evidenciada por Moyano *et al.* (1998) e confirmada neste presente estudo. Esta baixa concentração de L-arginina pode ser devido à baixa ingestão alimentar ou ao contínuo catabolismo protéico que estes pacientes sofrem. Sendo assim, uma menor concentração de L-arginina plasmática pode reduzir o transporte transmembrana e, conseqüentemente, o substrato intracelular para a NOS.

O transporte transmembrana da L-arginina, independente da concentração de L-arginina no interior da célula, é uma das condições essenciais para que ocorra a síntese do NO (BRUNINI *et al.*, 2007; MANN; YUDILEVICH; SOBREVIA, 2003), situação esta descrita anteriormente como “paradoxo da via L-arginina-NO”. Várias teorias foram propostas para tentar explicá-lo, entre elas a co-localização da eNOS e do transportador de L-arginina CAT1 em porções especializadas da membrana denominadas cavéolos (Shaul, 2003; MANN; YUDILEVICH; SOBREVIA 2003, McDonald *et al.*, 1997). Esta hipótese, porém, não explica a dependência do transporte de L-arginina da iNOS citosólica. Para responder essa questão, Closs *et al.*, em 2000, propuseram que as células endoteliais e os macrófagos possuiriam dois pools intracelulares de L-arginina, sendo um deles com capacidade de troca com o meio extracelular e o outro não. De acordo com o estudo, este segundo pool seria inacessível à NOS em macrófagos, sendo fundamental o transporte de L-arginina para a produção de NO, o que seria uma das possíveis explicações para o paradoxo da via L-arginina-NO (CLOSS *et al.*, 2000).

Em estudos prévios, nosso grupo demonstrou que o sistema γ^+L é estimulado por um inibidor da Na^+/K^+ -ATPase, a ouabaína, e por mudanças no potencial de superfície, enquanto este sistema é inibido pela trombina e pela depleção intraplaquetária de aminoácido (*zero-trans*) (SIQUEIRA *et al.*, 2007). A depleção intraplaquetária de aminoácidos consiste na incubação das plaquetas, após serem isoladas, por um período de 40 minutos a 37°C (SIQUEIRA *et al.*, 2007) e visa minimizar a interferência dos aminoácidos localizados no interior da plaqueta na atividade do transportador γ^+L , que funciona exclusivamente por troca (CHILLARÓN *et al.*, 1996). É possível que as plaquetas de pacientes com AN tenham uma função diminuída da bomba de Na^+ , levando a uma concentração intracelular de Na^+ diminuída e, conseqüentemente, uma troca reduzida entre a L-arginina e os aminoácidos neutros.

Outra correlação poderia ser feita com a expressão da NOS, enzima responsável por catalisar a conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. Entretanto, como evidenciado pelos experimentos de Western Blotting, os pacientes com AN, não apresentam alterações das isoformas iNOS e eNOS em suas plaquetas e em suas hemácias.

Tão importante quanto verificar a expressão da NOS é avaliar a atividade de tal enzima. Apesar de manter uma expressão inalterada nas plaquetas, esta enzima

apresenta uma atividade diminuída tanto nas plaquetas como nas hemácias de pacientes com AN. Isto foi demonstrado pela menor produção do aminoácido L-citrulina, o qual é um marcador indireto da produção de NO, já que pela ação da NOS são produzidas quantidades equimolares de L-citrulina e NO.

É importante ressaltar que, para a atividade da NOS são necessários vários co-fatores, como Ca^{2+} /calmodulina, tetrahidrobiopterina, flavina mononucleotídeo e flavina adenina dinucleotídeo (GENESTRA, 2008). Em consequência da desnutrição, os pacientes com AN, provavelmente, não possuem a concentração necessária de co-fatores para a ativação da NOS. Este fato poderia levar ao desacoplamento da NOS, acarretando uma menor produção de NO.

Além dos cofatores, a liberação de mediadores inflamatórios por leucócitos modula a atividade da NOS. O fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) pode coinduzir a iNOS e o transportador de L-arginina CAT-2B em células musculares lisas vasculares e macrófagos (MANN *et al.*, 2003). Entretanto, a baixa produção de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 na AN pode refletir a combinação de uma nutrição precária e uma excessiva perda de peso (NOVA *et al.*, 2002). Esta baixa produção de mediadores inflamatórios na AN poderia ser também uma das justificativas para a baixa atividade da NOS nestes pacientes.

Outra possibilidade é uma reduzida biodisponibilidade da L-arginina, devido à utilização da mesma no ciclo da uréia pela arginase. Sabe-se que a NOS e a arginase competem pelo mesmo substrato e que um intermediário da síntese do NO, a N-hidroxi-L-arginina (NOHA), é um inibidor endógeno da arginase, demonstrando que essas vias estão fortemente inter-relacionadas (TOPAL *et al.*, 2006). Existem relatos na literatura sobre a atividade da arginase em plaquetas de animais e humanas (MENDEZ *et al.*, 1997; DELA PENA *et al.*, 2000), no entanto, não são encontrados dados sobre o estudo desta enzima em pacientes com AN. Nesta dissertação, foi demonstrada uma maior atividade da arginase nas hemácias de pacientes com AN.

Além da utilização da arginina em outras vias que não a via L-arginina-NO, outro fator que pode afetar a utilização da arginina pela NOS é a presença dos análogos da L-arginina, como o dimetil-L-arginina-assimétrica (ADMA) e o L₂-NMMA, que são inibidores das NOS e de transportadores de L-arginina presentes no sangue ou intracelularmente (TSIKAS; BÖGER; SANDMANN, 2000). O ADMA, um fator de risco isolado para doença coronariana (SCHULZE *et al.*, 2006; BOGER, 2005), age

como um inibidor competitivo das três isoformas da NOS (TSIKAS; BÖGER; SANDMANN, 2000) e se origina da degradação de proteínas metiladas do metabolismo protéico (MCBRIDE; SILVER, 2001). Quando administrado a voluntários saudáveis, o ADMA produz efeitos similares aos da inibição da NOS, como elevação da pressão arterial, vasoconstrição e aumento da resistência renovascular (KIELSTEIN *et al.*, 2004). Um estudo anterior do nosso grupo demonstrou que tanto o ADMA como o L-NMMA inibe o transporte da L-arginina e a atividade da NOS em plaquetas (BRUNINI *et al.*, 2004, DE MEIRELLES *et al.*, 2007). Uma vez que tais análogos podem estar em níveis mais elevados nos pacientes com AN, a mensuração dos mesmos está em fase de execução pelo nosso grupo.

Por fim, a biodisponibilidade de NO também pode ser afetada pela sua própria degradação, mediada por EROs. Estudos em hemácias mostraram reduzida proteção contra danos oxidativos em pacientes com AN em consequência da atividade diminuída de enzimas antioxidantes como a SOD e da concentração deficiente de α -tocoferol (MOYANO *et al.*, 1999). De forma intrigante, o presente estudo observou uma atividade diminuída da SOD em plaquetas e soro de pacientes com AN em comparação aos controles, mas, diferente do estudo de Moyano *et al.* (1999), observou uma atividade aumentada da SOD nas hemácias dos pacientes com AN. É possível que as hemácias estejam compensando a baixa produtividade da SOD pelas plaquetas e pelo soro, ou ainda que as hemácias possam funcionar como um mecanismo de antitoxicidade (RUSSELL *et al.*, 2005). Entre os mecanismos propostos, pode-se citar a atividade redox da membrana das hemácias, uma vez que os sistemas de transporte de elétrons da membrana reagem contra os radicais livres (KENNETT; KUCHEL, 2003).

Com relação ao conteúdo oxidante, mensurado pela formação de TBARS, nenhuma diferença foi vista nos pacientes com AN. Entretanto, devemos levar em consideração a dificuldade de se medir as EROs *in vivo* em humanos, devido às suas alta reatividade e meia-vida extremamente curta. As técnicas empregadas quantificam, portanto, as consequências das reações provocadas por eles. Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo é gerado pelo desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de EROs.. Embora diante de uma baixa atividade da enzima antioxidante SOD nas plaquetas e no soro de pacientes com AN, não podemos afirmar que os pacientes com este transtorno estão ou não submetidos ao estresse oxidativo, devido à dificuldade de se mensurar as EROs.

Apesar da reduzida produção de NO, a função plaquetária dos pacientes com AN não se mostrou alterada, já que as plaquetas destes pacientes não apresentaram distúrbios de agregação. Esta agregação plaquetária inalterada na presença da síntese de NO diminuída nestes pacientes sugere um(s) mecanismo(s) antiagregante independente do NO. É possível que os nossos achados encontrados no presente estudo possam ser um marcador precoce da ocorrência da AN.

Em condições como a insuficiência renal crônica, nosso grupo encontrou uma ativação da via L-arginina-NO como um mecanismo compensatório presente nas plaquetas (DEMÉZIO DA SILVA *et al.*, 2005). Um melhor entendimento do hipotético efeito protetor da inativação plaquetária associada ao NO pode fornecer importantes ferramentas para o desenvolvimento de novas terapias para diminuir o risco de complicações cardiovasculares na AN.

6. CONCLUSÃO

Os principais resultados encontrados neste estudo são:

Em plaquetas:

1- O transporte de L-arginina pelo sistema $y^+ L$ em plaquetas está reduzido nos pacientes com AN.

2- A atividade da NOS está diminuída nas plaquetas dos pacientes com AN.

3- As concentrações intraplaquetárias de GMPc estão reduzidas nos pacientes com AN.

4- A expressão das isoformas iNOS e eNOS está inalterada nas plaquetas de pacientes com AN.

5- A atividade da SOD está reduzida nas plaquetas dos pacientes com AN.

6- A produção de TBARS nas plaquetas dos pacientes com AN não diferenciou dos controles.

7- A agregação plaquetária não está alterada nos pacientes com AN.

Em hemácias:

1- A atividade da NOS está diminuída nas hemácias dos pacientes com AN.

2- A expressão das isoformas iNOS e eNOS está inalterada nas hemácias de pacientes com AN.

3- A atividade da arginase está aumentada nas hemácias dos pacientes com AN.

4- A atividade da SOD está aumentada nas hemácias dos pacientes com AN.

5- A produção de TBARS nas hemácias dos pacientes com AN não diferenciou dos controles.

Sistemicamente:

1- A concentração de L-arginina plasmática está reduzida nos pacientes com AN.

2- A atividade da SOD está reduzida no soro dos pacientes com AN.

3- A produção de TBARS nos pacientes com AN não diferenciou dos controles.

Os resultados aqui apresentados demonstram que há uma baixa produção e, conseqüentemente, uma reduzida biodisponibilidade do NO nos pacientes com AN, apesar de a agregação plaquetária estar inalterada. Este fato sugere um ainda desconhecido mecanismo protetor das plaquetas independente do NO na AN, abrindo uma nova linha de investigação. Portanto, o presente estudo contribui para uma melhor compreensão da via L-arginina-NO na AN, podendo levar ao surgimento futuro de ferramentas terapêuticas para transtornos alimentares como a AN.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, C.N.; FILHO, R.C. Anorexia Nervosa e bulimia nervosa – abordagem cognitivo-constitutivista de psicoterapia. *Rev. Psiquiatr. Clín* 2004; 31 (4).
2. ALBRITTON, L.M. *et al.* The human cationic amino acid transporter (ARTC1): physical and genetic mapping to 13q12-q14. *Genomics* 1992; 12: 430-34.
3. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Practice guideline for the treatment of patients with eating disorders. 2000b; n.2.
4. ASH ED. Structure and function of arginases. *J. Nutr.* 2004; 134(10 Suppl): 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S.
5. ASSUMPÇÃO, C.L.; CABRAL, M.D. Complicações clínicas da anorexia nervosa e bulimia nervosa. *Rev. Brás. Psiquiatr.* 2002; 24 (3):.29-33.
6. ASSUMPÇÃO, C.R. *et al.* Impact of the L-Arginine-Nitric Oxide Pathway and Oxidative Stress on the Pathogenesis of the Metabolic Syndrome. *Bioch. J.* 2008; 2:100-107.
7. AUSSON, P.L. Freud e a Mulher. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1993.
8. BAHIA, L. *et al.* Endotélio na Síndrome Metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2006; 50 (2):291-303.
9. BALLATORI, N. *et al.* Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.* 2009.
10. BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods. Biochem. Anal.* 1987; 32: 279–312.
11. BARBOSA, K.B. *et al.* Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2008;31(3):259-80.
12. BARBUL, A. Arginine: biochemistry, physiology and therapeutic implications. *J. Parent. Ent. Nut.* 1985; 10: 227-38.
13. BENZIE, I.F. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1996;47(3):233-61.
14. BIRMINGHAM, C.L. *et al.* The mortality rate from anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 2005;38:143– 6.
15. BOGER, R.H. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vasc. Med.* 2005;10:S19-25
16. BOYD, C.A.R.; CRAWFORD, D.H. Activation of cationic amino acid transport through system γ^+ correlates with expression of T cell early antigen gene in human lymphocytes. *Plugers. Arch.* 1992; 422: 87-9.

17. BROWN, J.M.; MEHLER, P.S.; HARRIS, R.H. Medical complications occurring in adolescents with anorexia nervosa. *West. J. Med.* 2000; 172 (3).
18. BRUNINI, T.M. *et al.* Uremia, atherothrombosis and malnutrition: the role of L-arginine-nitric oxide pathway. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug. Targets* 2006; 6(2): 133-40.
19. BRUNINI, T.M. *et al.* Increased nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport via system y(+). *Pflugers. Arch.* 2003; 445(5): 547-50.
20. BRUNINI, T.M.C. *et al.* L-arginine availability as a pathological mechanism in essential hypertension, chronic renal failure and heart failure. *Vasc. Dis. Prev.* 2005; 2: 37-51.
21. BRUNINI, T.M.C. *et al.* Activation of L-arginine transport in undialysed chronic renal failure and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006; 33(1-2): 114-8.
22. BRUNINI, T.M. *et al.* Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: A role for L-arginine supplementation in vascular protection? *Cardiovasc. Res.* 2007; 73(2): 359-67.
23. BULIK, C.M. *et al.* Suicide Attempts in Anorexia Nervosa. *Psychosomatic Medicine* 2008; 70: 378-383.
24. CHEN, L.Y.; MEHTA, J.L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 32: 57-61.
25. CHICOINE LG *et al.* Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2004; 287(1): L60-8.
26. CLAUDINO, A.M.; ZANELLA, M.T. *Transtornos alimentares e obesidade.* Barueri, SP: Manole, 2005.
27. CLOSS, E.L. CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporters. *Amino Acids* 1996; 11: 193-208.
28. CLOSS, E.L. *et al.* Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport proteins. *Biochemistry* 1997; 36: 6462-8.
29. CLOSS, E.L. *et al.* Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 20796-800.
30. CLOSS, E.I. *et al.* Substrate supply for nitric oxide in macrophages and endothelial cells, role of cationic amino acid transporters. *Mol. Pharmacol.* 2000; 57: 68-74.

31. CLOSS, E.I. *et al.* Plasma membrane transporters for arginine. *J. Nutr.* 2004; 134(10): 2752S-9S.
32. COOPER, Z. The development and maintenance of eating disorders. In: Brownell KD, Fairburn CG (editors). *Eating disorders and obesity: a comprehensive handbook.* The Guilford Press 1995;199-206.
33. CEREC, V. *et al.* Multiple pathways for cationic amino acid transport in rat seminiferous tubule cells. *Biol Reprod* 2006.
34. CEYLAN, E. *et al.* Evaluation of oxidative-antioxidative status and the L-arginine-nitric oxide pathway in asthmatic patients. *Respir. Med.* 2005; 99: 871-876.
35. CHILLARÓN, J. *et al.* Obligatory Amino Acid Exchange via Systems bo,1-like and y1L-like: a tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(30): 17761-17770.
36. CHO, H.J. *et al.* Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 1992;176:599-604.
37. CHOI, Y.H. *et al.* Nitric oxide controls feeding behavior in the chicken. *Brain Res.* 1994; 654: 163-166.
38. CHRISTENSEN, H.N.; CULLEN, A.M. Synthesis of metabolism-resistant substrates for the transport system for cationic amino acids; their stimulation of the release of insulin and glucagon, and of the urinary loss of amino acids related to cystinuria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973;298(4):932-950.
39. CYLWIK, D.; MOGIELNICKI, A.; BUCZKO, W. L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacol. Rep.* 2005; 57: 14-22.
40. DA LUZ, P.L. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares.* Edição 2005, Editora Atheneu, Cidade São Paulo.
41. DE LA PENA, N.C. *et al.* Inhibition of platelet aggregation by putrescine, spermidine and spermine in hypercholesterolemic rabbits. *Arch Med Res.* 2000;31:546-550.
42. DELICONSTANTINOS, G. *et al.* Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer. Res.* 1995; 15:1435-1446.
43. DE MEIRELLES, L.R. *et al.* Inhibitory effects of endogenous L-arginine analogues on nitric oxide synthesis in platelets: role in platelet hyperaggregability in hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007; 34(12):1267-71.
44. DEMÉZIO DA SILVA, C. Effects of nutritional status on the L-arginine – nitric oxide pathway in platelets from hemodialysis patients. *Kidney. Int.* 2005; 68: 2173-2179.

45. DEMOUGEOT, C. *et al.* Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2005;23(5):971-8.
46. DEVÉS, R.; CHAVEZ, P.; BOYD, C.A.R. Identification of a new transport system (y+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J. Physiol.* 1992; 454: 491-501.
47. DEVÉS, R.; BOYD, C.A.R. Transporters for cationic aminoacids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 487-545.
48. DRAPER, H.H. *et al.* A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med.* 1993; 15: 353-363.
49. DSM-IV-TR™ Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. 4. ed. rev. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002.
50. DURAK, I. *et al.* Erythrocyte nitric oxide metabolism in patients with chronic renal failure. *Clin. Nephrol.*, 2001;55:460-464.
51. DUSHESNE, M. Neuropsychology of eating disorders: a systematic review of the literature. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2004; 26 (2).
52. ELFERING, S.L.; SARKELA, T.M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 2002;277:38079-38086.
53. ELLORY, J.C. Flux measurements. In: *Techniques in cellular physiology.* Ireland: Elsevier/North-Holland Scientific publishers Ltd; 1982. p. 1-11.
54. FEATHERSTON, W.R.; ROGERS, Q.R.; FREELAND, R.A. Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. *Am. J. Physiol.* 1973;224:127-129.
55. FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular research.* 1999;43:532-41.
56. FRANKO, D.; KEEL, P. Suicidality in eating disorders: occurrence, correlates, and clinical implications. *Clin. Psychol. Rev.* 2006; 26: 769-782.
57. FRIDOVICH, I. Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999, 893:13-18.
58. FURCHGOTT, R.F.; ZAWADSKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
59. FURCHGOTT, R.F. *et al.* Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1984; 6: 336-343.
60. GALETTA, F. *et al.* Early detection of cardiac dysfunction in patients with anorexia nervosa by tissue Doppler imaging. *Int. J. Cardiol.* 2005; 101:33-7.

61. GALETTA, F. *et al.* Heart rate variability and left ventricular diastolic function in anorexia nervosa. *J. Adolesc. Health.* 2003; 32:416-21.
62. GENESTRA M. Roles of tetrahydrobiopterin (BH4) cofactor in nitric oxide synthase (nos) catalysis, *Cellular Signalling* 2008; doi: 10.1016/j.cellsig.2008.05.011
63. GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria, *FEBS Lett.* 1997; 418: 291–296.
64. GILL, J. *et al.* Differential Changes in α - and β - Adrenoceptor Linked [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] Uptake in Platelets from Patients with Anorexia Nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992; 74: 441-446.
65. GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986;320(6061):454-6.
66. GROSS, S.S. Nitric oxide synthases and their cofactors. In: Goligorsky MS, Gross SS, eds. *Nitric oxide and the kidney: physiology and pathophysiology.* New York: Chapman and Hall, 1997; 52-65.
67. HALMI, K.A. The multimodal treatment of eating disorders. *Journal List. World Psychiatry* 2005; 4 (2).
68. HANNAN, J. *et al.* Assessment of body composition in anorexic patients. In: *In vivo Body Composition Study. Recent Advances.* S Yasumura, JE Harrison, KG McNeil, AV Woodhead, FA Dilmanian. 1990; 149-155.
69. HANSSEN, H. *et al.* Increased L-arginine transport in human erythrocytes in chronic heart failure. *Clinical Science* 1997; 94: 43-8.
70. HERZOG, D.B. *et al.* Patterns and predictors of recovery in anorexia nervosa. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* 1993; 32:835-842.
71. HOENICKA, M.; SCHMID, C. Cardiovascular effects of modulators of soluble guanylyl cyclase activity. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 2008; 6(4):287-301.
72. HOSOKAWA, H. *et al.* Cloning and characterization of a brain-specific cationic amino acid transporter. *J. Biol. Chem* 1997; 272: 8717-22.
73. HUSE, D.M.; LUCAS, A.R. Transtornos comportamentais que afetam a ingestão de alimentos: anorexia nervosa, bulimia nervosa e outras condições psiquiátricas. Em: Shils ME. *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença.* 9.ed. Manole: São Paulo, 2003; 2: 1621-1630.
74. HUYNH, N.N.; CHIN-DUSTING, J. Amino acids arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin. Exp. Pharmacol.* 2006; 33: 1-8.

- 75.IGNARRO, L.J. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:9265-9269.
- 76.IKEMOTO, M. *et al.* Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann. Clin. Biochem.* 1989; 26(6): 547-553.
- 77.JENKINSON, C.P.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM, S.D. Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 1996;114(1):107-32.
- 78.JIANG, M. *et al.* Arginase-flotillin interaction brings arginase to red blood cell membrane. *FEBS Lett.* 2006; 580(28-29):6561-6564.
- 79.KANAI, A.J. *et al.* Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:14126–14131.
- 80.KANG, E.S. *et al.* Normal circulating adult human red blood cells contain inactiveNOS proteins. *J. Lab. Clin. Med.* 2000; 135:444-451.
- 81.KENNETT, E.C.; KUCHEL, P.W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane. *IUBMB Life* 2003;55(7):375-85.
- 82.KIELSTEIN, J.T. *et al.* Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation.* 2004;109(2):172-177.
- 83.KLEINBONGARD, P. *et al.* Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006; 107(7): 2943-2951.
- 84.KOPÁNI, M. *et al.* Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin. Chim. Acta.* 2006; 364(1-2):61-6.
- 85.KOPPLE, J.D. Distúrbios renais e nutrição. Em: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC (eds.) *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.* São Paulo: Editora Manole, 2003;1543-1578.
- 86.LI, H. *et al.* Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(1):E75-82.
- 87.LINCOLN, J.; HOYLE, C.H.V.; BURNSTOCK, G. *Nitric oxide in health and disease.* UK: Cambridge University Press, 1997; 12-25.
- 88.LORGERIL, M. Dietary arginine and the prevention of cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 1997;37:560-3.
- 89.MACALLISTER, R.J.; VALLANCE, P. Endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis: How important are they? *Exp. Nephrol.* 1998; 6: 195-199.

90. MACLEOD, C.L.; FINLEY, K.D.; KAKUDA, D.K. γ^+ -type cationic amino acid transport: expression and regulation of the mCAT genes. *Journal of Experimental Biology* 1994; 196: 109-21.
91. MAKINO, M.; TSUBOI, K.; DENNERSTEIN, L. Prevalence of eating disorders: A comparison of western and non-western countries. *Jal. list. MedGenMed.* 2004; 6 (3).
92. MANN, G.E.; YUDILEVICH, D.L.; SOBREVIA, L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 2003; 83(1): 182-252.
93. MCBRIDE, A.E.; SILVER, P.A. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell.* 2001;106(1):5-8.
94. MCDONALD, K.K. *et al.* A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric oxide synthase may explain the "Arginine Paradox". *J. Biol. Chem.* 1997;272:31213-31216.
95. MELIN, P.; ARAÚJO, A.M. Transtornos alimentares em homens: um desafio diagnóstico. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2002; 24 (3).
96. MENDES RIBEIRO, A.C.; BRUNINI, T.M. L-arginine transport in disease. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 2004; 2(2): 123-31.
97. MENDES RIBEIRO, A.C. *et al.* Abnormalities of nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2001; 49: 697-712.
98. MENDES RIBEIRO, A.C. *et al.* Identification of system γ^+ L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. *Pflugers. Arch.* 1999; 438(4): 573-5.
99. MENDES RIBEIRO, A.C. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor L-NMMA in human red blood cells in chronic renal failure. *Clinical Science* 1997; 93: 57-64.
100. MENDEZ, J.D.; ZARZOZA, E. Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997;43:311-318.
101. METHA, J.L. *et al.* Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 1995; 125: 370-377.
102. MIKHAILIDIS, D.P. *et al.* Adrenaline-induced hyperaggregability of platelets and enhanced thromboxane release in anorexia nervosa. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine* 2004; 24 (1): 27-34.
103. MILLER, M.N.; PUMARIEGA, A.J. Culture na eating disorders: a historical and cultural review. *Psychiatry* 2001; 64 (2).
104. MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: S193–S201.

105. MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: Physiology and pathophysiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1997;811:60-67.
106. MORGAN, C.M. Etiologia dos transtornos alimentares: aspectos biológicos, psicológicos e sócio-culturais. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2002; 24 (3).
107. MORLEY, J.E.; FLOOD, J.F. Effect of competitive antagonism of NO synthase on weight and food intake in obese and diabetic mice. *Am. J. Physiol.* 1994; 226:164-168.
108. MORRIS JR, S.M. Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 2: 508S-512S.
109. MORRIS JR, S.M. Recent advances in arginine metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2004;7(1):45-51.
110. MORRIS JR, S.M. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 1992;12:81-101.
111. MORRIS JR, S.M.; BHAMIDIPATI, D.; KEPKA-LENHART, D. Human type II arginase: Sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene.* 1997;193(2):157-61.
112. MOSS, M.B. *et al.* Diminished bioavailability in hypertension. *Clin. Sci.* 2004; 107: 391-397.
113. MOYANO, D. *et al.* Antioxidant status in anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 1999; 25(1): 99-103.
114. MOYANO, D. *et al.* Plasma amino acids in anorexia nervosa. *European Journal of Clinical Nutrition* 1998; 52: 684-689.
115. NAKAMURA, Y.K.; OMAE, S.T. Alpha-tocopherol modulates human umbilical vein endothelial cell expression of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation. *Nutr. Res.* 2008;28(10):671-80.
116. NARDI, A.E.; BUENO, J.R. *Diagnóstico e tratamento em psiquiatria.* 1.ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. 2000; 345-357.
117. NASEEM, K.M.; BRUCKDORFER, K.R. Hydrogen peroxide at low concentrations strongly enhances the inhibitory effect of nitric oxide on platelets. *Biochem. J.* 1995; 310: 149-153.
118. NELSON, R.J.; CHIAVEGATTO, S. Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 713-719.
119. NISOLI, E. *et al.* Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003; 299: 896-899.

120. NOGAL, P.; PNIEWSKA-SIARK, B.; LEWINSKI, A. Evaluation of selected clinical and diagnostic parameters in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2008; 29(4):421-427.
121. NOVA, E. *et al.* Cytokine production by blood mononuclear cells from in-patients with anorexia nervosa. *Br. J. Nutr.* 2002; 88(2):183-188.
122. NUNES, M.A. *et al.* *Transtornos Alimentares e Obesidade*. 2. ed. Artmed, 2006.
123. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). *Classificação de Transtornos mentais e de comportamento da CDI-10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.
124. PACKER, L. Oxidative stress and antioxidants: the antioxidant network, alpha-lipoic acid and diabetes, in: L. Packer, P. Rosen, H.J. Trtschler, G.L. King A, Azzi. *Antioxidants in Diabetes Management*, Marcel Dekker Inc., basel, Switzerland 2000; 1-15.
125. PAWLUCK, D.E.; GOREY, K.M. Secular trends in the incidence of anorexia nervosa: integrative review of population-based studies. *Int. J. Eat. Disord.* 1998; 23: 347-52.
126. POMPILI, M. *et al.* Suicide in Anorexia: a meta-analysis. *Int. J. Eating Disord.* 2004; 36: 99-103.
127. RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 85: 5193-5197.
128. RAGHAVACHARI, N. *et al.* Amplified Expression Profiling of Platelet Transcriptome Reveals Changes in Arginine Metabolic Pathways in Patients With Sickle Cell Disease. *Circulation* 2007; 115(12):1551-62.
129. REYES, A.A.; KARL, I.; KLAHR, S. Role of L-arginine in health and in renal disease. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: 331-346.
130. RODRIGUEZ, S. *et al.* Increased arginase activity in aorta of mineralocorticoid-salt hypertensive rats. *Cli. Exp. Hypertens* 2000; 22: 75-85.
131. ROEDIGER, W.E.W. New views on the pathogenesis of Kwashiorkor: Methionine and other amino acids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1995; 21: 130-136.
132. ROTHER, R.P. *et al.* The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin: A Novel Mechanism of Human Disease. *JAMA* 2005; 293(13):1653-62.
133. ROTMANN, A. *et al.* Activation of classical protein kinase C reduces the expression of human cationic amino acid transporter 3 (hCAT-3) in the plasma membrane. *Biochem. J.* 2006; 395(1):117-23.

134. ROYAL AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND COLLEGE OF PSYCHIATRISTS. Australian and New Zealand clinical practice guidelines for the treatment of anorexia nervosa. *Aust. N. Zeal. J. Psychiatry* 2004;659-670.
135. SAIER, M.H. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transport. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; 64: 354–411.
136. SALVADOR, R.B. Anorexia, bulimia e obesidade. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2004;1-269.
137. SCHEBENDACH, J.E.; ANDERSON, P.R. Nutrição nos distúrbios alimentares. Em: MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 11. ed. São Paulo: Rocca, 2005; 568-588.
138. SCHEBENDACH, J.E. *et al.* Dietary energy density and diet variety as predictors of outcome in anorexia nervosa. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87:810–6.
139. SCHULZE, F. *et al.* Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am. Heart. J.* 2006;152(3):493.e1-8.
140. SEBASTIO, G. *et al.* A new gene (HCAAT-3) displays high homology with human cationic amino acids and maps to the critical region of velocardiofacial syndrome. *Am. J. Hum. Gen.* 1996; 59: A159.
141. SEBASTIO, G. *et al.* Isolation of a new gene (HCAAT-3) with a putative role of cationic amino acid transporter. *Med. Genet.* 1997; 9: S131.
142. SEDDON, M.; LOOI, Y.H.; SHAH, A.M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.* 2007;93(8):903-7.
143. SHARDA, B. Free radicals: emerging challenge in environmental health research in childhood and neonatal disorders. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2006;3(3):286-91.
144. SHAUL, P.W. Endothelial nitric oxide synthase caveolae and the development of atherosclerosis. *J. Physiol.* 2003;547:21-33.
145. SIQUEIRA, M.A. *et al.* Modulation of the cationic amino acid transport system y⁺L by surface potential, ouabain and thrombin in human platelets: effects of uremia. *Nephron. Exp.Nephrol.* 2007; 107(4): 132-138.
146. SQUADRITO, F. *et al.* Anorectic activity of N^G-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 230: 125-128.
147. STEIN, W.D. Carrier-mediated transport systems. In channels, carrier and pumps. London: Academic. Press. London 1996; 127-173.

148. STEINHAUSEN, H.C. The outcome of anorexia nervosa in the 20th century. *Am. J. Psychiatry* 2002; 159: 1284-1293.
149. STROBER, M.; FREEMAN, R.; MORRELL, W. The long-term course of severe anorexia nervosa in adolescents: survival analysis of recovery, relapse, and outcome predictors over 10–15 years in a prospective study. *Int. J. Eat. Disord.* 1997;22:339–60.
150. STUEHR, D.J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J. Nutr.* 2004; 134: 2748S-2751S.
151. STEUHR, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37:339-59.
152. TATOYAN, A. GIULIVI, C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1998;273:11044–11048.
153. TONG, B.C.; BARBUL, A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev. Med. Chem.* 2004; 4(8): 823-832.
154. TOPAL, G. *et al.* Mitochondrial arginase II modulates nitric-oxide synthesis through nonfreely exchangeable L-arginine pools in human endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2006;318(3)1368-1374.
155. TSIKAS, D. *et al.* Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000; 478(1-2):1-3.
156. VALDEZ, L.B.; ZAOBORNYYJ, T.; BOVERIS, A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1757:166-172.
157. VAN DE POLL, M.C. *et al.* Elevated plasma arginase-1 does not affect plasma arginine in patients undergoing liver resection. *Clin. Sci (Lond).* 2008; 114(3):231-241.
158. VANNACCI, A. *et al.* Increased nitric oxide production in eating disorders. *Neuroscience Letters* 2006; 399: 230-233.
159. VAN WINKLE, L.J.; CAMPIONE, A.L.; GORMAN, J.M. Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J. Biol. Chem.* 1988; 63: 3150-63.
160. VERREY, F. *et al.* CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Archives* 2004;447:532-42.
161. VOZZO, R. *et al.* Effect of nitric oxide synthase inhibitors on short-term appetite and food intake in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1999; 276: 1562-1568.

162. WALSH, J.M.E. Detection, Evaluation, and Treatment of Eating Disorders The Role of the Primary Care Physician. *J. Gen. Intern. Med.* 2000; 15 (8): 577-590.
163. WANG, T.; KEBIR, D.E.; BLAISE, G. Inhaled nitric oxide in 2003: a review of its mechanisms of action. *Canadian Anesthesiology* 2003; 50(8): 839-846.
164. WU, G. *et al.* Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2008; 23.
165. WU, G.; MEININGER, C.J. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J. Nutr.* 2000; 130(11): 2626-2629.
166. WU, G.; MORRIS, S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998; 336: 1-17.
167. YOSHIMOTO, T.; YOSHIMOTO, E.; MERUELO, D. Molecular cloning and characterization of a novel human gene homologous to the murine ecotropic retroviral receptor. *Virology* 1991; 185: 10-7.
168. YOUNG, G.A. *et al.* Anthropometry and plasma valine, amino acids and proteins in the nutritional assessment of hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1982; 21: 492-499.
169. ZHANG, P. *et al.* NADPH Oxidase Contributes to Coronary Endothelial Dysfunction in the Failing Heart. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2009.

8. ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



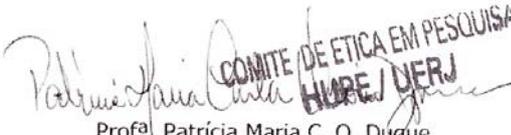
Rio de Janeiro, 23 de agosto de 2006

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Prof. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1485-CEP/HUPE) "A VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES COM ANOREXIA NERVOSA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


COMITE DE ETICA EM PESQUISA
HUPE / UERJ
Prof^a. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título da pesquisa: O papel da via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de pacientes com Anorexia Nervosa

Pesquisadores participantes: Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, Mestranda Natália Rodrigues Pereira

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Departamento de Farmacologia e Psicobiologia

Laboratório de Transporte de Membrana

Tel.:(21)25876141

Eu, _____, CPF nº _____, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa acima como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela Mestranda Natália Rodrigues Pereira sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação, assim como as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Foi-me esclarecido ainda que, por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro, não terei direito a nenhuma remuneração. Foi-me garantido que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do meu tratamento nesta instituição.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 200_.

Assinatura do sujeito ou responsável

Testemunha

Testemunha

ANEXO 3**PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DOS DISTÚRBIOS ALIMENTARES**

DATA DA COLETA: _____ PRONTUARIO: _____

DATA DE ADMISSÃO: / /

TELEFONE: _____

ENDEREÇO: _____

1- Nome: _____

2-Data de nascimento: / / Idade: _____ 3 – Sexo: () F () M

4- Raça: () Branca () Negra () Mestiça

5- Doenças associadas:

6- Fatores de Risco Cardiovascular:

() História Familiar Quem? _____

() Tabagismo Nº _____ Tempo _____ Quando Parou? _____

() Etilismo Qual? _____ Quantidade? _____

() Sedentarismo

() Dislipidemia

7-HF: _____

8- Avaliação Nutricional:

Peso = Altura = IMC =

Perda de peso : (Kg) _____ de _____ para _____ Período: _____

Peso mínimo para altura atual _____ Peso máximo para altura atual _____

Pregas cutâneas (mm): Tríceps: _____ Bíceps: _____

Subescapular: _____ Suprailíaca: _____

9 - Medicamentos :

() laxante Quantidade/freqüência: _____

() diurético Quantidade/freqüência: _____

() anti-arritmico () antidepressivo () Cálcio () moderador de apetite

() outros: _____

10 - Função intestinal: _____

11 - Pressão arterial: _____

12 - Freqüência cardíaca: _____

13-Tempo de tratamento: _____

14 - Imagem corporal: _____

15 - Alergias alimentares: _____

16 - Ingestão de líquidos: _____

17 - Suplementos vitamínicos/minerais/outros: _____

18 - Substitutos de açúcar e gorduras: _____

19- Ingestão excessiva de alimentos

Por dia: _____ Por semana: _____ Duração por episódio: _____

Alimentos preferidos: _____

20 - Auto indução de vômitos

Número de vezes por dia: _____

Método: _____

21 – Exercícios

Tipo: _____ Minutos por dia: _____ Vezes por semana: _____

22 – História gestacional: _____

23- História social : _____

24 – História do desenvolvimento: _____

25 – Histórico da menstruação:

Idade da menarca: _____ Última menstruação: _____

26- Exames Laboratoriais:

Data: _____

Hematócrito		Leucócitos	
Hemoglobina		Neu	
Creatinina		Linf	
Uréia		Eos	
K		Baso	
Na		Bastões	
Ca		Mono	
P		Plaquetas	
Mg		Acido Ur	
calcúria		Ptn total	
Albumina		Proteína C	
Glicose		Insulina	
TG		Col. Total	
LDL		HDL	
IL-6		IL-1	
TNF-alfa		Fibrinogênio	
T4		estradiol	
cortisol		TSH	
FSH		LH	
TGO		TGP	
GGT			

ANEXO 4**PROTOCOLO DO LABORATÓRIO DE TRANSPORTE DE MEMBRANA**

DATA DA COLETA: _____

1- Nome: _____

2 – Idade: _____

3 – Sexo: () F () M

4 – Raça: () Branca () Negra () Mestiça

5- Doenças associadas: _____

6- Fatores de Risco Cardiovascular:

() História Familiar Quem? _____

() Tabagismo Nº _____ Tempo _____ Quando Parou? _____

() Etilismo Qual? _____ Quantidade? _____

() Sedentarismo

() Dislipidemia

7 – Avaliação Nutricional:

Peso =

Altura =

IMC =

Circunferência Quadril =

Circunferência Cintura =

Relação Cintura-Quadril=

Diagnóstico Nutricional = _____

8 – Medicamentos :

9 – Exames Laboratoriais

Data: _____

Hematócrito		Leucócitos	
Hemoglobina		Neu	
Creatinina		Linf	
Uréia		Eos	
K		Baso	
Na		Bastões	
Ca		Mono	
P		Plaquetas	
Mg		Acido Ur	
calciúria		Ptn total	
Albumina		Proteína C	
Glicose		Insulina	
TG		Col. Total	
LDL		HDL	
IL-6		IL-1	
TNF-alfa		Fibrinogênio	
T4		estradiol	
cortisol		TSH	
FSH		LH	
TGO		TGP	
GGT			

ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE 2007 E 2008

1. SIQUEIRA, M A S; MARTINS, M A; PEREIRA, N R; MOSS, M B; SANTOS, S; MANN, G E; MENDES RIBEIRO, A C; BRUNINI, T M C. Modulation of cationic amino acid transport system γ +L by surface potential, ouabain and thrombin in human platelets: effects of uraemia. *Nephron Experimental Nephrology*, v.107, p.132 – 138, 2007.
2. PEREIRA NR, MOSS MB, ASSUMPÇÃO CRL, CARDOSO CB, MANN GE, BRUNINI TMC, MENDES-RIBEIRO AC. Diminished Intraplatelet L-Arginine-Nitric Oxide Pathway And Antioxidant Defense In Anorexia Nervosa. *Cardiovascular Research* – Submetido (Manuscript Number: 2009/78).
3. SIQUEIRA, MAS; MENDES-RIBEIRO, AC; PEREIRA, NR; MARTINS, MA; MOSS, MB; SANTOS, SFF; LUGON, JR; MANN, GE; BRUNINI, TMC. Is Conservative Treatment In Chronic Renal Failure A Stage Where L-Arginine Transport Is Paradoxically Reduced Compared To Patients On Dialysis? *Kidney International*-Submetido (Manuscript number: KI-02-09-0165).
4. PEREIRA NR, SIQUEIRA MAS, RESENDE AC, AGUILAR C, BRUNINI TMC, MENDES-RIBEIRO AC . Disturbances of the L-arginine-nitric oxide pathway in erythrocytes taken from patients with anorexia nervosa. EM FASE FINAL DE ELABORAÇÃO.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS NO PERÍODO DE 2007 E 2008

1. PEREIRA, N.R.; Assumpção, C.R.L.; Cardoso, C.; Marques, T.G.; Brunini, T.C.; Mendes Ribeiro, A.C. Via L-arginina-óxido nítrico e plaquetas em anorexia nervosa. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL FeSBE, 2007, Águas de Lindóia.
2. Orsini, T.F.; PEREIRA, N.R.; Siqueira, M.A.S.; Martins, M.A.; Mendes Ribeiro, A.C. A via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de pacientes com insuficiência renal crônica em tratamento conservador. In: 6ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIRIO, 2007, Rio de Janeiro.
3. Lima, R.A., Martins, M.A., PEREIRA, N.R., Moss, M.B., Siqueira, M.A.S., Brunini, T.M.C., Mendes Ribeiro, A.C. O papel da via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de pacientes com insuficiência renal crônica e sua correlação com o estado nutricional. In: 16ª SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – SEMIC/UERJ, 2007, Rio de Janeiro.
4. PEREIRA, NR; Assumpção CRL; Cardoso, CB; Brunini, TMC; Mendes-Ribeiro, AC. O papel do óxido nítrico e sua relação com a função plaquetária em pacientes com anorexia nervosa. In: XII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2008, São Paulo.
5. Moss, VB; Martins, MA; Siqueira, MAS; PEREIRA, NR. Efeito da insuficiência renal em estágios moderados na via l-arginina-óxido nítrico em plaquetas e sua relação com a função plaquetária. In: 17ª SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – SEMIC/UERJ, 2008, Rio de Janeiro.
6. Siqueira, MAS; Santos, SFF; Lugon, JR; Moss, MB; PEREIRA, NR; Martins, MA; Brunini, TMC; Mendes-Ribeiro, AC. Hiperatividade e expressão aumentada da óxido nítrico síntase plaquetária na insuficiência renal em tratamento conservador. In: XXIV Brasileiro de Nefrologia, 2008, Curitiba.
7. PEREIRA, NR; Assumpção CRL; Okinga, A; Cardoso, CB; Brunini, TMC; Mendes-Ribeiro, AC. Via L-arginina-óxido nítrico em anorexia nervosa. In: 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, São Paulo.
8. Assumpção C.R., PEREIRA N.R., Martins M.A., Brunini T.M.C., Mendes-Ribeiro A.C. Intraplatelet L-arginine-nitric oxide pathway in obese adolescents. In: 13th International Congress of Endocrinology, 2008, Rio de Janeiro.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)