



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carmen Regina Leal de Assumpção

**A via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de adolescente com
obesidade e síndrome metabólica**

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Carmen Regina Leal de Assumpção

A via L-arginina – óxido nítrico em plaquetas de adolescente com obesidade e síndrome metabólica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação de Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Marlowe Cunha Brunini

Co-orientador: Prof. Antonio Cláudio Mendes Ribeiro

Rio de Janeiro

2010

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

A851 Assumpção, Carmen Regina Leal de.
A via L-arginina – óxido nítrico em plaquetas de
adolescente com obesidade e síndrome metabólica / Carmen
Regina Leal de Assumpção. – 2010.
140f. : il.

Orientadora: Tatiana Marlowe Cunha Brunini.
Co-orientador: Antonio Cláudio Mendes Ribeiro.

1. Síndrome metabólica – Teses. 2. Arginina – Teses.
3. Obesidade - Teses. I. Brunini, Tatiana Marlowe. II.
Ribeiro, Antonio Cláudio Mendes. III. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas

CDU 616-056.52

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

Assinatura

Data

Carmen Regina Leal de Assumpção

**A via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de adolescente com obesidade e
síndrome metabólica**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação de Fisiopatologia Clínica e
Experimental, da Universidade do Estado do
Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de junho de 2010.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Tatiana Marlowe Cunha Brunini
Departamento de Farmacologia e Psicobiologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho
IBRAG – Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ

Prof.Dr. Amélio Fernando de Godoy-Matos
Instituto Estadual de Endocrinologia e Metabologia
Escola Médica de Pós-Graduação - PUC-RJ

Prof^a.Dr^a. Cláudia Braga Monteiro Abadesso Cardoso
Núcleo de Estudos da Saúde do Adolescente - UERJ

Prof.Dr. Rodrigo de Oliveira Moreira
Universidade Presidente Antonio Carlos-UNIPAC
Juiz de Fora-MG

Rio de Janeiro

2010

AGRADECIMENTOS

Fazer uma lista de agradecimentos é sempre difícil. São muitos a agradecer e enormes os riscos de ser injusta com alguém. De qualquer forma vou tentar...

À Deus e todos os santos, que ao longo da vida, me deram a força, a inspiração e a fé cristã necessárias para enfrentar as dificuldades e vencer os desafios da caminhada;

Aos meus pais Carmen (*in memoriam*) e Celso, que me deixaram a mais rica herança: o amor pelo estudo. Mãe, onde você estiver, te dedico esta tese;

Ao meu marido Antonio, eterno namorado, luz da minha vida e sempre incentivador da minha carreira. Com seu amor tornou esta caminhada menos difícil. Obrigada pelo amor, carinho e incentivo. Minhas desculpas pelos períodos de ausência;

Aos meus amados filhos Clarissa, Beatriz e Pedro. Filhos da minha alma, luz e motivo de tudo que faço na vida, inclusive este Doutorado. Deixo a vocês como exemplo o esforço de concluir esta tese. Nunca deixem de ir à busca dos seus sonhos assim como fui à busca do meu. Ficam aqui também as minhas desculpas por ter curtido menos do que deveria estes quatro últimos anos de convívio;

Aos meus genros Gustavo e Luis Augusto pelo incentivo, pela ajuda na formatação da tese e das planilhas Excel, mas principalmente pelo amor às minhas filhas;

À minha família e antepassados, na certeza de que o amor, apesar das diferenças, mantém a união de todos. Em particular, à minha Madrinha Dandan, católica fervorosa, sem cujas orações eu talvez nunca fosse uma médica;

Às minhas secretárias do lar: Salomé e Leda. Sem elas para organizar minha casa e fazer uma comidinha gostosa não teria sido possível concluir este estudo;

Ao Prof. Doutor Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, que viabilizou meu sonho de entrar para o mundo da pesquisa. Obrigada por esta oportunidade de ingressar neste mundo fantástico dos porquês e de fazer parte do grupo do Laboratório de Transporte de Membrana da UERJ. Obrigada pela imprescindível motivação e orientação que foram essenciais para o meu desenvolvimento e amadurecimento científico;

À Profª Doutora Tatiana Brunini, com quem aprendi o dinamismo do trabalho científico, a elaboração de artigos, resumos, apresentações e de quem recebi permanente apoio nos meus momentos de fraqueza. Pela paciência em me guiar pelos caminhos da ciência, e pela confiança em minha formação pessoal e profissional;

À Natalia Pereira, minha amiga, irmã mais nova que tanto me fez lembrar de minha entusiasmada juventude. Obrigada por seu contínuo suporte e, apesar da juventude, aconselhamento;

À Mariana Siqueira, colega que se tornou grande amiga. Pela ajuda nos vários momentos desses anos de doutoramento. Também pelo exemplo de dedicação pessoal e profissional e pela correção final dos meus erros de português neste texto;

À Marcela dos Anjos, pela ajuda nos experimentos e na bancada. Pela amizade e pelas inspiradoras conversas ecológicas;

À Monique Moss, por ter me mostrado, com a genialidade de seus rápidos pensamentos, quão fácil era fazer os inúmeros experimentos;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Transporte de Membrana pelo carinho, amizade e contribuição, cada um à sua maneira. Luísa Meirelles, Vivian Liane, Paula Fontoura, Cristiane Matsura e Anicet Okinga, com vocês aprendi quanto pode ser gratificante o trabalho em grupo;

Ao Prof. Dr. Roberto Soares de Moura pelo incentivo para que eu iniciasse meu doutorado junto ao Departamento de Farmacologia e em especial Profª Angela Resende e alunas Dayane e Cristiane;

À secretaria do Programa de Pós-graduação, Maria Amélia Gomes, pelo suporte em todos os trâmites burocráticos ao longo do curso;

Ao professores Egberto Moura pelos valiosos conselhos e suporte quando do ingresso no curso;

Aos meus jovens pacientes e controles. Sem eles não teria sido possível chegar a estes resultados. Obrigado pela contribuição à ciência.

Aos meus colegas do IEDE, onde desenvolvi grande parte da minha carreira como médica e onde aprendi a paixão pela Endocrinologia.

Por fim, na impossibilidade de referir nominalmente todos aqueles que prestaram alguma ajuda para a elaboração desta tese, deixo o meu agradecimento.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

RESUMO

ASSUMPÇÃO, Carmen Regina Leal de. *A via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de adolescente com obesidade e síndrome metabólica*. 2010. 140f. Tese (Doutorado em Ciências – Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A prevalência da obesidade e da síndrome metabólica (SM) vem aumentando dramaticamente em jovens e está se tornando um problema de saúde pública na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Tanto a obesidade quanto a SM aumentam o número de pacientes expostos ao risco de doença cardiovascular. Estudos recentes mostram que uma redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) é um dos principais fatores que contribui para a ação deletéria da insulina nos vasos de pacientes adultos com obesidade e SM. O NO, potente vasodilatador e anti-agregante plaquetário, tem como precursor o aminoácido catiônico L-arginina que é transportado para o interior das plaquetas através do carreador γ^+L . Uma família de enzimas denominadas NO sintases (NOS) catalisa a oxidação da L-arginina em NO e L-citrulina e é composta de três isoformas: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Os objetivos principais do presente estudo são de investigar diferentes etapas da via L-arginina-NO em plaquetas associando agregação plaquetária, concentração plasmática de L-arginina, estresse oxidativo, marcadores metabólicos, hormonais, clínicos e inflamatórios em pacientes adolescentes com obesidade e SM. Foram incluídos no estudo trinta adolescentes, sendo dez com obesidade, dez com SM, e dez controles saudáveis pareados por idade, sexo e classificação de Tanner (controles: n= 10, 15.6 ± 0.7 anos; obesos: n= 10, 15 ± 0.9 anos; SM: n= 10, 14.9 ± 0.8 anos). O transporte de L-arginina ($\text{pmol}/10^9\text{cél}/\text{min}$) através do sistema γ^+L estava diminuído nos pacientes com SM (18.4 ± 3.8) e obesidade (20.8 ± 4.7), comparados aos controles (52.3 ± 14.8). Houve uma correlação positiva do influxo de L-arginina via sistema γ^+L com os níveis de HDL-Colesterol. Por outro lado, foi encontrada uma correlação negativa do influxo de L-arginina com os níveis de insulina, os índices Homa IR, relacionado a RI, Homa Beta, relacionado a função da célula beta e também com os índices de Leptina. Em relação a produção de NO, a obesidade e a SM não afetaram a atividade e expressão das enzimas NOS. A atividade da superóxido dismutase (SOD), através da mensuração da inibição da auto-oxidação da adrenalina, mostrou diferença significativa nas plaquetas de pacientes com obesidade ($4235 \pm 613,2\text{nMol}/\text{mg}$ de proteína), quando comparada aos controles ($1011 \pm 123,6\text{ nmol}/\text{mg}$ de proteína) e SM ($1713 \pm 267,7\text{ nmol}/\text{mg}$ de proteína). A nível sistêmico, foi também evidenciada uma ativação desta enzima anti-oxidante no soro de pacientes obesos, em relação aos controles. A peroxidação lipídica avaliada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estava inalterada no soro dos pacientes e controles. Estes resultados sugerem que o transporte de L-arginina diminuído nas plaquetas de adolescentes obesos e com SM pode ser um marcador precoce de disfunção plaquetária. A alteração desta via correlaciona-se com a resistência à insulina e hiperinsulinemia. A contribuição deste estudo e de fatores que possam ser

precocemente identificados pode diminuir o risco cardiovascular na vida adulta desta população de pacientes.

Palavras-chave: Obesidade. Síndrome Metabólica. Plaqueta. Óxido Nítrico. L-arginina. Sistema γ^+L .

ABSTRACT

The prevalence of obesity and metabolic syndrome (MS) is dramatically increasing in young people and becoming a public health problem in the majority of developed and developing countries. Both obesity and MS increase the number of patients exposed to the risk of cardiovascular disease. Recent studies have shown that a reduction in nitric oxide (NO) bioavailability is one of the major factors contributing to the deleterious action of insulin in the blood vessels of adult patients with obesity and MS. NO, a powerful vasodilator and platelet anti-aggregating agent, has the cationic amino acid L-arginine as a precursor, which is transported into platelets via transport system y^+L . A family of enzymes known as NO synthases (NOS) catalyses the oxidation of L-arginine in NO and L-citrulline and is composed of three isoforms: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) and endothelial (eNOS). The major objectives of this study are to investigate different steps of the L-arginine-NO pathway in platelets and their association with platelet aggregation, L-arginine plasma concentration, oxidative stress, and metabolic, hormonal, clinical and inflammatory markers in adolescent patients with obesity and MS. Thirty adolescents were included in this study: ten with obesity, ten with MS and ten healthy controls paired by age, sex and Tanner classification (controls: $n=10$, 15.6 ± 0.7 years; obese: $n=10$, 15 ± 0.9 years; MS: $n=10$, 14.9 ± 0.8 years). L-arginine transport ($\text{pmol}/10^9\text{cells}/\text{min}$) via system y^+L was reduced in patients with MS (18.4 ± 3.8) and obesity (20.8 ± 4.7) compared to controls (52.3 ± 14.8). There was a positive correlation between L-arginine influx via system y^+L and HDL-cholesterol. On the other hand, a negative correlation was found between L-arginine influx via system y^+L and insulin levels, Homa-IR related to insulin resistance, Homa-Beta, related to beta-cell function and the leptin index. In relation to nitric oxide production, obesity and MS do not affect the activity and expression of NOS enzymes. The activity of superoxide dismutase (SOD), by measuring the inhibition of adrenaline autoxidation, showed a significant difference in platelets from patients with obesity ($4235 \pm 613,2\text{nMol}/\text{mg}$ protein) compared to controls ($1011 \pm 123,6 \text{ nmol}/\text{mg}$ de protein) and MS ($1713 \pm 267,7 \text{ nmol}/\text{mg}$ protein). At the systemic level, an activation of this anti-oxidant enzyme was also observed in the serum of patients with obesity and MS in relation to controls in the presence of similar levels of substances that are reactive to tiobarbituric acid (TBARS), a marker of lipid peroxidation. These results suggest that diminished L-arginine transport in platelets from adolescents with obesity and MS may be an early marker of platelet dysfunction. The alteration of this pathway correlates to insulin resistance and hyperinsulinemia. The contribution of this study and of factors that can be identified early may reduce cardiovascular risk during adult life in this population of patients.

Key words: Obesity. Metabolic Syndrome. Platelet. Nitric oxide. L-arginine. System y^+L .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características clínicas e nutricionais dos controles saudáveis e dos pacientes com obesidade e SM	87
Tabela 2 –	Dados laboratoriais dos controles e dos pacientes com síndrome metabólica e dos pacientes com obesidade	89
Tabela 3 –	Concentrações plasmáticas dos aminoácidos ($\mu\text{M/L}$) em controles (n=6), pacientes com SM (n=6) e pacientes obesos (n=6)	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Classificação do estado nutricional de acordo com o percentil <i>CDC- NCHS</i>	25
Quadro 2 –	Frequência de sobrepeso e obesidade em estudos pontuais no Brasil	26
Quadro 3 –	Componentes da síndrome metabólica em adultos e adolescentes	30
Quadro 4 –	Características principais das três isoformas das NOS	49
Quadro 5 –	Solução de Krebs. pH=7,4	79
Quadro 6 –	Composição do tampão de extração de proteínas. pH =7,5	81
Quadro 7 –	Composição do tampão de amostra. pH= 6,8	81
Quadro 8 –	Composição do tampão de corrida	81
Quadro 9 –	Composição do tampão de transferência	81
Quadro 10 –	Composição do citrato de sódio	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Receptor de insulina, sinalização celular e ação na eNOS	31
Figura 2	– Membrana plasmática.	35
Figura 3	– Balsa lipídica ou Lipid Raft.	36
Figura 4	– Fosfolípídeos de membrana na sinalização celular.	37
Figura 5	– A-Carreador e Canais; B-Transportador.	38
Figura 6	– Uniporte, simporte e antiporte.	39
Figura 7	– Modelo esquemático do sistema γ^+L .	41
Figura 8	– A síntese de L-arginina.	43
Figura 9	– Síntese do NO.	45
Figura 10	– A via L-arginina-óxido nítrico.	46
Figura 11	– Vias utilizadas pelo óxido nítrico (NO) de acordo com sua concentração.	47
Figura 12	– Estrutura da NOS mostrando o acoplamento entre as duas subunidades para formar o dímero ativo.	50
Figura 13	– Acoplamento e desacoplamento da eNOS.	51
Figura 14	– Condução da eNOS à cavéola.	52
Figura 15	– Caveolina.	53
Figura 16	– Via DAG-IP3.	55
Figura 17	– Visão geral da eNOS.	56
Figura 18	– A plaqueta. A: componentes e organização; B: receptores (preto) e agonistas (cinza).	59
Figura 19	– Agonistas, receptores e sistemas efetores na ativação plaquetária.	60
Figura 20	– Efeitos do óxido nítrico (NO) na inibição plaquetária via GMPc.	63
Figura 21	– Agregação das plaquetas.	64
Figura 22	– Ação da HDL na eNOS.	68
Figura 23	– Hiperglicemia e EROS.	72
Figura 24	– Hipertensão e EROS.	74
Figura 25	– Exemplo de um experimento de agregação plaquetária induzida por diferentes concentrações de colágeno (2 – 6 $\mu\text{g/ml}$).	85
Figura 26	– Transporte de L-arginina em plaquetas de controles e pacientes com SM e obesidade.	91
Figura 27	– Produção de L-citrulina em plaquetas de controles e pacientes com SM e obesidade.	91
Figura 28	– Concentração intraplaquetária de GMPc de controles e pacientes com SM e obesidade.	92
Figura 29	– Agregação das plaquetas de controles e dos pacientes com SM.	92

Figura 30 –	Expressão da NOS endotelial em plaquetas de pacientes obesos e com SM e controles.	93
Figura 31 –	Expressão da NOS induzível em plaquetas de pacientes obesos e com SM e controles.	94
Figura 32 –	Formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em soro de pacientes obesos e com SM e controles.	94
Figura 33 –	Atividade da SOD em soro de pacientes obesos e com SM e controles.	95
Figura 34 –	Atividade da SOD em plaquetas de pacientes obesos e com SM e controles.	96
Figura 35 –	Correlação HDL-colesterol vs influxo de L-arginina.	97
Figura 36 –	Insulina vs influxo de L-arginina.	97
Figura 37 –	Índice Homa IR vs influxo de L-arginina.	98
Figura 38 –	Índice Homa Beta vs influxo de L-arginina.	98
Figura 39 –	Leptina vs influxo de L-arginina.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ACD	Ácido cítrico
ADA	American Diabetes Association
ADMA	Dimetil-L-arginina-assimétrica
ADP	Difosfato de adenosina
AG	Ácido graxo
AGEs	Produtos finais de glicação
AGLs	Ácidos graxos livres
AMPc	Adenosina monofosfato
AMPK	AMP-activated kinase
AN	Anorexia nervosa
ANOVA	Análise de variância
ApoB100	Apolipoproteína B100
Akt	Proteína quinase
ATP	Trifosfato de adenosina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
β	Beta
Ca ⁺⁺	Cálcio
CAT	Transportador de aminoácido catiônico
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclo-oxigenase
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
EEJK	Escola Estadual de Formação de Professores Júlia Kubitschek
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EP	Erro padrão

ER	Receptor de estrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fibrilação atrial
FAD	Dinucleotídeo adenina-flavina
FMN	Mononucleotídeo flavina
FvW	Fator de Von Willebrand
GC	Guanilato ciclase
GC _s	Guanilato ciclase solúvel
Gene ob	Gene obesidade
GGT	Gama glutamil transferase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL-C	HDL-Colesterol , Lipoproteína de alta densidade
HOMA	Homeostatic Model Assessment
HOMA IR	Homa Insulin Resistance
HOMA BETA	Homa Beta-cell function
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HSPs	Proteínas de choque térmico
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IEDE	Intituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia
IMC	Índice de massa corporal
IRC	Insuficiência renal crônica
IP ₃	Trifosfato de inositol
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRS-1	Substrato1 do receptor de insulina
K _m	Constante de afinidade

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLpd	Lipoproteína de baixa densidade com partículas pequenas e densas
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPL	Lipoproteína Lipase
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocondrial
Na ⁺	Sódio
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida
NCEP-ATP	National Cholesterol Education Program's-Adult Treatment Panel
NCHS	National Centre for Health Statistics
NESA	Núcleo de Estudos da Saúde do Adolescente
NFκB	NF-Kappa Beta
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O ²	Óxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PARs	Receptores ativados de proteases
PCR	Proteína C reativa
PDE	Fosfodiesterase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol trifosfato

PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PPP	Plasma pobre em plaqueta
PPC	Fosfatidilcolina poli-insaturada
PRP	Plasma rico em plaqueta
RI	Resistência insulínica
SM	Síndrome metabólica
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SRBI	Receptor de Scanverge
SRI	Substrato do receptor de insulina
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGs	Triglicerídeos
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular do endotélio
VLDLs	Lipoproteínas de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1	Obesidade	22
1.2	Síndrome metabólica	25
1.3	Fisiopatologia da síndrome metabólica	28
1.4	Membrana plasmática e características dos carreadores de membrana	33
1.4.1	<u>Sistema de transporte de aminoácidos catiônicos</u>	38
1.5	A via L-arginina-óxido nítrico	40
1.5.1	<u>Paradoxo da via L-arginina-NO</u>	54
1.6	Caracterização da via L-arginina-NO em plaquetas	55
1.7	A via L-arginina-NO na SM e na obesidade	62
1.8	Síndrome metabólica, inflamação e estresse oxidativo	67
2	OBJETIVOS	74
2.1	Objetivo geral	74
2.2	Objetivos Específicos	74
3	METODOLOGIA	75
3.1	Seleção dos indivíduos	75
3.2	Aspectos éticos	76
3.3	Avaliação clínica e laboratorial	76
3.4	Isolamento e preparo das plaquetas	77
3.5	Extração de proteína e Western Blotting	78
3.6	Dosagem de proteína	80
3.7	Dosagem de aminoácidos	80
3.8	Transporte de L-arginina em plaquetas	80
3.9	Análise cinética	81
3.10	Análise da atividade da NOS plaquetária	81
3.11	Mensuração de GMPc intracelular	82
3.12	Agregação plaquetária	82
3.13	Determinação da peroxidação lipídica	83
3.14	Análise da atividade da superóxido dismutase	84
1.15	Análise estatística	84
3.16	Reagentes	84
4	RESULTADOS	85
4.1	Resultados da avaliação clínica	85
4.2	Resultados laboratoriais	86
4.2.1	<u>Hematologia, bioquímica e hormônios</u>	86
4.2.2	<u>Aminoácidos</u>	88
4.2.3	<u>Transporte de L-arginina em plaquetas</u>	89

4.2.4	<u>Atividade da NOS em plaquetas</u>	89
4.2.5	<u>Concentração intraplaquetária de GMPc</u>	90
4.2.6	<u>Agregação plaquetária</u>	90
4.2.7	<u>Expressão das isoformas da NOS em plaquetas</u>	91
4.2.8	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no soro</u>	92
4.2.9	<u>Atividade da SOD nas plaquetas</u>	93
4.2.10	<u>Atividade da SOD no soro</u>	93
4.3	Correlações	94
4.3.1	<u>HDL-C vs influxo de L-arginina via sistema y+L</u>	94
4.3.2	<u>Correlação da insulina vs influxo de L-arginina via sistema y+L</u>	95
4.3.3	<u>Correlação do índice Homa vs influxo de L-arginina via sistema y+L</u>	96
4.3.4	<u>Correlação da eptina vs influxo de L-arginina via sistema y+L</u>	97
5	DISCUSSÃO	98
6	CONCLUSÃO	107
7	REFERÊNCIAS	108
	ANEXO 1 – Curva do IMC para as idades de 2 a 20 anos para o sexo masculino	126
	ANEXO 2 – Curva do IMC para as idades de 2 a 20 anos para o sexo feminino	127
	ANEXO 3 – CEP/HUPE processo 451	128
	ANEXO 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	129
	ANEXO 5 – Protocolo do Laboratório de Transporte de Membrana	130
	ANEXO 6 – Produção científica	134

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que está se tornando um problema de saúde pública (COUTINHO et al., 2008), sendo notório o seu agravamento no Brasil (MONTEIRO et al., 1995). Além de ser considerada um fator de risco cardiovascular independente (HUBERT et al., 1983), a obesidade predispõe a outros fatores de risco, como hipertensão, diabetes mellitus (DM) e câncer (WEISS et al., 2004; KAC et al., 2003).

O Brasil e diversos países da América Latina experimentaram, nos últimos vinte anos, rápidas alterações demográficas, epidemiológicas e nutricionais (KAC et al., 2003), caracterizando a transição nutricional, que consiste na passagem da desnutrição para a obesidade (FERREIRA et al., 2005). Apesar das características e dos estágios de desenvolvimento desta transição diferir de país para país, há uma alteração comum: o marcante aumento na prevalência da obesidade em toda a população latino-americana (KAC et al., 2003).

Os extremos como superalimentação e subnutrição ocorrem muitas vezes simultaneamente em populações de adolescentes (ANDERSON, 1991). A maior parte das alterações decorrentes da obesidade em adultos acontece menos frequentemente em crianças porque, talvez, o tempo seja insuficiente para surgir na infância. O grau de obesidade em crianças e adolescentes possui implicações clínicas futuras importantes, uma vez que a mortalidade entre adultos com obesidade severa é duas vezes maior do que entre os adultos moderadamente obesos (WEISS et al., 2004).

A síndrome metabólica (SM) é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência insulínica (RI). É importante destacar a associação da SM com a doença cardiovascular, aumentando a mortalidade geral em aproximadamente 1,5 vezes e a cardiovascular em cerca de 2,5 vezes (I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA, 2005).

A prevalência de obesidade está aumentando na infância, e os dados publicados do *Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHNES)* mostram que 30% dos adolescentes com sobrepeso têm critérios compatíveis com a SM (SINAIKO et al., 2005). Esta síndrome em crianças e adolescentes está relacionada ao grau de obesidade, à RI e às concentrações de adiponectina diminuídas (WEISS et al., 2004).

O aminoácido precursor para formação do óxido nítrico (NO) é a L-arginina, cuja origem pode ser endógena ou exógena. Existem poucos trabalhos avaliando a via L-arginina-NO na população de adolescentes com obesidade ou síndrome metabólica (ASSUMPÇÃO et al., 2008; GRUBER et al., 2008).

O óxido nítrico é um potente regulador do tônus vasomotor e uma importante molécula antiaterogênica, atuando no endotélio de modo a favorecer a vasodilatação, inibir a proliferação de células do músculo liso e promover a modulação das interações celulares por inibição da adesão celular e plaquetária (MONCADA; HIGGS, 2006). O NO está envolvido nas consequências nas obesidade como a hipertensão e diabetes, participando também na regulação das funções vasculares e na gênese das doenças cardiovasculares e renais (MENDES RIBEIRO et al., 2001; MONCADA; HIGGS, 2006; BRUNINI et al., 2007).

A biodisponibilidade do NO vai depender tanto da sua síntese quanto da sua destruição. O estresse oxidativo é mais bem definido como o excesso de radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (ERO) em relação aos sistemas antioxidantes - enzimas catabólicas e quelantes de ERO (DURSUN et al., 2005). Tanto o aumento da produção de ERO como a redução dos antioxidantes pode decorrer de uma grande variedade de injúrias celulares, de natureza física, química ou ambiental (KAUR; GEETHA, 2006). O NO liberado pode ser inativado ao reagir rapidamente com o superóxido, formando o peroxinitrito, que é altamente deletério. A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e é considerada a primeira linha de defesa do organismo (PARAVICINI; TOUYZ, 2008).

Sabe-se que, na ausência de concentrações adequadas de co-fatores e de substrato, a óxido nítrico sintase (NOS), enzima responsável pela formação do NO, passa a funcionar de maneira anômala, produzindo ERO, além de NO, que interagem entre si e originam peroxinitrito. Desta maneira, se houver estímulo da

NOS por esta via anômala, o resultado final será a elevação do peroxinitrito (MONCADA; HIGGS, 2006). Estas ERO são encontradas em uma variedade de distúrbios vasculares, incluindo hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, e aterotrombose (LOSCALZO, 2001).

A diminuição da biodisponibilidade do NO pode resultar em alteração da vasodilatação dependente do endotélio e promover aterosclerose (GRUBER et al., 2008). Considerando que vários mediadores como glicose, lipídios, marcadores inflamatórios e hormônios, bem como parâmetros clínico-metabólicos, podem estar envolvidos nesta via, o presente estudo visa esclarecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de jovens portadores de obesidade e síndrome metabólica.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Obesidade

Não existe um consenso universal sobre um ponto de corte para a definição de sobrepeso ou obesidade em crianças e adolescentes. Normalmente, para a prática clínica e estudos epidemiológicos, crianças com sobrepeso e obesidade são avaliadas por meio de indicadores com base no peso e altura, ou índice de massa corporal (IMC) sexo e idade-específicos, sendo calculado pelo peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado ($\text{peso (Kg)} / \text{altura (m)}^2$) (WHO Global Database on Body Mass Index). Nos últimos anos, IMC foi cada vez mais aceito como uma medida indireta do tecido adiposo em crianças e adolescentes para fins de pesquisa (DIETZ et al., 1998).

Conde e Monteiro (2006) propuseram uma curva do IMC ajustada de acordo com sexo e idade para a população brasileira. Nos Estados Unidos da América (EUA), o *National Centre for Health Statistics - NCHS*, de acordo com o *Center for Disease Control and Prevention-CDC*, utilizam as curvas do IMC como medida-

padrão para identificar o estado nutricional da criança e do adolescente específica para o sexo e a idade (KUCZMARSKI et al., 2002) (Quadro 1).

Estado Nutricional de Crianças e Adolescentes	Percentil
Desnutrido	Percentil < 5
Eutrófico	Percentis entre 5 e 85
Sobrepeso (risco)	Percentis entre 85 e 95
Obesidade	Percentil \geq 95

Quadro 1. Classificação do estado nutricional de acordo com o percentil CDC-NCHS (KUCZMARSKI et al., 2002).

A obesidade na infância e na adolescência está aumentando universalmente. Sua prevalência, nos Estados Unidos da América, aumentou de 5 % para 11% entre 1980 e 1994, atingindo 15.5% desta população em 2000 (TRIOANO et al., 1995; OGDEN et al., 2002).

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

Hoffman et al. (2000) sugerem que a desnutrição crônica nos primeiros anos está associada a uma capacidade reduzida de oxidação de gorduras no período pós-prandial ao longo da vida. Isso explicaria a tendência à obesidade na vida adulta daqueles indivíduos que foram submetidos a agravos nutricionais no início da vida e que são expostos posteriormente a uma dieta mais rica em gordura, conforme é observado na juventude atual. Esse fato pode ser particularmente relevante se os adolescentes possuem uma vida sedentária (SCHNEIDER et al., 2000).

Um alto risco de crianças obesas raquíticas também tem sido descrito em outros países em desenvolvimento que estão sofrendo transição nutricional (FLORENCIO et al., 2001). Além disso, os adolescentes que tiveram um retardo de crescimento intrauterino e permanecem com este atraso ao nascer tendem a possuir mais peso durante o estirão de crescimento (JAQUET et al., 1999). Então, sugere-se que a maturação inicial, que responde a fatores genéticos e ambientais, inclusive a

alto nível de nutrição, possa ser um indicador de risco para o desenvolvimento de obesidade.

No Brasil entre os anos 1974/75 e 1989, ocorreu uma redução da desnutrição infantil de 19,8% para 7,6% e um aumento na prevalência da obesidade em adultos de 5,7% para 9,6% (MONTEIRO et al., 1995). No período de 1974/75 a 1996/97, a prevalência do excesso de peso em crianças e adolescentes aumentou de 4.1% para 13.9% (WANG et al.,2002).

Na faixa etária pediátrica, estudos nacionais demonstram prevalências de excesso de peso que variam entre 10,8% e 33,8% em diferentes regiões (Quadro 2).

Autor	Estudo	Prevalência de sobrepeso	Prevalência de obesidade
Motta e Silva (2001)	Com crianças de uma comunidade de baixa renda na Região Nordeste	10,1%	4,6%
Balaban e Silva (2001)	Com crianças e adolescentes de escolas de classe média alta de Recife	26,2%	8,5%
Leão et al. (2003)	Com escolares da rede pública e particular da cidade de Salvador	—	15,8%
Anjos et al (2003)	Com escolares e adolescentes da rede municipal de ensino da cidade do Rio de Janeiro	18% no sexo feminino e 14% no masculino	5% em ambos os sexos
Giuliano e Melo (2004)	Em escola de classe média de Brasília	12,9% em meninos, 16,1% em meninas	5,9% nos meninos e 5,1% nas meninas
Sotelo et al. (2004)	Observação de escolares em São Paulo	Meninos: 10,3%, Meninas: 13,8%	Meninos: 13,7%, Meninas: 16,5%
Pascoe (2005)	Em escolas públicas e privadas da cidade de São Paulo	23%	8%
Costa et al. (2006)	Com escolares da cidade de Santos	15,7%	18%
Brasil et al. (2007)	Em escolares de rede pública e privada de Natal - RN	11,0%	22,6%
Baneto et al. (2007)	Em pré-escolares de rede pública e privada de Natal - RN	14,1%	12,4%

Quadro 2. Frequência de sobrepeso e obesidade em estudos pontuais no Brasil.

Em um estudo realizado no Sul do Brasil, no período de 2001-2002, 21% de adolescentes com idades entre 15-18 anos estavam acima do peso e 5% eram

obesos (TERRES et al., 2006.). Outro estudo nacional realizado em adolescentes brasileiros com idade entre 10-19 anos, a prevalência de sobrepeso e obesidade foi de 7,7%, atingindo 10,6% no grupo feminino e de 4,8% no masculino (NEUTZLING et al., 2000).

Estima-se que a obesidade cause aproximadamente 300.000 mortes anualmente e que o seu custo direto e indireto com a saúde é de U\$ 117 bilhões, de acordo com o *NHANES*, 2003-2004. Com base em artigos de língua inglesa, os gastos de saúde com a obesidade foi estimado entre 0,7% a 2,8%. Além disso, indivíduos obesos tem custos médicos aproximadamente 30% maior do que seus pares com peso normal (WITHROW et al.,2010).

1.2 Síndrome metabólica

Kylin, um clínico sueco, em 1920, descreveu um conjunto de doenças formado por hipertensão, hiperglicemia e gota. Em 1936, um médico inglês, Himmsworth, reconheceu que existiam dois tipos de DM, sendo que um grupo era mais resistente à insulina exógena, dando início ao conceito de RI (HIMMSWORTH, 1936; PREETHI, 2005). A RI é uma anormalidade metabólica mais característica em indivíduos com obesidade (BONADONNA *et al.*,1990).

Defronzo et al.,1979, desenvolveram a técnica do *clamp* de glicose com suas duas principais variações . A primeira diz respeito ao *clamp* hiperglicêmico, que permitia examinar a resposta secretória de insulina à glicose e quantificar o consumo do organismo como um todo sob condições constantes de hiperglicemia. A segunda variação é o *clamp* euglicêmico, que permite a mensuração da captação total de glicose em resposta a uma hiperinsulinemia fixa. A determinação da sensibilidade à insulina pelo *clamp* é baseada no conceito de que, em condições constantes nos níveis de glicemia e hiperinsulinemia, a quantidade de glicose consumida pelos tecidos seria igual à quantidade de glicose infundida durante um teste no qual a glicemia é mantida dentro de limites constantes e normais. A variante euglicêmica hiperinsulêmica constitui o padrão-ouro para a avaliação da ação da insulina, segundo consenso da *American Diabetes Association* (ADA), 1998.

Matthews et al. (1985) demonstraram que a disfunção das células-beta (β) e a RI são anormalidades metabólicas inter-relacionadas na etiologia do DM2 e desenvolveram um modelo matemático mais simples para prever a sensibilidade à insulina pela simples medida da glicemia e insulina de jejum. Este método foi chamado de *HOMA (Homeostatic Model Assessment)* e dele se extraem dois índices *Homa IR (insulin resistance)* e *Homa Beta (beta-cell function)*, que visam traduzir a sensibilidade à insulina (RI) e a capacidade secretória de célula beta (função da célula beta), respectivamente. Tanto a insulina de jejum quanto o *HOMA* têm sido utilizados como medidas de RI, sendo obtidos resultados semelhantes quando apenas um é utilizado (MATTHEWS et al., 1985).

Bao et al., 1996, avaliaram, a longo prazo, os níveis de insulina plasmática em crianças (5 a 9 anos de idade) e em adultos jovens (17 a 23 anos de idade) da população do *Bogalusa Heart Study* (Freedman et al., 1999). Após oito anos de acompanhamento, verificou-se que a prevalência da obesidade foi de 72% nos indivíduos que apresentavam níveis de insulina persistentemente elevados e os casos de hipertensão e dislipidemia foram de 2,5 a 3,0 vezes maiores, respectivamente, para estes indivíduos.

Souza et al., 2007 observaram elevação significativa da insulinemia e presença de RI nos adolescentes obesos.

Weiss et al., (2004) demonstraram que a RI é um fator independente, entre outros, no diagnóstico da SM em crianças e adolescentes obesos, sugerindo que os mecanismos fisiopatológicos relacionados a essa síndrome nos adultos já estavam operando desde a infância.

Existem dois tipos de obesidade: andróide e ginóide. A primeira se assemelha ao tipo masculino, predominantemente abdominal e tem uma estreita relação com as anormalidades metabólicas, tais como DM2, hiperlipidemia, e hiperuricemia. A segunda se caracteriza por deposição de gordura tipo periférica, em quadril e membros inferiores, típica do sexo feminino (VAGUE, 1947).

A síndrome X descrita por Reaven, 1988, incluía RI, hiperglicemia, hipertensão, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicerídeos elevados. Esta síndrome é um estágio intermediário entre o metabolismo normal e DM2, e foi subsequentemente denominada de SM. A associação entre obesidade central e risco de desenvolver DM2, doença cardiovascular e mortalidade foi então

descoberta, bem como a relação entre deposição central de gordura, anormalidades metabólicas e doença aterosclerótica (ABHIRAM et al., 2004).

Nos EUA, a SM apresenta uma elevada prevalência, que vem crescendo nas últimas décadas. Aproximadamente 47 milhões de americanos têm SM, especialmente os afros e hispânico-descendentes (BOPP; BARBIERO, 2009).

É importante destacar que a associação da SM com a doença cardiovascular documentada pelos grandes estudos epidemiológicos de *coorte* aumenta a mortalidade geral em cerca de 1,5 vezes e a cardiovascular em aproximadamente 2,5 vezes (WEISS et al., 2004).

Em crianças e adolescentes, a SM ainda não está bem definida, entretanto, os distúrbios metabólicos associados à obesidade também são descritos nessa faixa etária. Cruz et al. (2004) realizaram um estudo com uma população de jovens hispânicos com excesso de peso e mostraram uma prevalência extremamente elevada de SM (30%), bem como nos adultos (31.9%). Além disso, a RI se correlacionou de forma independente com perfil lipídico adverso, obesidade abdominal e pressão arterial.

Uma das definições de SM mais utilizadas para caracterizá-la em adolescente é uma versão modificada por Cook et al (2003) dos critérios utilizados no adulto, segundo o *NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program's-Adult Treatment Panel)*. Por este critério, a SM representa a combinação de pelo menos três componentes em adultos e adolescentes (Quadro 3). Nessas duas definições, valoriza-se a circunferência abdominal.

Segundo Cole et al., 2000, a circunferência da cintura, especialmente nas meninas, durante os últimos 20 anos, excede em muito os do índice de massa corporal, sendo um bom indicador para a obesidade central.

Os adolescentes com idades entre 12 e 19 anos que participaram do *NHANES III (1988-1994)* apresentaram uma prevalência de SM de 6.8% entre adolescentes com sobrepeso e 28.7% entre adolescentes obesos (COOK et al., 2003), indicando que a obesidade agrava a SM.

Dados extraídos do *NHANES IV (1999-2000)* demonstraram prevalência da SM ainda maior entre os adolescentes obesos (32,1%). O estudo de *coorte* Bogalusa (FREEDMAN et al., 1999) mostrou que indivíduos com SM, seguidos desde a infância

por 25 anos, têm o risco cardiovascular 20 vezes superior, enquanto adultos jovens, comparados com os que tinham SM apenas quando crianças.

Em um estudo com 1.550 estudantes brasileiros, foi evidenciado que 8% das crianças estavam acima do peso. Dentre essas, 17.3% tinham síndrome metabólica, confirmando que o Brasil também apresenta elevada prevalência, como observado outros países (FERREIRA et al., 2005).

Componentes	Adultos NCEP-ATP III	Adolescentes NCEP-ATP III Cook modificado
Cintura Homens	> 102 cm	> 90º percentil
Cintura Mulheres	> 88 cm	> 90º percentil
Triglicerídeos	> 150 mg/dL	> 110 mg/dL
HDL Colesterol Homens	< 40 mg/dL	< 40 mg/dL
HDL Colesterol Mulheres	< 50 mg/dL	< 40 mg/dL
Pressão arterial	>130 x 85 mmHg	> 90º percentil
Glicemia jejum	> 110 mg/dL	> 110 mg/dL

Quadro 3. Componentes da síndrome metabólica em adultos e adolescentes.

1.3 Fisiopatologia da síndrome metabólica

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta do pâncreas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e de aminoácidos após as refeições. A insulina age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio bem como bloqueios da produção hepática de glicose e da lipólise. Além disso, a insulina tem efeito na expressão de genes e síntese protéica, assim como na proliferação e diferenciação celulares. Outras funções da insulina incluem o controle da ingestão alimentar, a prevenção da apoptose, a promoção da sobrevivência celular e o aumento da produção NO no endotélio (GODOY-MATOS, 2005, p.19).

A RI tem sido tradicionalmente definida a partir de uma visão glucocêntrica, ou seja, quando um defeito na ação da insulina resulta em uma hiperinsulinemia de

jejum para manter a glicemia normal (ECKEL et al., 2005). Na SM, a RI é caracterizada por alterações em diversos pontos da via de transmissão do sinal da insulina no seu receptor, com redução: da concentração e atividade quinase do receptor, da concentração e da fosforilação dos substratos do receptor de insulina (SRI) 1 e 2, da atividade de fosfatidilinositol 3 quinase (PI₃K), da translocação dos receptores de glicose GLUT4 e da atividade das enzimas intracelulares (ALANIZ et al., 2006) (Figura 1).

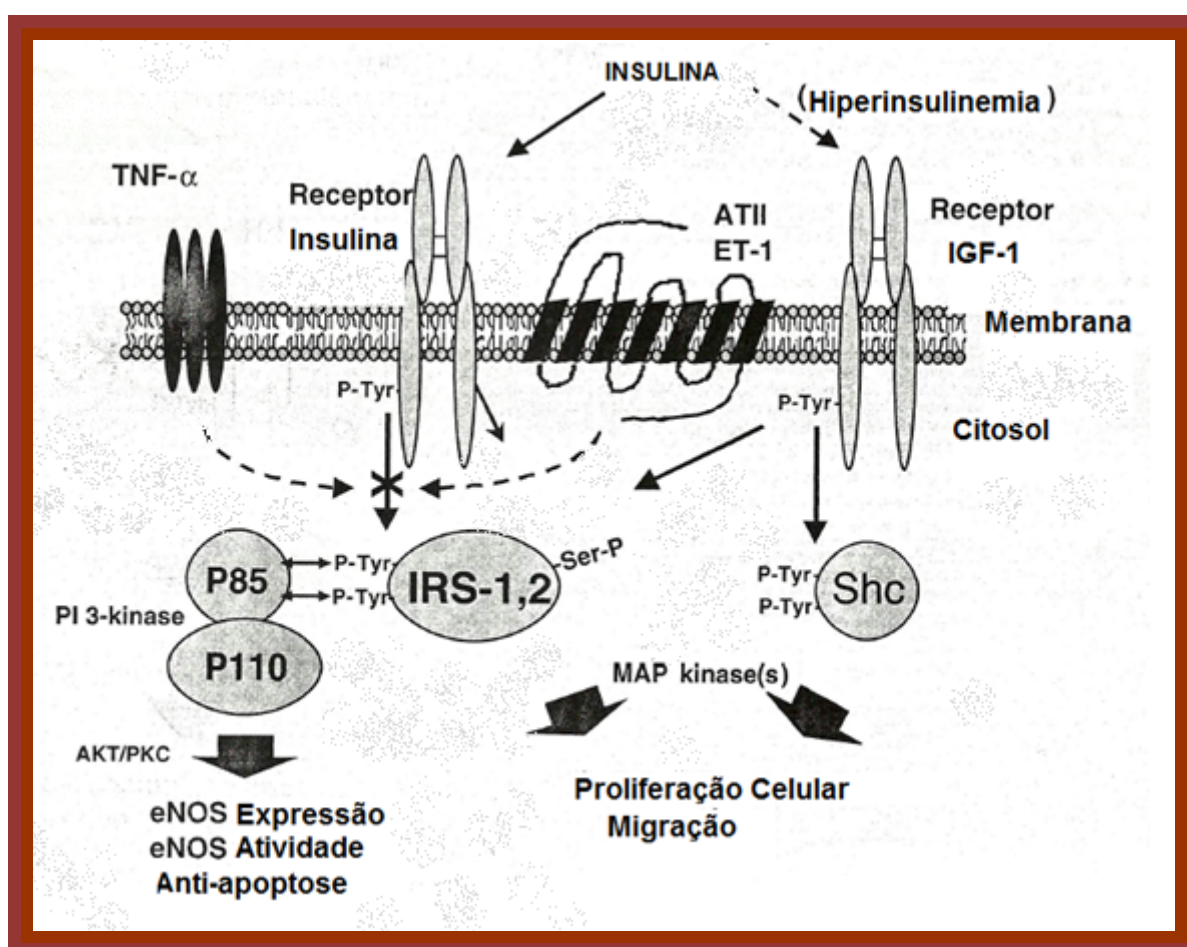


Figura 1. Receptor de insulina, sinalização celular e ação na eNOS.

IGF-1- *Insulin-like Growth Factor*, TNF-Alfa (TNF- α)- Fator de Necrose Tumoral alfa, MAP kinase- *mitogen-activated protein kinase*, ATII-Angiotensina II, ET-1-Endotelina 1 (Feener E. P; Dzau, V. J., 2005 p879)

A proteína Akt (Kinase) é uma quinase ativada por PI₃K. A Akt (PKB) família de proteínas quinases, são quinases serina/treonina, com três membros identificados (Akt1, Akt2, Akt3). A Akt é um membro bem caracterizado da via de sinalização mediada pela PI₃K, regulando crescimento celular, apoptose, síntese de

glicogênio e outras respostas celulares através da sua fosforilação. O descontrole na sinalização da Akt tem sido associado a algumas doenças e disfunções, como câncer, RI e DM. A via de sinalização celular PI₃K, é uma via que possui efeito proliferativo e antiapoptótico, e com presença das proteínas do choque térmico (HSPs) (SONG et al., 2005).

Nos tecidos-alvo, a insulina estimula duas vias principais: PI₃K e o *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). A ativação da via MAPK, leva à proliferação e migração das células musculares lisas, à redução do NO, ao aumento da endotelina-1(E-1), do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), do colágeno e da inflamação vascular predispondo à aterosclerose e à hipertensão (WILLA et al., 2003). A MAPK regula também a produção de NO-endotélio-insulino-dependente. Assim, um defeito sistêmico na PI₃K, que define a RI, leva a um defeito combinado na captação de glicose insulino-mediada, e no estímulo à vasodilatação endotelial. (WILLA et al., 2003).

A SM também se associa às elevações sistêmicas do fibrinogênio, do PAI-1 e, possivelmente, à de outros fatores de coagulação, caracterizando um estado pró-trombótico (ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino pela diversidade de substâncias secretadas que pode exercer suas ações em outros órgãos e sistemas secretando a leptina, resistina, adiponectina (hormônio sensibilizador de insulina) e as citocinas interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A adiponectina é um hormônio secretado pelos adipócitos e possui propriedades antilipolíticas e anti-inflamatórias. Alterações nos genes que codificam a adiponectina predispoem indivíduos a desenvolver SM, RI, diabetes, obesidade e doenças arteriais coronarianas. Seus níveis séricos estão diminuídos em indivíduos obesos quando comparados a indivíduos magros (VOLP et al., 2008).

Pelas suas propriedades anti-inflamatórias, estudos demonstraram a adiponectina é um hormônio marcador da SM, pois seus níveis diminuídos foram correlacionados com elevação das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e proteína C reativa (PCR) (VOLP et al., 2008).

O TNF- α é uma citocina com ação autócrina, parácrina e endócrina. Age no adipócito, desempenhando um papel regulador no acúmulo de gordura corporal, pela inibição da lipogênese, com diminuição da expressão da lipoproteína lipase

(LPL), do GLUT-4, da acetil-CoA sintetase, e com aumento da lipólise. Em humanos obesos, há forte correlação inversa entre TNF- α e metabolismo da glicose. Este efeito ocorre em razão da supressão pelo TNF- α da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do SRI-1 e a atividade PI3K. (VOLP et al., 2008).

Apesar da variedade de tipos celulares capazes de secretar citocinas, os adipócitos são os principais secretores de TNF- α e expressam seus dois tipos de receptores: TNFR I e II. O TNF- α também está envolvido na indução de aterogênese, participando da migração de monócitos e da sua conversão em macrófagos na parede endotelial, desencadeando mudanças inflamatórias na parede vascular (ALANIZ et al., 2006).

Várias proteínas do sistema hemostático e fibrinolítico, como o PAI-1, são secretadas pelos adipócitos. A expressão desse inibidor é maior no tecido adiposo visceral do que no subcutâneo. O PAI-1 está envolvido em diversos processos biológicos, inclusive na angiogênese e aterogênese (ALANIZ et al., 2006)

Uma das teorias, teoria humoral, para explicar a relação da gordura visceral e resistência à insulina propõe que o influxo de ácidos graxos (AG) liberados pela adiposidade intra-abdominal seria responsável pela maior síntese de triglicerídeos, pelo aumento da gliconeogênese hepática e, conseqüentemente, pela hiperinsulinemia compensatória e posterior RI (GODOY-MATOS, 2005 p.59). Além disso, o aumento de resistina e citocinas pelo tecido adiposo e também pelos macrófagos associado a uma redução de adiponectina contribui para a RI no músculo e no fígado (ALANIZ et al., 2006).

O tipo de adipócito da obesidade visceral tem intensa atividade lipolítica, liberando grandes quantidades de ácidos graxos livres (AGLs) na circulação portal e sistêmica. O fluxo aumentado de AGLs no fígado resulta em diminuição da captação hepática de insulina, inibindo sua ligação ao receptor e sua degradação, causando hiperinsulinemia sistêmica. Também pelo excesso de AGLs, há redução na degradação da apolipoproteína B100 (ApoB100), causando maior secreção hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs).

A proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) contribui para a remoção do colesterol dos tecidos periféricos de volta ao fígado. Uma condição pró-aterogênica se estabelece quando sua ação está aumentada, como na RI: triglicerídeos (TGs) são transferidos das VLDLs para as lipoproteínas de baixa

densidade (LDLs) e HDLs em troca de ésteres de colesterol. Então, a lipase hepática, cuja atividade também está aumentada, hidrolisa as LDLs e HDLs, produzindo lipoproteína de baixa densidade com partículas pequenas e densas (LDLpd), além de resultar em hipertrigliceridemia e diminuição da HDL2, a sub-população de HDLs com maior atividade antiaterogênica no plasma. O perfil lipídico da SM é caracterizado por hipertrigliceridemia, diminuição das HDLs e presença de LDLpd (SIQUEIRA et al., 2006)

A elevação da pressão arterial também pode ser devido a um efeito direto da hiperinsulinemia na reabsorção de sódio e na ativação do sistema nervoso simpático (SNS). Este também pode ser ativado pela presença da leptina e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) no tecido adiposo (ALANIZ et al., 2006)

O NO participa na fisiopatologia como regulador da pressão sanguínea e da função plaquetária (SYDOW et al., 2005; ASSUMPÇÃO et al., 2008). Análogos da L-arginina, como dimetilarginina assimétrica (ADMA) e monometil-L-arginina (L-NMMA), são inibidores endógenos da enzima NOS e do transporte de L-arginina, provocando o aumento da agregação de plaquetas e da pressão sanguínea (PERTICONE et al., 2005; LOSCALZO, 2001).

O ADMA, está presente em concentrações elevadas no plasma de pacientes com SM (SYDOW et al., 2005) (Figura 10).

Existe uma influência genética significativa na SM. A hipótese de *thrifty genotyp*, gene poupador, implica na seleção de genes relacionados à SM que se manifestariam em ambientes urbanos com fartura alimentar e estilo de vida sedentário (NEEL, 1962).

A presença de diabetes gestacional materna (PETTITT et al., 1993), baixo peso ao nascer (WEI et al., 2003) e determinadas práticas de alimentação na infância (PETTITT et al., 1997) contribuem para um futuro risco de SM.

1.4 Membrana plasmática e características dos carreadores de membrana

A membrana celular dos mamíferos consiste de uma dupla camada lipídica constituída principalmente de fosfolipídios, colesterol e proteínas, com importantes funções celulares, como os receptores, transportadores e enzimas, que estão imersas na camada lipídica (SPECTOR; YOREK, 1985). Os esfingolípídios são uma classe de lípidos de membrana que representam a classe dos que não formam éster. Esses lípidos de membrana possuem um grupo polar e duas caudas não polares, não apresentando glicerol, ao contrário dos glicerofosfolipídios - outra classe de lípidos de membrana. Quando ocorre a ligação de um ácido graxo à esfingosina, a molécula formada passa a denominada ceramida, cujas características estruturais assemelham-se ao diacilglicerol (DAG), constituindo a estrutura fundamental de todos os esfingolípídios (OLIVEIRA, 2007).

O estado dinâmico dos lípidios na membrana foi descrito em 1972 por Singer e Nicolson como um dos constituintes fundamentais do modelo mosaico fluido da estrutura da membrana (Figura 2).

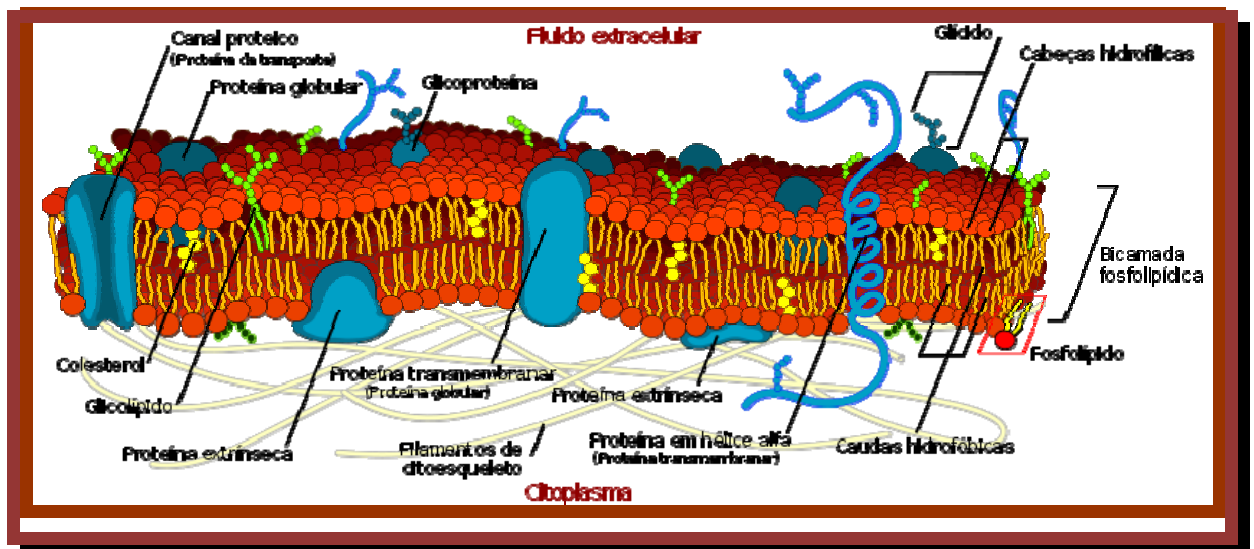


Figura 2. Membrana plasmática.

Devido ao seu interior hidrofóbico, a camada lipídica das membranas celulares atua como uma barreira para a passagem da maioria das moléculas

polares. O transporte de íons inorgânicos e de pequenas moléculas orgânicas hidrossolúveis é realizado por proteínas transmembrana especializadas, cada uma das quais é responsável pela transferência de um íon específico, ou de uma molécula específica, ou de um grupo de íons ou moléculas análogas (MATTEWS, 1993; STEIN, 1996; YEAGLE, 1998).

Em geral, quanto menor e mais lipossolúvel for a molécula (isto é, quanto mais hidrofóbica, ou não-polar) mais rapidamente se difundirá através da camada. Moléculas não-polares pequenas (ex.: O_2 e gás carbônico- CO_2) rapidamente se difundem através da bicamada lipídica. As moléculas polares sem carga também se difundem rapidamente através da dupla camada se forem suficientemente pequenas (ex.: água, etanol). Ao contrário, as membranas são altamente impermeáveis a moléculas com cargas (íons). Portanto, as membranas celulares permitem a passagem de água e de moléculas não-polares por simples difusão, enquanto moléculas polares, tais como íons, aminoácidos, açúcares e muitos metabólitos celulares, são transportadas por proteínas presentes na membrana, denominadas proteínas transportadoras de membrana (LIEB, 1982; MATTEWS, 1993; STEIN, 1996; YEAGLE, 1998).

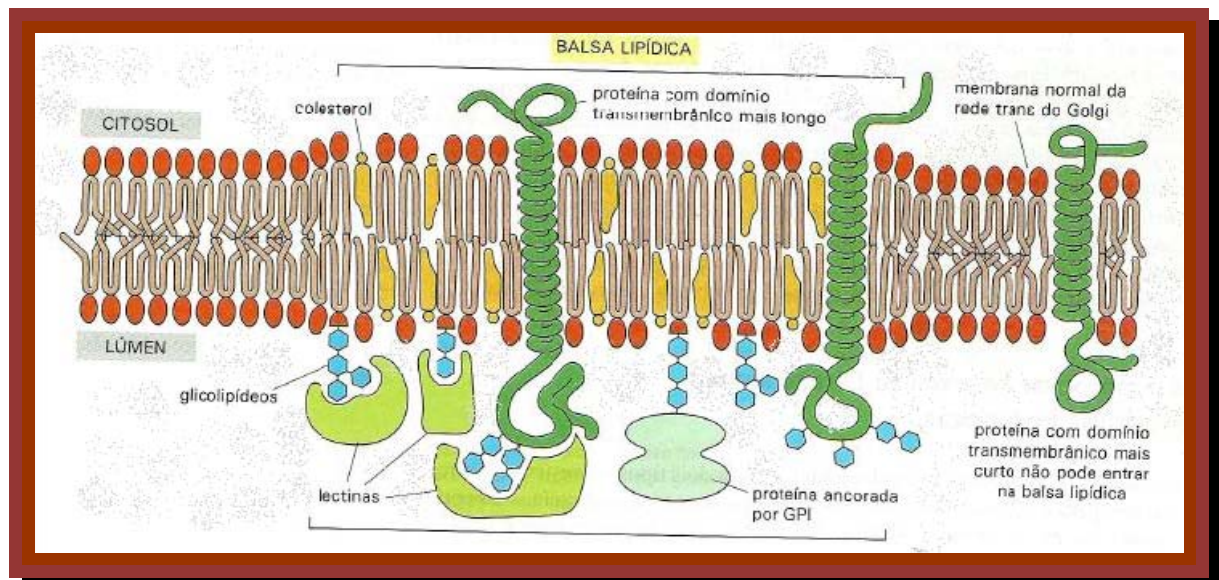


Figura 3. Balsa lipídica ou *Lipid Raft* (Alberts, Bruce, 2004).

As balsas lipídicas são pequenas áreas especializadas das membranas onde alguns lipídios e algumas proteínas (verde claro, Figura 3) se concentram, tornando este local da bicamada lipídica levemente mais espesso. As proteínas de membrana com segmentos que a atravessam e que são suficientemente longos, de modo geral, localizam-se nas balsas lipídicas e, assim, tornam-se selecionadas como vesículas de transporte. Estas balsas são subseqüentemente empacotadas em vesículas de transporte que as carregam ao domínio apical da membrana plasmática (Alberts, Bruce, 2004 p. 509 e 764).

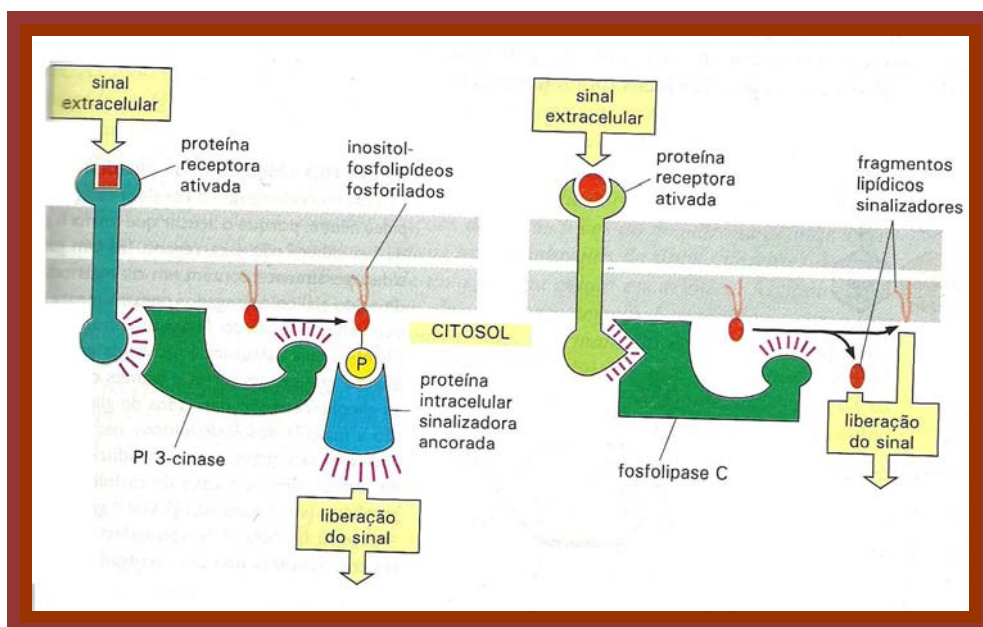


Figura 4. Fosfolipídios de membrana na sinalização celular (Alberts, Bruce, 2004).

Os sinais extracelulares podem ativar a PI3K que fosforila inositol-fosfolipídios da membrana plasmática. Então, várias moléculas intracelulares sinalizadoras se ligam a esses lipídios fosforilados e são recrutadas para a membrana, onde podem interagir e auxiliar na liberação do sinal intracelular. Outros sinais extracelulares ativam fosfolipases que clivam fosfolipídios. Os fragmentos lipídicos atuam como moléculas sinalizadoras para a liberação do sinal intracelular. Na Figura 4, observam-se os sítios onde diferentes classes de fosfolipases clivam fosfolipídios. As fosfolipases A1 e A2 clivam ligações éster, enquanto as fosfolipases C clivam ligações fosfoéster (Alberts, Bruce, 2004).

Existem duas classes principais de proteínas transportadoras na membrana: carreadoras (também chamadas de *carriers*, permeases ou transportadores) e canais. Estes últimos se caracterizam por formar poros hidrofílicos que se estendem através da bicamada, permitindo a passagem de solutos específicos (geralmente, íons inorgânicos do tamanho e da carga apropriada) a uma velocidade muito maior que o transporte mediado por proteínas carreadoras. Ao contrário, as proteínas carreadoras exigem a ligação de soluto específico a ser transportado e sofre uma série de mudanças conformacionais as quais permitem a transferência do mesmo (STEIN, 1996) (Figura 5).

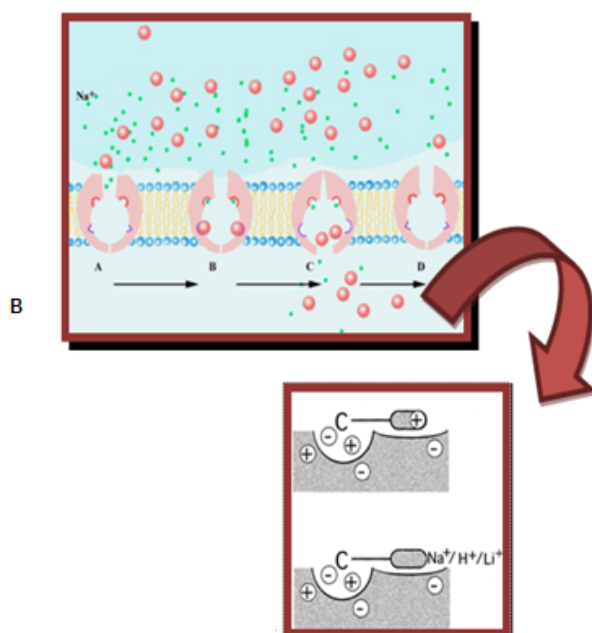
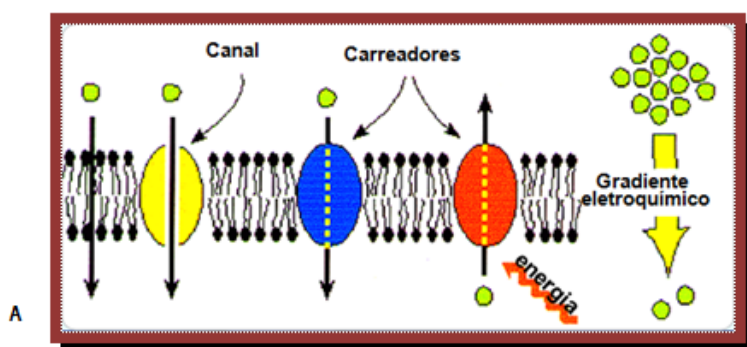


Figura 5. A-Carreador e canais; B-Transportador

O processo pelo qual uma proteína carreadora transfere uma molécula de soluto através da bicamada lipídica muito se assemelha a uma reação enzima-substrato, e os carreadores se comportam como enzimas especializadas ligadas à membrana. Cada proteína carreadora possui um ou mais sítios ligantes específicos para o seu soluto. Quando o carreador está saturado, a velocidade máxima de transporte, denominada de V_{max} , é atingida. Além disso, cada proteína carreadora tem uma afinidade específica pelo soluto, a qual é determinada pelo K_m , que é igual à concentração do soluto quando a velocidade de transporte é igual à metade da velocidade máxima. Como acontece com as enzimas, a ligação do soluto pode ser bloqueada por inibidores competitivos ou não-competitivos. Como os inibidores competitivos se ligam ao sítio no qual o soluto se ligaria, o K_m será afetado e elevadas concentrações do soluto resultam em uma V_{max} semelhante àquela observada na ausência do inibidor. Por sua vez, o inibidor não-competitivo não irá afetar o K_m porque não se liga ao mesmo sítio que o soluto a ser transportado, alterando apenas a V_{max} (STEIN, 1996; ALBERTS et al., 1997).

Algumas proteínas carreadoras transportam um único soluto de um lado da membrana para o outro e são chamadas de uniportadoras. Outras são mais complexas cineticamente e funcionam como transportadores acoplados, na qual a transferência do soluto depende da transferência simultânea ou sequencial de um segundo soluto, na mesma direção (simporte) ou na direção oposta (antiporte) (SAIER, 2000; DAHL et al., 2004) (Figura 6).

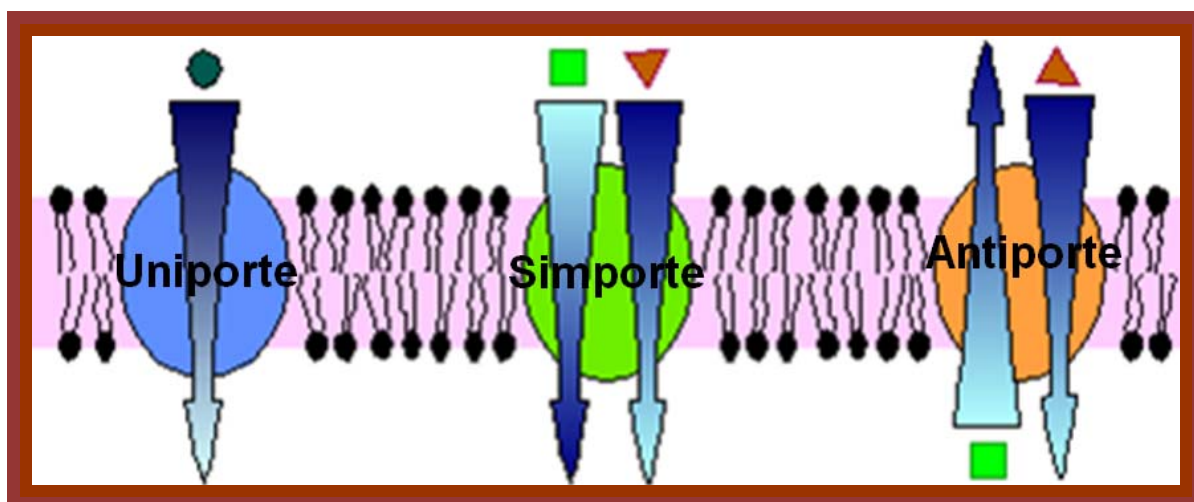


Figura 6. Uniporte, simporte e antiporte.

1.4.1 Sistema de transporte de aminoácidos catiônicos

Quatro sistemas de transporte têm sido descritos como responsáveis pelo transporte de aminoácidos catiônicos (arginina, lisina e ornitina) em mamíferos: y^+ , y^+L , $b^{0,+}$ e $B^{0,+}$ (DEVES, BOYD, 1998; IGNARRO, 2002; MANN et al., 2003).

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

O sistema y^+L , identificado por Devés e colaboradores em eritrócitos, transporta aminoácidos catiônicos na ausência de Na^+ e aminoácidos neutros na dependência de Na^+ .

Van Winkle et al. (1988) distinguiram dois sistemas de transporte de aminoácidos catiônicos: $b^{0,+}$ e $B^{0,+}$. Ambos os sistemas transportam aminoácidos neutros e catiônicos, sendo o sistema $B^{0,+}$ Na^+ -dependente e o $b^{0,+}$ Na^+ -independente (SAIER, 2000; BRUNINI et al., 2005).

Por meio de estudos cinéticos, nosso grupo demonstrou a primeira evidência de que o transporte de L-arginina em plaquetas humanas é mediado via sistema y^+L , de alta afinidade e baixa capacidade de transporte ($K_m=10 \mu M$) para aminoácidos catiônicos e neutros. A L-arginina depende das proteínas para ser transportada, pois passa pouco por difusão (MENDES RIBEIRO et al., 1999).

A atividade do sistema y^+L é expressa por duas proteínas: glicoproteína 4F2 (cadeia pesada) associada a um carreador de aminoácidos (cadeia leve), y^+LAT1 ou y^+LAT2 (Figura 7). 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).

Apesar de a atividade do transportador da L-arginina ter sido estudada em diferentes tipos de células, a expressão dos sistemas de transporte permanece pouco conhecida devido à ausência de anticorpos específicos (STEIN, 1996).

Alterações físico-químicas nas propriedades da membrana podem influenciar as funções das proteínas incorporadas a ela, alterando a atividade e a afinidade dos receptores (DUSSERRE et al., 1995). As ligações duplas *cis* dos ácidos graxos poli-insaturados, por exemplo, formam dobras e permitem que os ácidos graxos se agrupem de modo mais frouxo, tornando a membrana menos rígida. Como as proteínas embebidas na biomembrana flutuam ou afundam, dependendo da fluidez, a viscosidade da biomembrana é importante para a função da proteína contida na mesma (MURPHY, 1990).

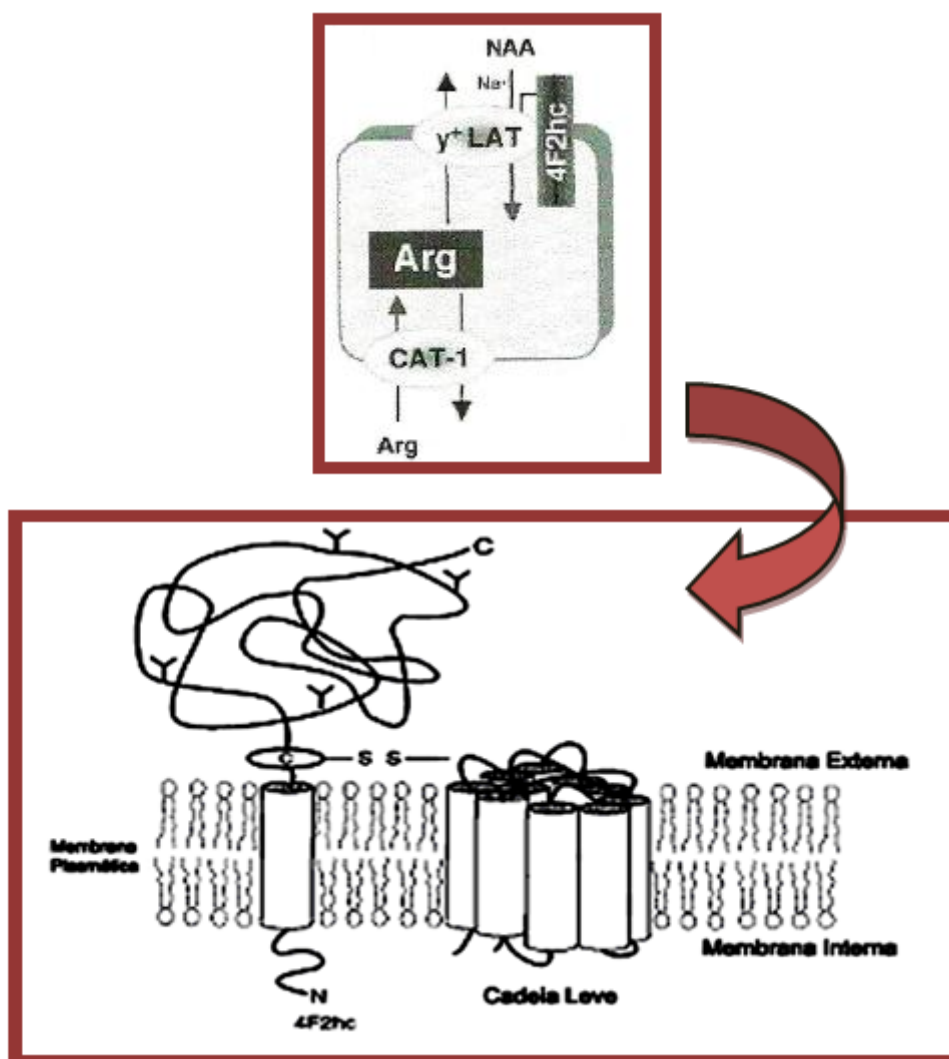


Figura 7. Modelo esquemático do sistema γ^L (Adaptado: DEVÉS, BOYD, 1998).

Trabalhos experimentais e clínicos demonstram uma anormalidade da via L-arginina-NO na insuficiência renal crônica (IRC), anorexia nervosa (AN) e hipertensão arterial sistêmica (HAS), condições associadas com elevada prevalência de doenças cardiovasculares. Estudos prévios do nosso grupo comprovaram que pacientes com HAS e com anorexia apresentam transporte de L-arginina reduzido associado a uma atividade diminuída da NOS e à concentração de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) intra-plaquetários diminuídos, sugerindo níveis reduzidos de NO biodisponível nessas situações (MORLEY et al., 1995; MOSS et al., 2004; EJERBLAD et al., 2006; DEMÉZIO DA SILVA et al., 2005; BRUNINI et al., 2007; PEREIRA et al., 2009).

1.5 A via L-arginina-óxido nítrico

O aminoácido precursor do NO, a L-arginina, é considerado semi-essencial (CLOSS et al., 2004; TONG; BARBUL, 2004). Em situações patológicas em que a sua demanda é elevada e durante a fase de crescimento, a L-arginina se torna um aminoácido essencial (MENDES RIBEIRO, 2004; BRUNINI et al., 2005). As fontes de L-arginina utilizadas pelo organismo humano são tanto endógenas como exógenas (alimentação) (CYLWIK et al., 2005). As principais fontes dietéticas de L-arginina são: soja, amêndoa, noz brasileira, castanha, pitu, carne e linguado (LORGERIL, 1997).

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., 2009). Como o fígado utiliza a maior parte da L-arginina que produz no ciclo de ureia, 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 (1-2g/dia) (Figura 8).

Além de ser substrato para a produção de óxido nítrico, a L-arginina é produto da detoxificação da amônia e participa do ciclo da síntese da agmatina, creatinina, ornitina e ureia (CLOSS et al., 2004; KOPPLE, 2003). A L-arginina também é

precursora de proteínas e está envolvida na formação de várias enzimas e na ativação da secreção em glândulas endócrinas (hipófise), cicatrização de feridas e ativação da função imune (BARBUL, 1985; WU et al., 2009).

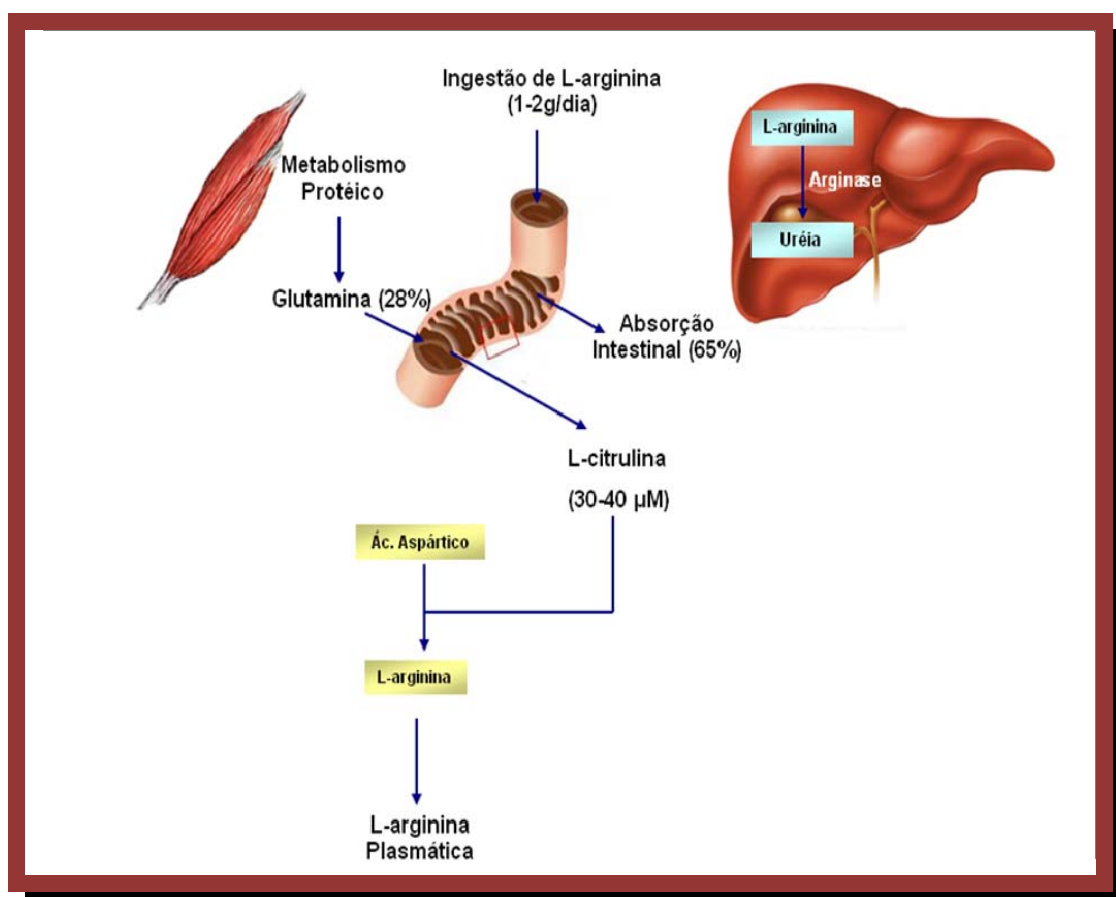


Figura 8. A síntese de L-arginina (Adaptada de REYES et al., 1994).

A L-arginina pode exercer efeitos vasculares e inibir diretamente a adesão dos leucócitos, 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), e estimula a produção de plasmina (CYLWIK et al., 2005). Como um antioxidante, a L-arginina diminui a liberação de ânions superóxido (O_2^-) e a peroxidação lipídica (WU; MEININGER, 2000).

O metabolismo deste aminoácido é regulado por diversos tipos de enzimas que são expressas em padrões e tipos celulares distintos (WU et al., 1998).

As enzimas que participam do metabolismo da arginina são as arginases, a arginina decarboxilase, a arginina: glicina amidinotransferase e a família de enzimas NOS. Como a expressão dessas enzimas varia amplamente, existe uma complexa interação entre elas, de modo que o produto de uma pode inibir a atividade da outra (CLOSS et al., 2004). Entre as outras vias metabólicas que utilizam a L-arginina como substrato a mais importante é a da hidrólise da arginina em L-ornitina e ureia por ação da arginase, que é capaz de reduzir a disponibilidade de L-arginina intracelular para a NOS, limitando a produção de NO (CHICOINE et al., 2004).

Há evidências de que as concentrações plasmáticas de arginina são marcadamente reduzidas em animais e em pacientes diabéticos provavelmente devido à diminuição da síntese endógena e catabolismo aumentado por tecidos extraintestinais (WU et al., 2009).

Furchgott e Zawadzki (1980) descobriram que a acetilcolina promovia o relaxamento dos vasos apenas se o endotélio estivesse presente e intacto. Subsequentemente foi demonstrado 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 da guanosina monofosfato cíclica (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 um radical livre (LUZ, 2005 p. 358) produzido por diferentes tipos de células, atuando na neurotransmissão, vasodilatação, atividade citotóxica do sistema imune, adesão e agregação plaquetárias (MONCADA; HIGGS, 2006). Além disso, exerce efeitos no relaxamento vascular sistêmico e na angiogênese, sendo considerado um fator antiaterogênico, antiproliferativo e antitrombótico (WU; MEININGER, 2000; HOENICKA; SCHMID, 2008).

Nos mamíferos, o NO é sintetizado a partir do aminoácido catiônico L-arginina por uma família de enzimas NOS (BRUNINI et al., 2006; CLOSS et al., 2004; MENDES RIBEIRO et al., 2001,2005; MONCADA; HIGGS, 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 O₂ e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH) (GROSS, 1997).

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) (Figura 9)

Uma vez liberado, o NO, por ser um gás, se difunde através da dupla camada lipídica da membrana plasmática e forma um complexo com a guanilato ciclase (GC), ativando-a. A GC é membro de uma família de enzimas relacionadas que compartilham domínios catalíticos semelhantes, mas que são ativadas por vias diferentes.

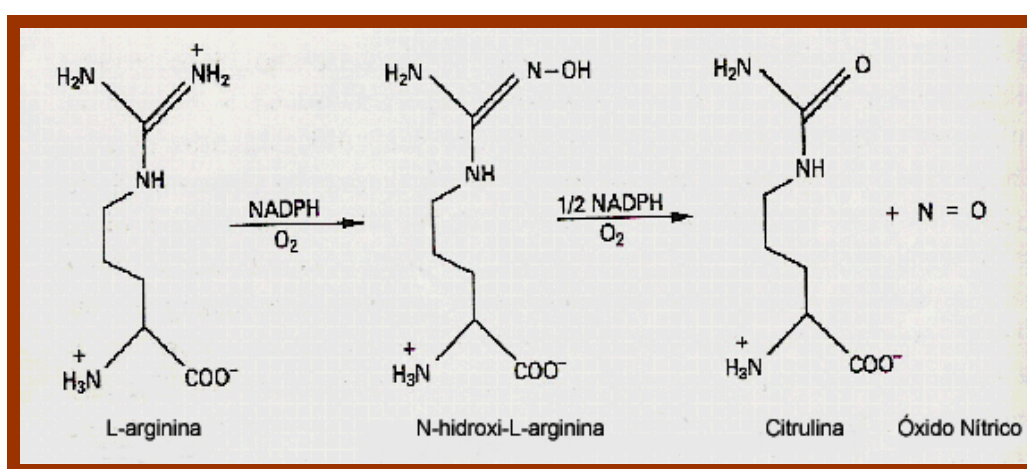


Figura 9. Síntese do NO (Adaptado: Lincoln et al., 1997).

Ela é uma proteína heterodimérica que consiste de uma subunidade alfa e uma subunidade beta. Cada subunidade consiste de um domínio N-terminal H-NOX, um domínio central de função desconhecida e um domínio C-terminal nucleotídeo ciclase (DERBYSHIRE et al., 2008) A isoforma da GC melhor caracterizada é a $\alpha 1/\beta 1$, que responde a concentrações nanomolares de NO e catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc e pirofosfato (HOFMAN et al., 2000)

Outras enzimas importantes na via efetora do NO são as fosfodiesterases (PDE). Foram isoladas em extratos de plaquetas humanas três isoformas distintas de fosfodiesterases: PDE2, PDE3 e PDE5 (Figura 10).

Nas plaquetas humanas, a PDE5 e a PDE3 são as principais isoformas que hidrolisam GMPc e adenosina monofosfato (AMPc), respectivamente. Tem sido descrito na literatura um efeito antiagregante plaquetário dos inibidores da PDE5,

sugerindo-se que esses compostos possam ser utilizados como agentes antitrombóticos (LEWIS et al., 2006).

Nas plaquetas humanas, o NO gera um pico de GMPc que cai quase que imediatamente (3 a 5 segundos), retornando aos níveis basais em menos de um minuto (MULLERSHAUSEN et al., 2004). Essa rápida redução nas concentrações de GMPc seria devido à estimulação direta da PDE5 pelo próprio GMPc ou pela fosforilação pela proteína quinase G (PKG) (MULLERSHAUSEN et al., 2004).

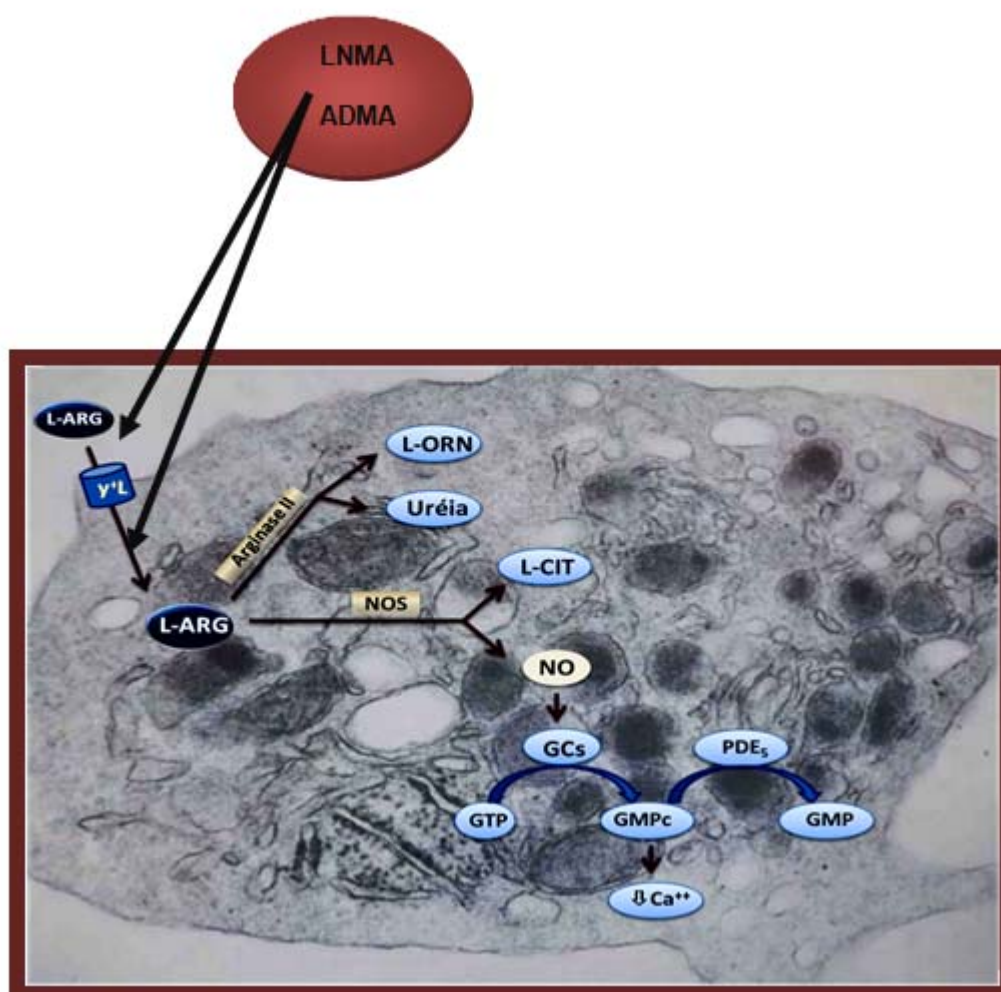


Figura 10. A via L-arginina-óxido nítrico (Adaptado: MACALLISTER ; VALLANCE, 1998). NOS-óxido nítrico sintase; GC-guanilato ciclase; GTP-guanosina trifosfato; GMPc- guanósina monofosfato cíclica; PDEs-fosfodiesterase; Y+L-transportador de L-arginina; L-OR-ornitina

Existem múltiplas vias utilizadas pelo NO para promover suas ações, que dependem do meio e da quantidade de NO produzido. Os efeitos relacionados à baixa concentração de NO, equivale a menos do que 1 μM dessa molécula e os

relacionados à elevada concentração de NO se referem a mais do que 1 μM (VANNI et al., 2007) (Figura 11).

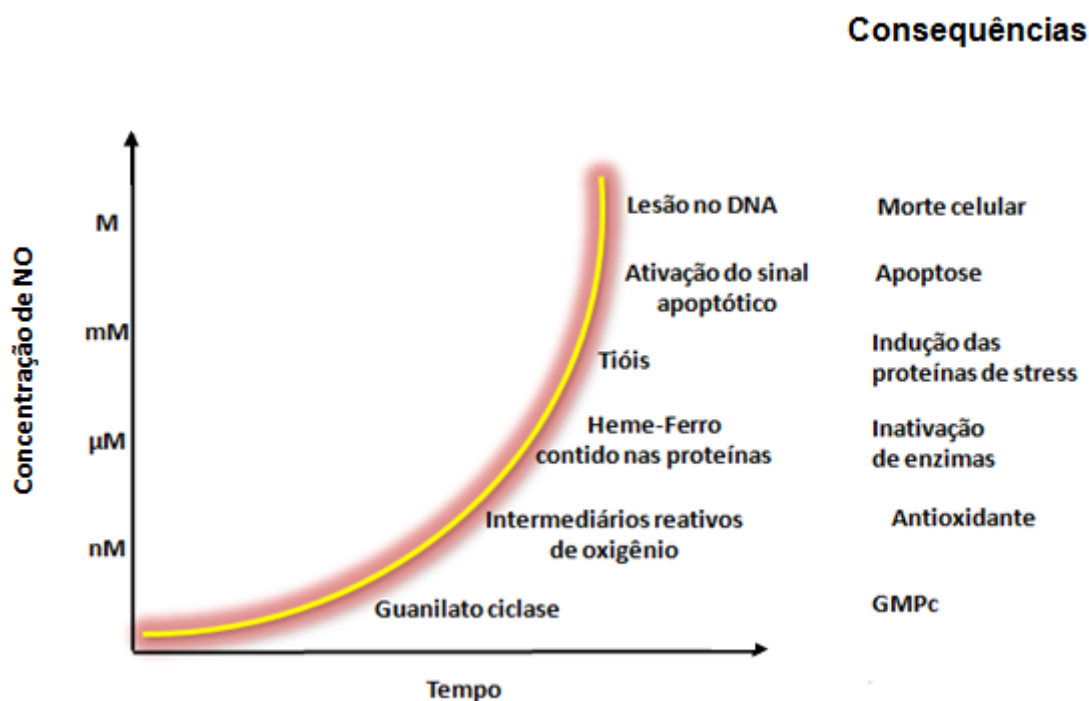


Figura 11. Vias utilizadas pelo NO de acordo com sua concentração.

Em condições fisiológicas, baixos níveis de NO produzidos pelas nNOS e eNOS irão ativar GC levando à produção de GMPC, que está associada a uma série de processos fisiológicos como, por exemplo: relaxamento do músculo liso do vaso endotélio-dependente e inibição da agregação e adesão plaquetárias. 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, 1997; Moncada; Higgs, 2006).

O NO atua também como neurotransmissor no sistema nervoso, estando associado aos processos de aprendizado, memória, sono, dor e, provavelmente, depressão (TSIKAS et al., 1999; PINTO et al., 2008).

No sistema imunológico, o óxido nítrico participa de vários aspectos da resposta inflamatória, além de atuar no endotélio, promovendo dilatação vascular, um dos sinais cardinais da inflamação. O NO interfere na atuação dos leucócitos na

inflamação e promove a modulação da expressão de P-selectina (proteína de adesão) produzida no endotélio, reduzindo assim a adesão de leucócitos à parede vascular, bem como promovendo a diminuição da agregação de neutrófilos e de sua secreção. Nos macrófagos, o NO inibe a produção de uma variedade de citocinas imunomoduladoras e regula a ação das mesmas sobre as células-alvo (MORREL et al., 2005).

Existem três isoformas de NOS descritas como: tipo I ou neuronal (nNOS), tipo II ou induzível (iNOS) e tipo III ou endotelial (eNOS) (DUDZINSKI et al., 2006) (Quadro 4). São produtos de três genes designados como NOS1, NOS2 e NOS3 com diferentes localização, regulação, propriedade catalítica, sensibilidade a inibidores e com 51-57% de homologia entre as isoformas humanas. O gene da NOS tipo 3 humano é altamente polimórfico. A variante Asp298 da NOS 3 tem sido investigado como locus candidato na pré-eclâmpsia, na doença isquêmica cardíaca no infarto do miocárdio recente e nos portadores de ateroma de carótida (LUZ,2005 p. 20,43,177,178).

Apesar de ser bem estabelecido o papel das três isoformas da enzima NOS, evidências têm demonstrado a produção de NO na membrana mitocondrial de diversos tipos celulares como fígado e coração (GHAFOURIFAR et al., 1997; KANAI et al., 2001). Esta enzima tem sido denominada 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 cálcio (TATOYAN et al., 1998; ELFERING et al., 2002, VALDEZ et al,2006).

	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	Constitutiva Estimulada por hormônios sexuais, lesão do tecido nervoso e hipóxia Inibida por citocinas e endotoxina	Preferencialmente induzível Expressão induzida por citocinas e endotoxina	Constitutiva Estimulada por hormônios sexuais e stress de cisalhamento Inibida por citocinas e endotoxina e hipóxia

Quadro 4. Características principais das três isoformas das NOS (adaptado de LINCOLN et al., 1997).

As isoformas nNOS e eNOS são constitutivas e suas atividades reguladas pelo cálcio (Ca^{++}) intracelular, fosforilação e pela calmodulina, uma proteína associada ao Ca^{++} . Tanto a eNOS quanto a nNOS possuem uma alça que desestabiliza a ligação com a calmodulina em níveis baixos de cálcio, 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 cálcio no interior da célula (FLEMING et al., 1999). Em contraste, a isoforma iNOS é Ca^{++} e calmodulina-independentes, ou seja se liga fortemente à calmodulina sem

dependência do cálcio, podendo ser induzida por citocinas e endotoxina, e com grande quantidade de NO por longos períodos de tempo (GROSS, 1997).

A iNOS tem sido demonstrada em situações patológicas ligada à ativação de citocinas e endotoxinas em uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas dos vasos e células endoteliais. A sua expressão também inclui os cardiomiócitos e plaquetas (LUZ, 2005, p.335). A eNOS é expressa nas células endoteliais e plaquetas, nas células endocárdicas, nos cardiomiócitos, e plaquetas. Tem distribuição subcelular, portanto com o perfil ideal para apresentar-se como um sensor de O_2 em nível molecular (LUZ, 2005, p.13).

Apesar de compartilharem uma série de características cinéticas, a ligação da NOS com seus cofatores parece ser fundamental para a atividade máxima dessas enzimas, sendo que destes, a calmodulina parece ser um fator-chave na regulação da enzima através dos níveis de Ca^{++} . Essas isoformas de NOS exibem uma estrutura de bidomínio com locais de reconhecimento para NAPH, doador de elétrons que são transportados até o grupo heme, via flavoproteína e calmodulina. A presença do co-fator tetrahydrobiopterina (BH_4), uma coenzima que participa das hidroxilases dos aminoácidos aromáticos e é essencial para a ativação da NOS (Figura 12). O resíduo N terminal liga a tetrahydrobiopterina e heme cuja ligação parece ser fundamental para a atividade da enzima. A L-arginina liga-se ao sítio ativo da enzima em uma porção próxima ao heme. O domínio C terminal liga os cofatores NADPH, FAD (dinucleotídeo adenina-flavina) e FMN (mononucleotídeo flavina). Os domínios NH2 e COOH são unidos por uma pequena seqüência que liga a calmodulina, um co-fator essencial para a atividade da NOS (STEUHR, 1997).

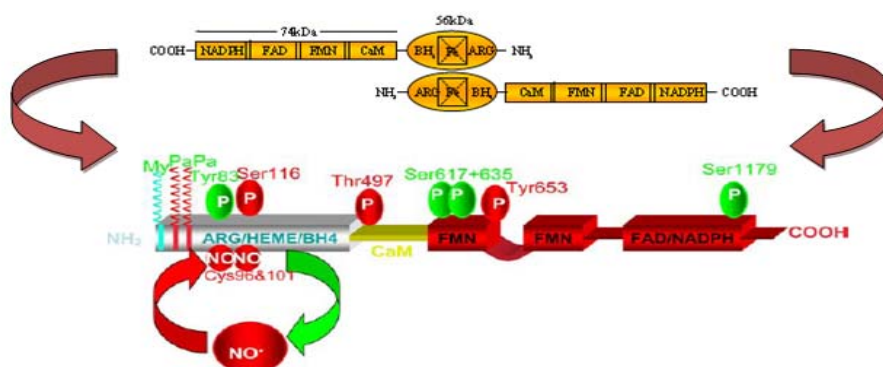


Figura 12. Estrutura da NOS, mostrando o acoplamento entre as duas subunidades para formar o dímero ativo (MICHEL; VANHOUTTE, 2010).

A eNOS pode se tornar desacoplada pela ausência de seu substrato ou do co-fator BH₄. Neste estado desacoplado, os elétrons que normalmente seguiriam do domínio redutase de uma subunidade para o domínio oxidase da outra subunidade são desviados para o oxigênio molecular, ao invés de irem para a L-arginina, resultando na produção de superóxido (VERGANI et al., 2000). O radical heme da NOS ativa o O₂ molecular que pode produzir ERO (STUEHR, 2004) (Figura 13).

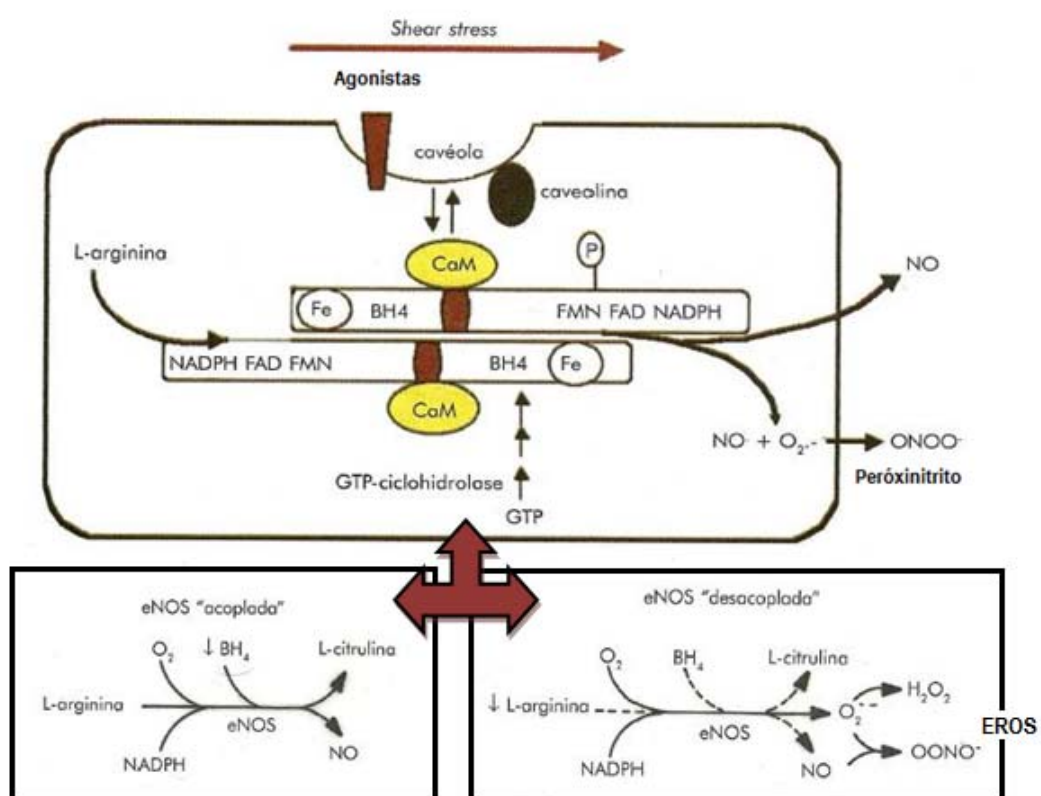


Figura 13. Acoplamento e desacoplamento da eNOS.

O tráfego da eNOS para a cavéola é dependente de resíduos de ácidos graxos. O enriquecimento da eNOS com uma molécula de miristato, adicionada durante a translação, e duas de palmitato, adicionadas após a translação, ancoram a eNOS na cavéola, microdomínios da membrana plasmática ricos em colesterol, (Figura 14) em aparente interação física com o domínio de suporte da caveolina-1, que tem ação inibitória sobre a eNOS.

As cavéolas são invaginações na membrana celular e são responsáveis pelo transporte celular nas células endoteliais (MINSHALL et al., 2003).

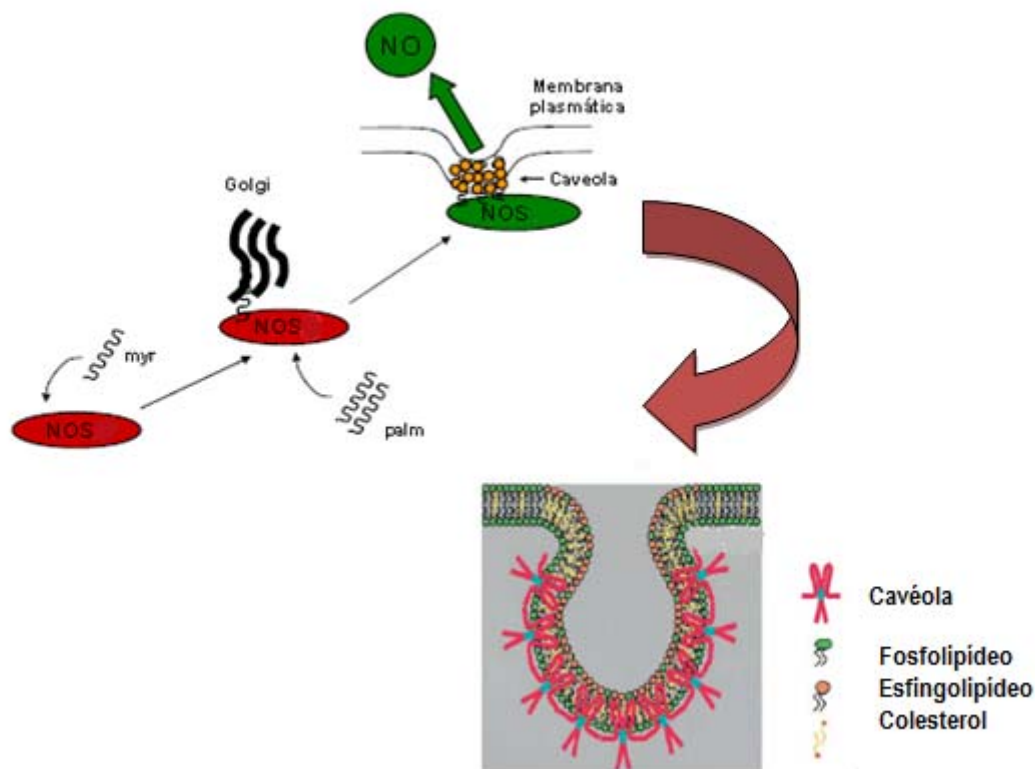


Figura 14. Condução da eNOS à cavéola. (GONZÁLEZ, 2006)

A miristilação dirige a proteína ao aparelho de Golgi onde sofre adição dos restos de palmitato que favorece sua associação à cavéola, microdomínios da membrana plasmática ricos em colesterol.

Devido à composição lipídica da cavéola, os esfingolípideos se encontram na face extracelular do microdomínio da membrana, os fosfolípideos está na face citoplasmática e o colesterol pode estar em ambas as faces da bicamada. É possível propor que a conhecida associação entre hipercolesterolemia e disfunção do relaxamento vascular dependente do endotélio possa envolver uma alteração da fisiologia desta estrutura. A exposição de células ao colesterol *per si* aumenta o número de cavéolas, bem como a expressão da eNOS e a sua associação com as cavéolas e a produção de NO. Por outro lado, a exposição ao estresse oxidativo ou às lipoproteínas oxidadas leva à redução do número de cavéolas, além da

associação da eNOS com as mesmas, levando a uma menor produção de NO (LUZ, 2005, p. 46).

A associação da eNOS com uma região da membrana plasmática na qual estão concentradas várias chaves dos complexos de transdução de sinal tem profunda repercussão na atividade enzimática bem como na sua acessibilidade aos processos intracelulares de via de liberação do NO (LUZ, 2005, p 331, 332).

A caveolina-1 (Figura 15) é uma proteína que está inserida na superfície citoplasmática da membrana que regula a internalização caveolar. No endotélio, a caveolina-1 regula a via do NO ao se unir à eNOS, mantendo-a inativa (BUCCI et al, 2000). Esta conformação inibitória da eNOS, é atenuada e revertida mediante a elevação da concentração de cálcio/calmodulina e/ou da fosforilação via AKT quinase. Assim, a combinação da perda da interação com a caveolina 1 e o efeito direto da calmodulina/cálcio induzem a atividade enzimática da eNOS. A calmodulina participa da etapa inicial na ativação da eNOS, deslocando a proteína inibitória caveolina-1, que é a principal constituinte dos cavéolos, ligando-se à eNOS na forma inibitória. A caveolina-1 também participa das vias de sinalização do cálcio nas células endoteliais (FUJIMOTO, 1993).

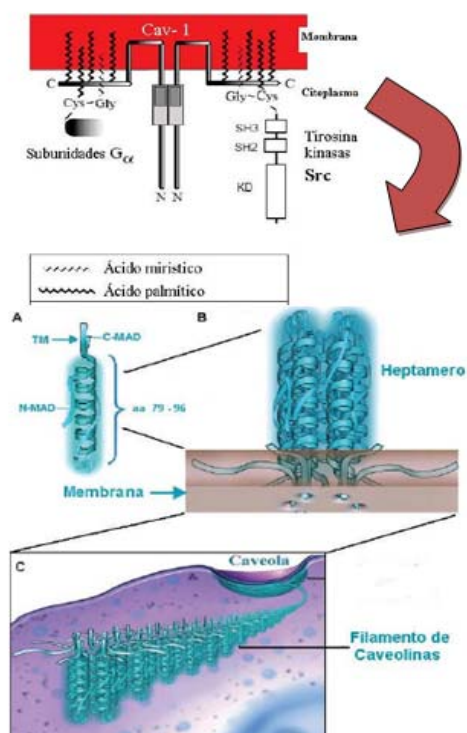


Figura 15. Caveolina.(ALATORRE, 2004)

Os domínios ou sítios de ligação da caveolina fazem da eNOS uma proteína com estrutura quaternária, onde o NADPH exerce importante função (LUZ, 2005, p 331). As caveolinas desempenham também um papel, incluindo o transporte vesicular, a homeostase do colesterol e transdução de sinal. Dentro deste quadro, caveolinas atuam como proteínas para regular a atividade de inúmeras moléculas de sinalização. Em particular, caveolina-1 tem uma interação com proteínas inibidoras, tais como eNOS e da proteína quinase A (PKA), também ativa certas moléculas, em particular, o receptor de insulina (COHEN et al., 1999).

A expressão da caveolina é marcadamente elevada em condições de hipercolesterolemia. Este acúmulo de colesterol em células vasculares tem efeito depletor na função da membrana, incluindo o transporte iônico e a transdução de sinais nas células endoteliais, podendo interferir com o transporte de L-arginina. Como resultado, a ativação da eNOS provoca a produção de superóxido, modulando as propriedades físico-químicas dos lipídeos de membrana e também altera a função de outras proteínas de transporte e o fechamento do canal de K^+ , ativado pelo cálcio, resultando em um estresse estrutural e enegético do canal (MASON, JACOB, 2003).

O inositol trifosfato (IP_3), juntamente com o diacilglicerol (DAG), é um mensageiro secundário envolvido na transdução de sinal em células biológicas. É formado por hidrólise de fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), um fosfolípido que está localizado na membrana plasmática, e pela fosfolipase C. A sua principal função consiste na mobilização de Ca^{++} a partir de organelas onde este está armazenado e na regulação da proliferação celular, entre outras reações celulares (Figura 16). Em células da musculatura lisa, o IP_3 liga-se e ativa o receptor de IP_3 existente na membrana do retículo sarcoplasmático, fazendo abrir canais de cálcio, resultando na libertação de Ca^{++} para o citoplasma (SOMLYO AP; SOMLYO AV, 1994).

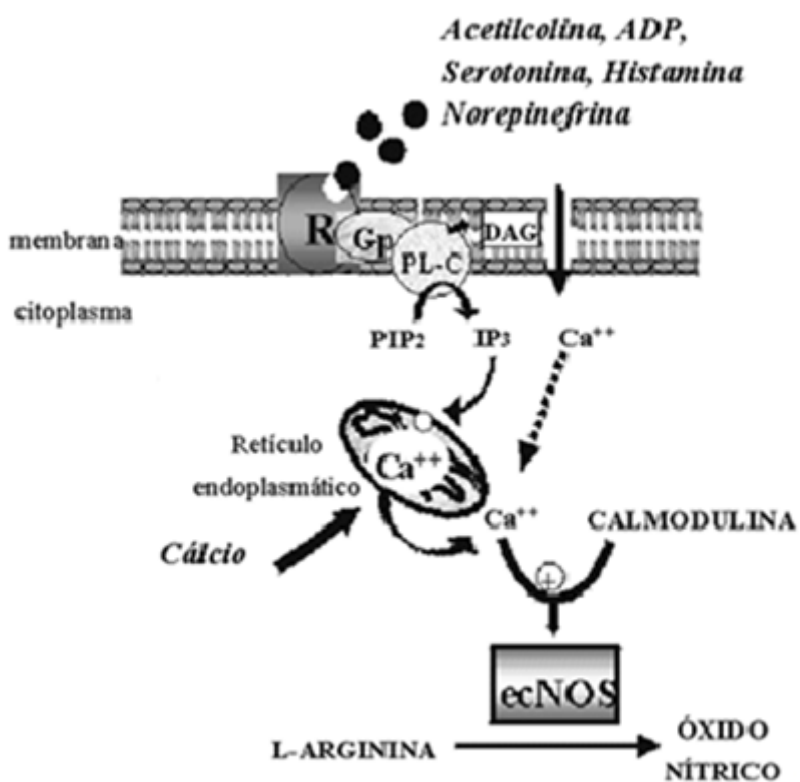


Figura 16. Via DAG-IP₃.

Na via de fosforilação da eNOS, observamos que, após a ligação dos agonistas a seus receptores acoplados à proteína G, ocorre ativação da fosfolipase C para produzir DAG e IP₃. O IP₃ aumenta a concentração intracelular de cálcio, favorecendo a interação Ca⁺⁺-calmodulina, resultando assim na estimulação da NOS (Figura 17).

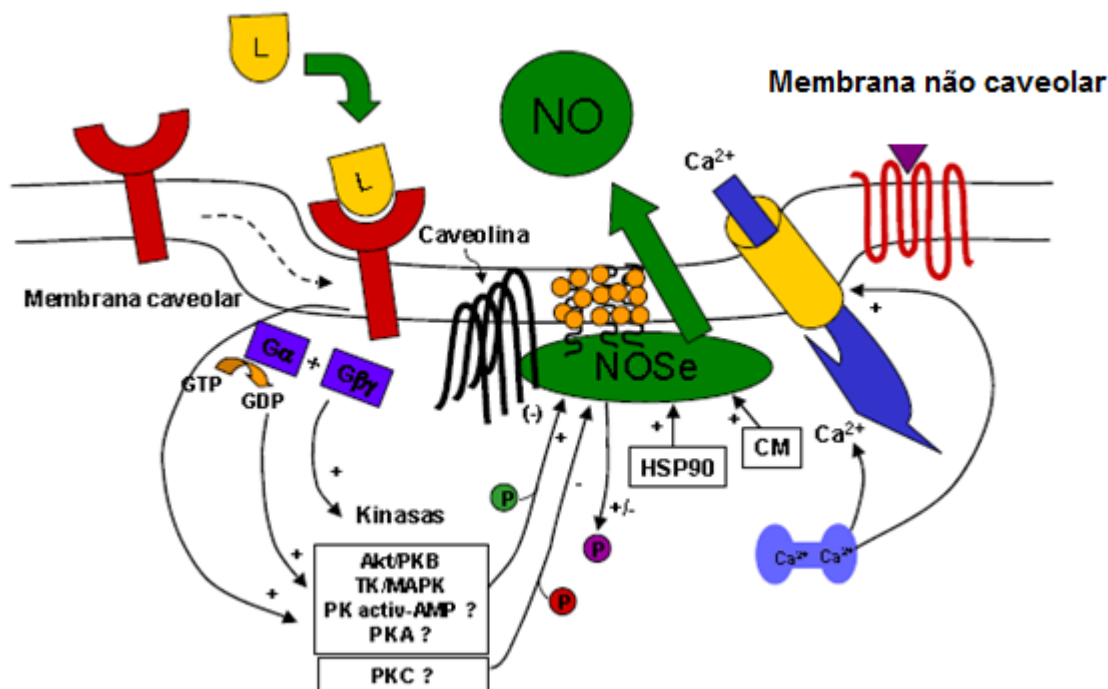


Figura 17. Visão geral da eNOS (GONZÁLEZ, 2006). O ligante (L) se une aos receptores da membrana plasmática. A ativação dos receptores conduz a estimulação de múltiplas vias mediadas por proteínas quinases. A fosforilação provoca a estimulação (+) da eNOS ou sua inibição (-). A defosforilação pode ser também ser estimuladora ou inibidora. O cálcio provém de depósitos intracelulares que estão próximos à membrana caveolar ou de fluxo do exterior. A união da proteína do choque térmico (HSP90) estimula a eNOS, mas sua união à caveolina a inibe.

Os pacientes com fibrilação atrial (FA), uma condição associada à trombose intracardíaca aumentada e ao embolismo cerebral, têm níveis plasmáticos diminuídos de nitrito e nitrato, como também de GMPc plaquetário, o que sugere possível reduzida biodisponibilidade de NO ou condições de fluxo turbulento, que leva à diminuição da atividade da NOS, provavelmente devido à injúria do endotélio (BREDT; SNYDER, 1994.)

1.5.1 Paradoxo da via L-arginina-NO

Estudos mostram que os níveis intracelulares de L-arginina variam entre 0,1 e 2 mM (XU et al., 2001; MCDONALD et al., 1997; BOGLE et al., 1996), portanto, extremamente superiores às constantes de afinidade (K_m) das diferentes isoformas de NOS, que variam entre 1 e 32 μ M (PALMER et al., 1988; BOGLE et al., 1996).

Embora os níveis intracelulares normais de L-arginina sejam bem acima do K_m e suficientes para a síntese de NO, a produção mesmo 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).

Várias teorias foram propostas para tentar explicar este paradoxo. Uma possibilidade seria que a atividade da NOS e a produção de NO estariam ligadas ao transporte de L-arginina e não às concentrações intracelulares deste aminoácido. Crescente evidência vem mostrando a co-localização da eNOS e do transportador catiônico de L-arginina CAT1 nos cavéolos (SHAUL et al., 2003; MANN et al., 2003; MCDONALD, 1997).

Para responder a este paradoxo, Closs et al. (2000) propuseram que células endoteliais e macrófagos possuiriam dois reservatórios intracelulares de L-arginina, sendo que um deles teria a capacidade de troca com o meio extracelular e o outro não. Assim, o segundo reservatório seria inacessível à NOS em macrófagos, sendo fundamental o transporte de L-arginina para a produção de NO.

Com relação ainda ao "paradoxo da via L-arginina-NO", além da co-localização do CAT-1 e da eNOS na cavéola da membrana, e da compartimentalização intracelular da arginina, alterações nos níveis plasmáticos de insulina, dimerização da NOS e inibição competitiva da eNOS por inibidores, por exemplo, ADMA e L-NMMA, poderiam interferir no transporte (SHAUL et al., 2003; MANN et al., 2003).

1.6 Caracterização da via L-arginina-NO em plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados de aspecto granular, presentes no sangue e produzidos na medula óssea a partir dos megacariócitos. Elas possuem uma estrutura discóide (HARTWIG, 2002; ANDREWS et al., 2004) e sua estrutura interna é dividida em quatro zonas (CASTRO et al., 2006) (Figura 18):

- A) Zona periférica – inclui as membranas externa e interna (trilaminar) e estruturas estreitamente associadas ao sistema de canais conectados à superfície, denominado sistema canicular aberto, que é o responsável pela troca de moléculas com o meio externo, com a liberação de diversas moléculas após a ativação das plaquetas (secreção plaquetária). A liberação do conteúdo dos grânulos ocorre sem lise celular e com manutenção da integridade da membrana, apesar de haver mudanças nas suas características. Os fosfolipídios de membrana são importantes para a coagulação, pois proporcionam à superfície sobre a qual agem e/ou serão ativados alguns de seus fatores. Esses fosfolipídios funcionam como substrato para produção de ácido araquidônico (AA) e, conseqüentemente, de tromboxano A_2 (TXA₂), um potente agonista da agregação plaquetária e da vasoconstrição.
- B) Zona sol-gel – encontra-se abaixo da zona periférica e contém o citoesqueleto, que fornece a sustentação para a forma discóide da plaqueta, e o sistema contrátil, que, sob ativação, permite a mudança da forma discóide, o prolongamento de pseudópodos, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares.
- C) Zona de organelas – contém: a) os grânulos alfa, com as proteínas adesivas, fator de von Willebrand (FvW), trombospondina, vitronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator IV plaquetário, fatores da coagulação (ex: fator XI) e inibidor do ativador plasminogênio; e b) grânulos densos, que contêm trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina, cálcio; e c) componentes celulares, como lisossomos e mitocôndria.
- D) Sistema membranar – inclui o sistema tubular denso, com o cálcio, importante para desencadear os eventos contráteis, e os sistemas enzimáticos envolvidos na produção de síntese de prostaglandinas.

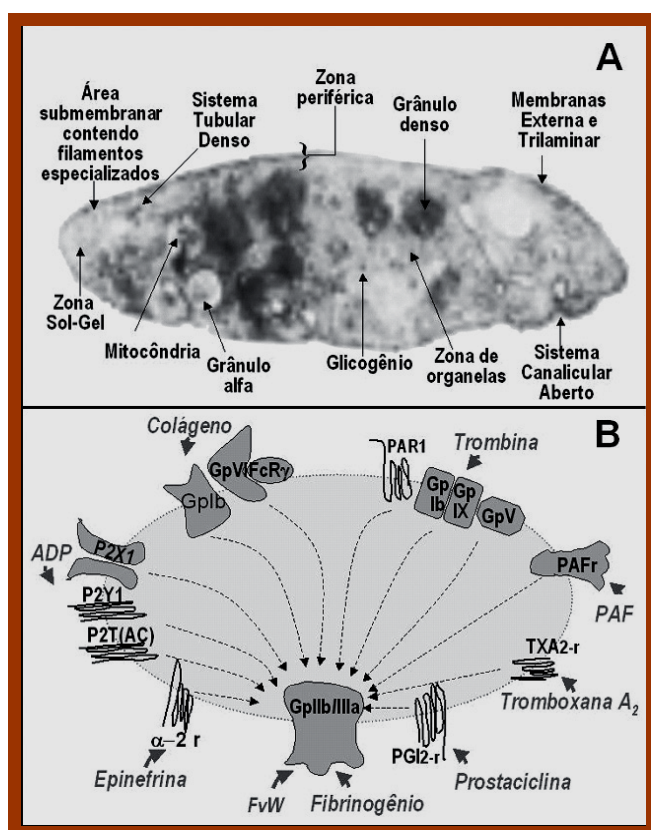


Figura 18. A plaqueta. A: componentes e organização; B: receptores (preto) e agonistas (cinza) (HARTWIG, 2002; ANDREWS et al., 2004).

A ativação das plaquetas é induzida pela interação de vários agonistas com receptores expressos na membrana plaquetária, ADP e trombina respectivamente. O TXA₂ é sintetizado por plaquetas ativadas pelo ácido araquidônico (AA) através da via da ciclo-oxigenase (COX) (Figura 19, Painel A).

Uma vez formado o TXA₂ se difunde através da membrana e ativa outras plaquetas. Nas plaquetas, há duas variantes de receptor para o TXA₂: TP alfa e TP beta, que diferem em sua cauda citoplasmática. Ambos acoplam a proteína G que ativa a fosfolipase C. Estas enzimas degradam fosfoinositóis da membrana, liberando IP₃ e DAG. O DAG ativa a proteína intracelular quinase C (PKC) a qual causa fosforilação de proteínas. A liberação de IP₃ aumenta os níveis citosólicos de cálcio (Figura 16 e Figura 19, Painel A), que são liberados do retículo endoplasmático. O ADP é liberado pelas plaquetas, que expressam no mínimo dois receptores para o ADP: P2Y₁ e P2Y₂, acoplados à proteína G_q e G_i, respectivamente (Figura 19, Painel B).

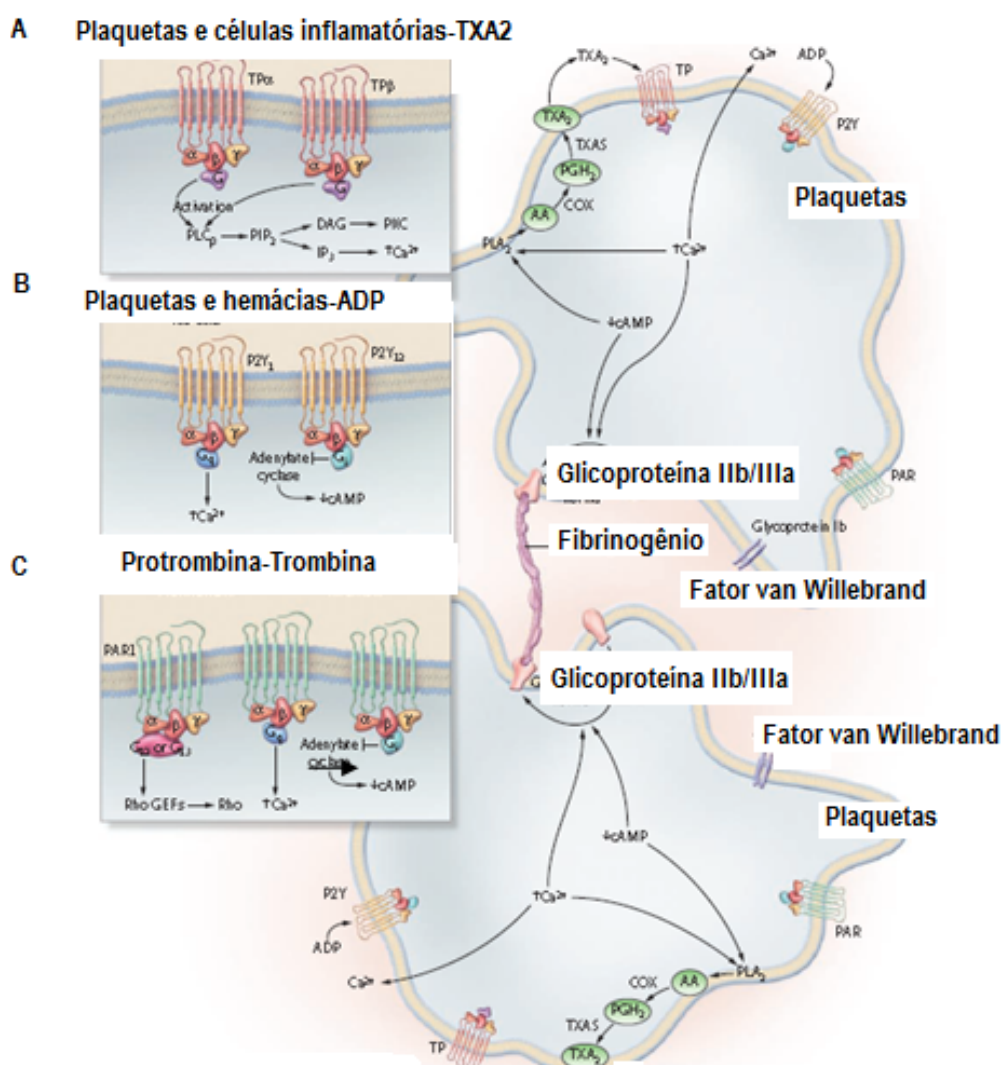


Figura 19. Agonistas, Receptores e Sistemas Efetores na Ativação Plaquetária (Adaptado de Davi; Patrono, 2007).

No painel C da Figura 19, a trombina é rapidamente gerada no local da injúria vascular, a partir da protrombina. A resposta à trombina é mediada pela proteína G ligada aos receptores ativados de protease (PARs).

O NO das plaquetas está envolvido no controle da agregabilidade via síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato cíclica e ativação da proteína quinase GMPc-dependente, o que leva à inibição de agonistas agregantes, incluindo TXA₂. A produção de TXA₂ por plaquetas aumenta em pacientes com hipercolesterolemia e a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-ox) reduz a resposta da GCs a nitrovasodilatadores. A LDL-ox leva a um comprometimento no transporte de cálcio e

isso pode resultar em ativação de fosfolípidos e, como consequência, reforçar a formação de ácido araquidônico. Um aumento da concentração de peróxidos lipídicos pode ocasionar mudança na síntese de prostaglandinas a partir da prostaciclina para tromboxano, causando aumento da agregabilidade plaquetária. É possível que pacientes com doença arterial coronariana (DAC) apresentem elevados LDL-ox sem hipercolesterolemia de LDL no plasma. Há também evidências de que LDL-ox estimula a função das plaquetas, principalmente, pela diminuição da expressão NOS. Este efeito da LDL-ox pode ser bloqueado pela HDL, que tem potencial para limitar a modificação oxidativa da LDL (TRETJAKOVŠ et al., 2000).

A ativação de plaquetas provoca um desequilíbrio nos fosfolípidos da membrana plasmática por um defluxo específico de aminofosfolípidos, resultando na formação de filopodia (pseudópodes). Da mesma forma, a adição de um excesso de fosfolípidos na camada externa da membrana plasmática celular induz extensões pela polimerização de actina. A função das bolsas lipídicas como plataformas de sinalização em resposta a uma pressão mecânica induzida pela adição de fosfolípidos no folheto externo da membrana plasmática de plaquetas em repouso foi cogitada. Existiu evidência de que bolsas lipídicas são cruciais para manter a restrição mecânica e atuam como estruturas dinâmicas envolvidos na reorganização do citoesqueleto e na formação de extensões da membrana plasmática (ROMAIN et al., 2010).

Como já exposto, a ativação plaquetária pode ser influenciada pela composição da membrana plasmática. Os efeitos da administração oral de fosfatidilcolina poli-insaturada (PPC), nos lipídios plasmáticos, lipoproteínas e função plaquetária foram avaliados no estudo de GALLI et al. 2005. Não foi evidenciada modificação nos níveis do colesterol total e triglicerídeos, mas o nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) aumentou após seis semanas de uso da PPC. A maior alteração ocorreu na composição da membrana plaquetária, onde as razões entre lipídio total/proteína total e colesterol/proteína foram diminuídas significativamente, enquanto houve aumento das faixas de fosfolípidio/lipídio total e dos conteúdos do ácido linoléico na membrana. Após o tratamento, houve redução do colesterol total e do LDL, portanto o PPC parece ser capaz de modular as trocas lipídicas entre a membrana celular e o compartimento plasmático. (TRETJAKOVŠ et al., 2000).

O processo de aterogênese refere-se à aderência de plaquetas e agregação à superfície luminal, com a subsequente liberação de fatores de crescimento derivados de plaquetas e substâncias vasoativas. Uma interação maior da parede do vaso com as plaquetas desempenha um papel importante na maioria das formas de doenças cardiovasculares.

A composição de proteína das balsas lipídicas pode ser diferente entre as plaquetas em repouso e ativadas e os fosfolipídios em excesso pode desencadear um recrutamento específico de proteínas das frações da bolsa lipídicas. A fosforilação em tirosina pode induzir um aumento da afinidade entre *rafts* ou balsas lipídicas transitórias e permanentes e as proteínas (ROMAIN et al., 2010).

A inativação das plaquetas é essencial para prevenir o processo de formação inespecífico de trombo denominado trombose. O papel do NO e da prostaciclina no processo de regulação da função plaquetária está bem estabelecido, e sua interação com o endotélio é descrita na literatura como essencial (RADMOSKI et al., 1987; CASTRO et al., 2006).

O NO limita a adesão e a agregação plaquetárias, bem como desagrega plaquetas previamente agregadas. A L-arginina inibe a agregação plaquetária tanto *in vivo* como *in vitro*, enquanto que o seu análogo L-NMMA aumenta a ativação plaquetária (MENDES RIBEIRO et al., 2004; BRUNINI et al., 2005).

As plaquetas expressam ambas as isoformas de NOS, endotelial e induzível (CHEN et al., 1998; MENDES RIBEIRO et al., 2001; MOSS et al., 2004; DEMÉZIO DEMÉZIO DA SILVA et al., 2005). A via L-arginina-óxido nítrico foi demonstrada em plaquetas pela primeira vez por Radomski et al. (1990), envolvendo a isoforma da NOS cálcio-dependente, eNOS. Posteriormente, Mehta et al. (1995) foram capazes de demonstrar a presença da isoforma iNOS através da incubação das plaquetas com citocinas. Na ausência de cálcio, a L-arginina foi convertida a citrulina e NO, indicando a presença da iNOS, isoforma da NOS cálcio-independente.

Apesar de a atividade de transporte da L-arginina pelo sistema y^+L ter sido investigada em diferentes tipos de células, a sua modulação permanece pouco estudada em nível de atividade e expressão (STEIN, 1996) Recentemente, nosso grupo evidenciou que a atividade do sistema y^+L é regulada por concentrações intracelulares de aminoácido e Na^+ , trombina e mudanças no potencial de superfície (SIQUEIRA et al., 2007).

Os vários mecanismos dependentes do GMPc exercidos pelo NO sobre as plaquetas são (VANNI et al., 2007) (Figura 20):

- Redução do nível de Ca^{++} citoplasmático;
- Bloqueio do receptor de TXA_2 ;
- Modulação da expressão de P-selectina;
- Modulação da ligação de fibrinogênio via receptor GPIIb/ IIIa.

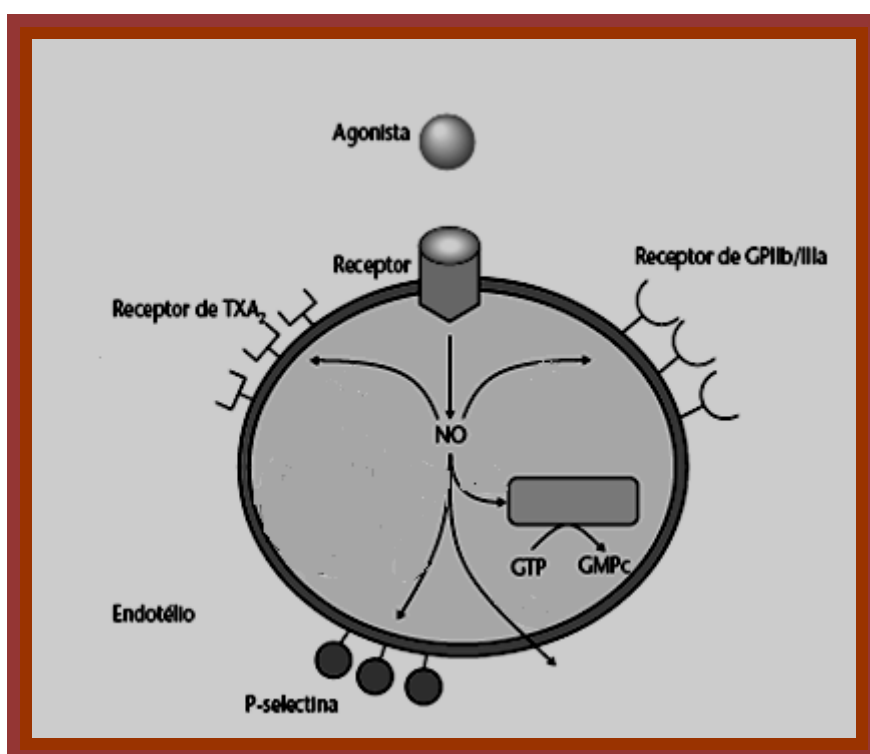


Figura 20. Efeitos do NO na inibição plaquetária via GMPc (JIN et al., 2005).

A redução do nível de Ca^{++} intracelular ocorre pela inibição de liberação de Ca^{++} via receptor do sistema tubular denso, do aumento da taxa de extrusão de Ca^{++} e da redução de entrada de Ca^{++} do meio extracelular. Além disso, o NO aumenta a atividade da Ca^{++} -adenina trifosfatase (ATPase) do retículo sarcoplasmático, que resulta em menores níveis de Ca^{++} disponíveis para os mecanismos de ativação e agregação (VANNI et al., 2007).

O NO catalisa a fosforilação do receptor de TXA_2 , evitando assim a ativação plaquetária mediada por esse último. A expressão da P-selectina, como já

mencionado, é necessária para facilitar a adesão plaquetária. O NO induz a diminuição dessa proteína, promovendo dessa forma a inibição da adesão. Há redução do número total de receptores GPIIb/IIIa na superfície da plaqueta e aumento da constante de dissociação desse receptor pelo fibrinogênio, criando então condições desfavoráveis para a agregação plaquetária (VANNI et al., 2007) (Figura 21).

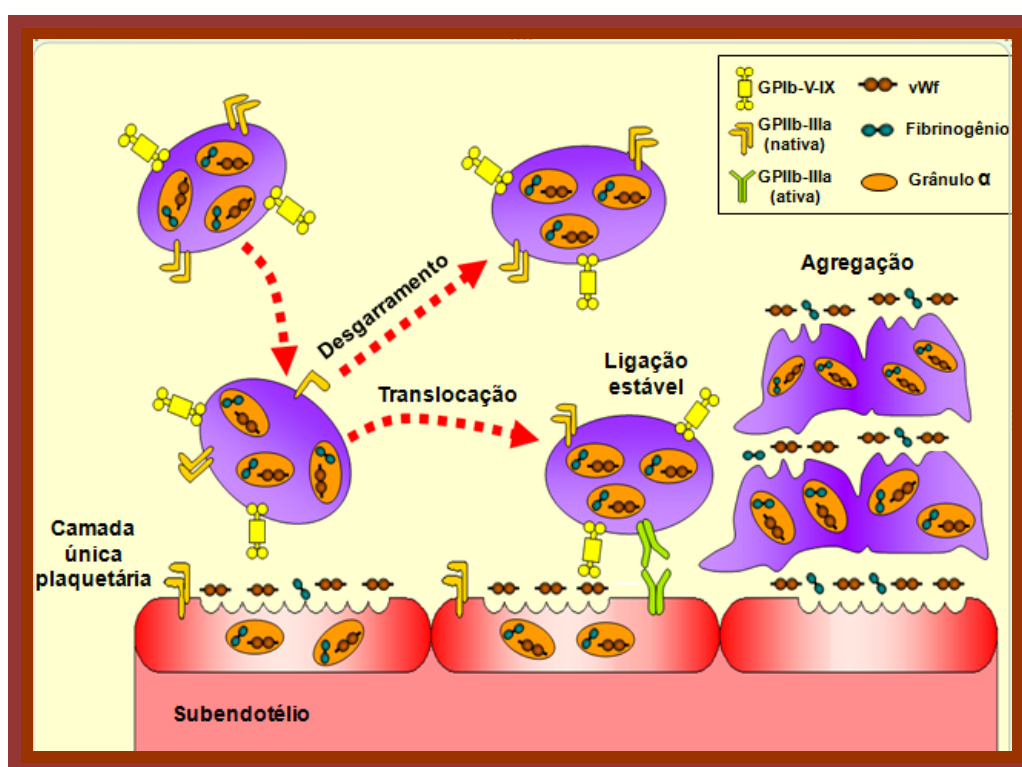


Figura 21. Agregação das plaquetas (KULKARNI et al., 2000).

1.7 A via L-arginina-NO na SM e na obesidade

A disfunção microvascular é uma característica importante da síndrome metabólica que afeta a pressão e o fluxo padrão, aumentando a resistência vascular periférica e diminuindo a sensibilidade à glicose disponível mediada pela insulina, que contribui para hipertensão e RI, respectivamente (JONK et al., 2007).

Em ratos Zucker obesos, um modelo animal de SM, a dilatação reduzida mediada pelo endotélio estava associada à diminuição da biodisponibilidade de NO e ao excesso de produção de superóxido (DE NIGRIS et al., 2007). Em pacientes com SM, as respostas à acetilcolina intrabraquial foram atenuadas tanto em pacientes hipertensos como normotensos (DELL'OMO et al., 2006). Os níveis de NO se correlacionam negativamente com índice de massa corporal, pressão sanguínea sistólica e triglicérides nesses pacientes (SUN et al., 2006).

Estudos indicam que a vasodilatação, *per se*, não aumenta o transporte de glicose no músculo. Entretanto, quando a vasodilatação ocorre concomitantemente com o recrutamento de novos leitos capilares, como causado pela insulina, o transporte de glicose no músculo é aumentado (CERSOSIMO; DeFRONZO, 2006). A diminuição da RI é capaz de aumentar a oferta de NO, já que a insulina aumenta a expressão da enzima NO-sintase endotelial, fisiologicamente (ZENG et al., 2000). Recentemente, Goya et al. (2004) demonstraram a capacidade desses agonistas (dentre eles a insulina) de estimular diretamente a expressão da enzima NO-sintase endotelial *in vitro*.

Estudos recentes têm mostrado que redução da síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina em células endoteliais é um fator importante que contribui para a ação diminuída da insulina na vasculatura de obesos e diabéticos. A diminuição da produção de NO resulta de uma deficiência de tetrahydrobiopterina BH₄, um co-fator essencial para a NOS, bem como aumento da geração de glucosamina (um inibidor do ciclo das pentoses responsável pela produção de NADPH, outro co-fator para NOS), a partir da glicose e L-glutamina. Assim, a disfunção endotelial pode ser prevenida por (1) aumento da síntese de BH₄, através da suplementação de seu precursor (sepiapterina); (2) transferência de genes para GTP ou (3) suplementação de L-arginina. A modulação da via L-arginina-NO por BH₄ é benéfico para a resistência à insulina melhorando o desempenho vascular na obesidade e diabetes (WU; MEININGER, 2009).

A insulina inibe a interação plaqueta-endotélio, devido ao aumento da produção de NO. Os receptores de insulina pertencem à família tirosinoquinase. A sua ativação ocorre por duas vias independentes de autofosforilação e desencadeia a cascata do PI3K, ativando a AKT, liberando o NO e exercendo ação antiaterogênica. Se houver defeito na autofosforilação da tirosina haverá ativação da

segunda via que é da proteína RAS/MAPK, que ao contrário da anterior promove aterogênese, logo em concentrações fisiológicas, a insulina age pela ativação da PI3K. No estado de RI, altas concentrações de insulina estimulam a via da MAPK, promovendo a proliferação e a migração celular (FEENER ;DZAU., 2005).

A ação vasodilatadora da insulina tem sido demonstrada pelo aumento da produção de NO, duplicando o fluxo sanguíneo da perna de pacientes diabéticos após estudo com clamping euglicêmico-hiperinsulinêmico. A influência da insulina na liberação de NO é menor do que a da acetilcolina. O efeito da insulina na produção de NO é bifásico, com uma fase rápida e outra tardia. O efeito agudo parece depender da ativação da eNOS, enquanto o tardio depende da expressão de gene da eNOS. (FEENER ;DZAU., 2005).

Na presença de concentrações elevadas de glicose, observou-se a produção de ânions superóxidos maior que a liberação de NO, havendo formação do potente oxidante peroxinitrito, que contribui para a disfunção endotelial. No diabetes, a diminuição da síntese do NO pode ser por: 1) diminuição da disponibilidade da L-arginina, 2) alteração do sinal de transdução controlado pela proteína G, 3) diminuição da disponibilidade de co-fatores para síntese de NO, 4) inibição endógena da NOS (ADMA), 5) aumento da inativação ou degradação do NO, seja por ativação da via poli-ol, com aumento de produtos finais da glicação não-enzimática (AGES) ou ativação da proteína quinase C-diacilglicerol (DAG-PKC) ou aumento do estresse oxidativo, ou desacoplamento da eNOS. O aumento da produção de fatores de contração derivados do endotélio, prostanóides vasoconstritores, também pode diminuir a síntese do NO no DM (LUZ, 2005, p. 269,270).

A ativação da PKC pela hiperglicemia se dá através da elevação dos níveis de DAG. Esta ativação retarda o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina, aumenta a permeabilidade vascular à albumina, estimula a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (retinopatia diabética), aumenta a síntese de colágeno tipo IV e VI (LUZ, 2005, p 272).

Os níveis elevados de ADMA estão associados à disfunção endotelial e ao aumento do risco cardiovascular em várias doenças (BÖGER, 2004) e plasmáticos estão positivamente correlacionados com a RI em indivíduos normotensos não-diabéticos (STÜHLINGER et al., 2002).

A adiponectina pode mimetizar as ações da insulina pela estimulação da fosforilação e da atividade da eNOS no endotélio vascular, resultando em aumento da produção de NO. Assim, o novo papel da adiponectina na ativação da eNOS explica suas propriedades metabólicas e antiaterotrombóticas (CHOI et al., 2001).

A peroxidação lipídica pode favorecer a dislipidemia da SM, que se caracteriza por aumento dos níveis de TGs e queda dos níveis de HDL-colesterol. Essas alterações lipídicas parecem estar intimamente associadas à RI. Há diminuição da ação da insulina sobre a lipase lipoprotéica, menor captação de glicose e aumento da liberação de ácidos graxos livres e glicerol, propiciando maior produção hepática de TGs e VLDLs. Os TGs da VLDL são transferidos para o LDL, o que favorece a formação de partículas menores e mais densas, as quais têm maior acesso à íntima arterial, sendo mais suscetíveis à oxidação. Ocorre também a geração de HDLs pequenas e densas, com menor potencial antiaterogênico (RAFFAELLI F et al., 2009).

O colesterol LDL oxidado e as citocinas aumentam a arginase e diminuem a expressão da NOS em células endoteliais humanas, levando a uma diminuição na produção de NO (LAUER et al., 2008).

As apolipoproteínas principais do HDL são apo A-I e apo A-II. O nível de apo A-I, bem como do HDL-colesterol (HDL-C), na circulação é um grande preditor negativo de aterosclerose e risco de doença arterial coronariana. A apo A-I é necessária para a ativação da enzima eNOS. A estimulação da eNOS pelo HDL foi atenuada pelo anticorpo anti apo A-I (YUHANNA et al., 2001). Em contraste, a estimulação da eNOS pela HDL foi reforçada pelo anticorpo anti-apo A-II. Estes resultados combinados foram realizados em um estudo de estrogênio e indicam que a apo A-I está relacionadas ao receptor de estrogênio (ER) que se co-localiza e funcionalmente liga o estradiol para eNOS na cavéola (YUHANNA et al., 2001). As contribuições de outras apolipoproteínas menores e os componentes lipídicos das partículas de HDL precisam ainda ser elucidados.

A exigência de apo A-I na estimulação da eNOS pela HDL sugere que o receptor de *scavenger* (SR-BI) também é necessário porque apo A-I medeia a ligação da lipoproteína ao receptor (LIADAKI et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000;). A eNOS normalmente é orientada para os microdomínios da membrana plasmática, ricos em esfingomielina e colesterol conhecidos como cavéola (GARCIA-CARDENA

et al., 1996 b; SHAUL, 2002; SHAUL et al., 1996). Dentro da cavéola, a eNOS é compartimentada em um módulo funcional de sinalização que regula a atividade da enzima (SHAUL, 2002). A LDL-ox faz o deslocamento de eNOS da cavéola, resultando no rompimento da ativação da eNOS (EVERSON; SMART, 2001).

Os efeitos adversos do LDL são revertidos integralmente pela HDL via de ligação à SR-BI, que está co-localizada com a eNOS da cavéola em células endoteliais. Isto ocorre através do teor da manutenção do colesterol na cavéola e pela captação de éster de HDL (EVERSON; SMART, 2001; UITTENBOGAARD et al., 2000). Em face ao perturbado equilíbrio do colesterol da membrana pela LDL-ox, a HDL normaliza o ambiente lipídico e preserva a integridade da sinalização da eNOS (MINEO; SHAUL, 2003) (Figura 22) .

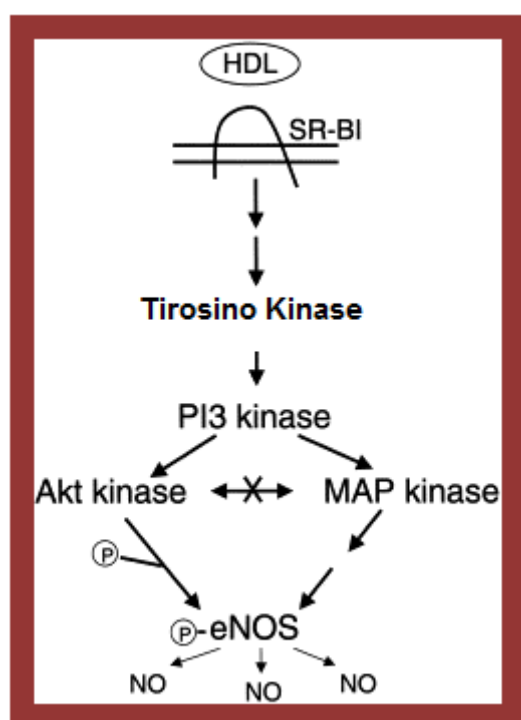


Figura 22. Ação da HDL na eNOS.(SR-BI-*scavenger receptor* BI)

Devido à composição lipídica da cavéola, é sugerido que a conhecida associação entre hipercolesterolemia e disfunção do relaxamento dependente do

endotélio possa envolver uma alteração da fisiologia desta estrutura. A exposição de células ao colesterol, *per si*, aumenta o número de cavéolas bem como a expressão da eNOS e sua associação com as cavéolas e a produção de NO. Por outro lado, a exposição ao estresse oxidativo ou às lipoproteínas oxidadas leva à redução do número de cavéolas, bem como da associação da eNOS com as mesmas, resultando em menor produção de NO (LUZ, 2005, p 46).

1.8 Síndrome metabólica, inflamação e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas ou fragmentos moleculares com um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), derivadas do metabolismo do oxigênio, sendo encontradas no ambiente e em todos os sistemas biológicos (TOUYZ; SHIFFRIN, 2004).

Essas moléculas são formadas quando há perda ou ganho de um elétron, ficando o outro desemparelhado. Essa reação ocorre em processos oxidativos biológicos a partir de compostos endógenos, como também podem ser oriundos do metabolismo de compostos exógenos, gerando diferentes radicais livres (BELLÓ, 2002).

O estresse oxidativo é mais bem definido como o excesso de radicais livres de oxigênio ou ERO em relação aos sistemas antioxidantes - enzimas catabólicas e quelantes de ERO. Tanto o aumento da produção de ERO como a redução dos antioxidantes podem decorrer de uma grande variedade de injúrias celulares, de natureza física, química ou ambiental (KAUR; GEETHA, 2006). Em condições normais, a taxa de produção de ERO é equilibrada pela taxa de eliminação. Entretanto, um desequilíbrio entre a geração de ERO e a proteção antioxidante, resulta na alteração da biodisponibilidade de ERO, levando a um estado de estresse oxidativo (LANDMESSER; HARRISON, 2001; ZALBA et al., 2001). Foi demonstrado que existe uma relação direta entre síndrome metabólica, inflamação crônica e estresse oxidativo (KOH et al., 2006).

O ânion superóxido (O_2^-) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até a água, sendo formado a partir dele as demais ERO (BELLÓ, 2002).

A sinalização redox é a transdução de sinais de processos celulares nos quais os elementos integrativos são reações de transferências de elétrons, envolvendo radicais livres ou espécies relacionadas, metais ativos em sistemas redox (exemplo ferro, cobre). Um exemplo de equivalente redutor é o átomo de hidrogênio (que tem um próton e um elétron) doado por substratos redutores como o NADPH, glutatona reduzida ou proteínas com grupos de tiol (LUZ, 2005, p 117).

O NO é um radical livre, pois apresenta um elétron desemparelhado na última camada em estado gasoso. O óxido nítrico tem meia-vida de poucos segundos em ambiente aquoso, mas sua estabilidade é maior em ambiente com baixa concentração de oxigênio (TOUYZ; SHIFFRIN, 2004). Ele se difunde através das membranas celulares, tendo capacidade de reagir com outros radicais livres ou com o oxigênio molecular, que é um dirradical. No meio extracelular, o NO reage com o oxigênio e água para formar nitrito e nitrato, seus principais metabólitos fisiológicos em meio aquoso (VALKO et al., 2006; LUZ, 2005, p 33) A superprodução de espécies reativas de nitrogênio ocorre também quando o sistema excede a habilidade em neutralizá-las e eliminá-las. Isto pode levar a reações de nitrosilação que pode alterar a estrutura de proteínas e inibir sua função normal (VALKO et al., 2006).

Um importante papel desempenhado pelo NO como radical livre é a formação de peroxinitrito (ONOO^-), ao reagir com O_2^- . (VALKO et al., 2006).

As células do sistema imune produzem superóxido e NO durante o “burst” oxidativo atingido nos processos inflamatórios. Sob estas condições, o NO e o O^{2-} reagem, produzindo quantidades significativas de uma molécula muito mais ativa, o ONNO^- , que é um potente agente oxidante que pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica (CARR, MCCALL, FREI, 2000).

O aumento de ERO vascular pode induzir o desacoplamento da eNOS por oxidação aumentada do cofator BH_4 e inibição de dimetilarginina dimetilaminohidrolase (enzima que metaboliza a metilarginina, uma análogo da L-arginina) (WIDDER et al., 2010). A NADPH oxidase pode induzir o desacoplamento de NOS endotelial, por ser a principal fonte de produção de ERO (LANDMESSER et al., 2006).

Na peroxidação lipídica, todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de ERO, porém a membrana celular é uma das mais atingidas, apresentando alterações na estrutura e na permeabilidade da mesma (MELLO, 1984).

As membranas das células contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, que estão relacionados com a fluidez da membrana. Os danos nesta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela remoção de um de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados por algumas ERO (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 1991).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre a geração de ERO e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O mecanismo de ação dos antioxidantes inclui desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das ERO, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres e aumento da geração de antioxidantes endógenos (BELLÓ, 2002).

Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não-enzimáticos e conforme a ação sobre as ERO, podendo ser denominados de “*scavenger*”, quando ele age transformando uma ERO em outra menos reativa ou “*quencher*” quando consegue neutralizar completamente a ERO através da absorção da energia de excitação (SIES, 1983). O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de O_2^- e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No sistema enzimático, destaca-se a enzima SOD. Esta é o maior sistema de defesa da célula vascular e catalisa a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (ROSS; MOLDEUS, 1991; ACHARYA et al., 1991).

A expressão e a atividade aumentadas das enzimas NOS foram detectadas recentemente em tecido adiposo acumulado de camundongos obesos e foram relacionados à redução das defesas antioxidantes e à alteração da regulação da adipocitocina (MONCADA et al., 2006).

A produção excessiva de radicais livres e o dano oxidativo parece explicar, pelo menos em parte, a perpetuação da RI, a alteração na produção de energia, a disfunção endotelial e o aparecimento de complicações vasculares nessa condição. Observações clínicas e experimentais indicam o estresse oxidativo como um importante mecanismo na hipertensão, diabetes e obesidade associadas à SM e às suas complicações (MONCADA et al., 2006; ECKEL et al., 2005) (Figura 23).

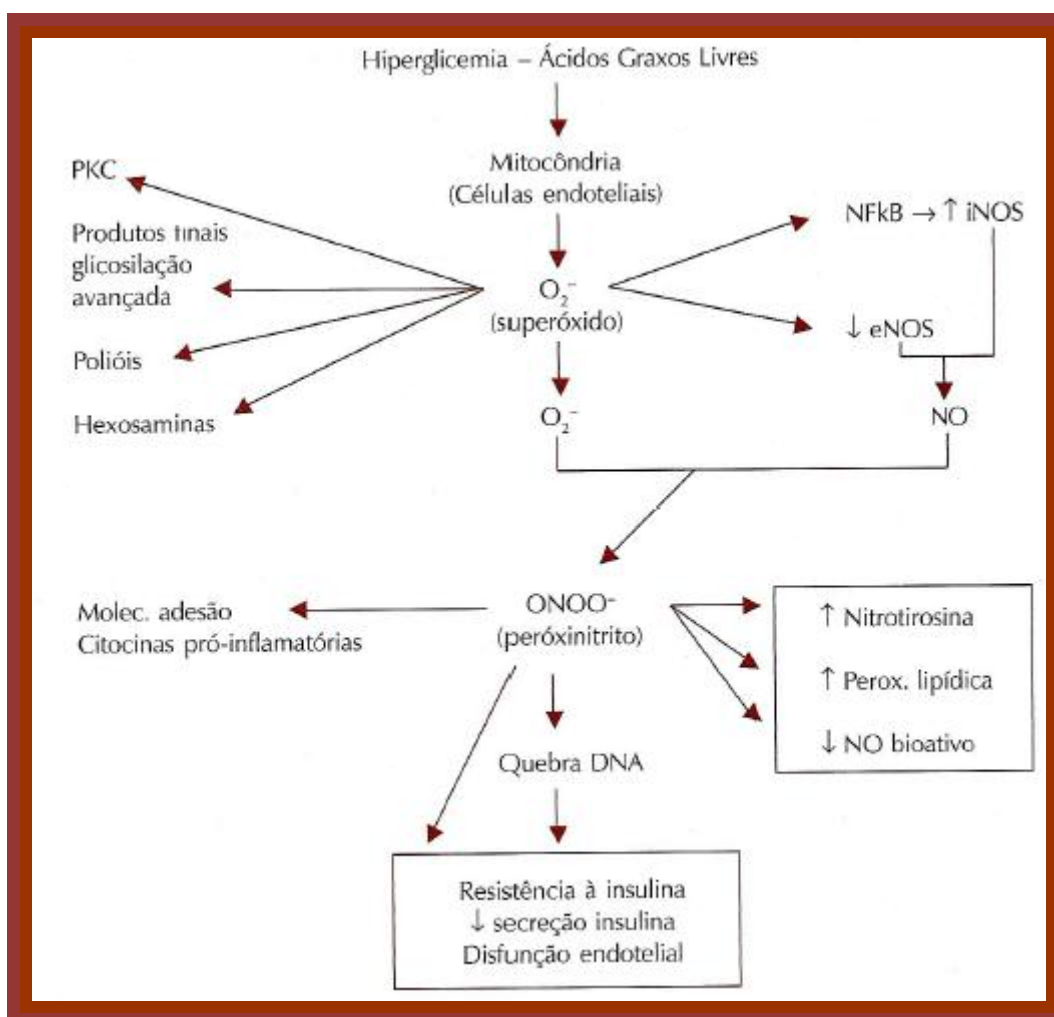


Figura 23. Hiperglicemia e ERO. (SAAD; MACIEL; MENDONÇA, 2007).

A hiperglicemia é uma anormalidade relacionada aos mecanismos causais da disfunção endotelial no diabetes. O influxo de glicose e ácidos graxos origina o acetil-CoA, substrato que na mitocôndria, através da sua cadeia respiratória, vai produzir energia. Caso exista um defeito da função oxidativa mitocondrial ou um excesso de substrato (hiperalimentação), o gradiente protônico mitocondrial aumenta e elétrons são transferidos ao oxigênio, resultando na geração de radicais livres, particularmente o ânion superóxido. Como as células β e endoteliais são insulino-independentes e, portanto, livremente permeáveis à glicose e aos ácidos graxos, poderá ocorrer um acúmulo desses substratos nesses tecidos, causando estresse oxidativo, que levará à disfunção das células β e endoteliais. O superóxido ao ativar o NF- κ B induz condições pró-inflamatórias e superexpressão de moléculas de

adesão. A produção aumentada de superóxido é acompanhada pelo aumento da geração de NO, os quais ao se combinarem favorecem a formação do potente oxidante peroxinitrito, com efeitos deletérios, particularmente ao DNA, levando também à disfunção endotelial e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (SAAD et al., 2007, p.915-916)

Dados experimentais sugerem que o estresse oxidativo induz a RI, por bloquear a fosforilação, que é estimulada pela insulina, através do IRS-1 e alterando a distribuição subcelular do PI3P. O mecanismo provável de inibição da insulina estaria relacionado com a transcrição de citocinas ativadas pelo NF- κ B (SAAD et al., 2007, p.915-916).

A incidência precoce e elevada de aterosclerose e eventos cardiovasculares em pacientes com diabetes e com níveis sanguíneos elevados pós-prandiais de glicose foram associados, parcialmente, ao estresse oxidativo e aos níveis elevados de concentração plasmática de ADMA (BÖGER et al., 2005). De fato, a formação de ERO induzida pela hiperglicemia pode levar, sucessivamente, à disfunção endotelial pela redução da biodisponibilidade do NO e da prostaciclina e pelo aumento da síntese de vasoconstritores como prostanóides e ET-1 (PAIGE et al., 2007).

A importância do acúmulo da gordura visceral no desenvolvimento das desordens metabólicas, é fato, incluindo reduzida tolerância à glicose, dislipidemia e doenças cardiovasculares mas também alterações hepáticas, portanto a SM também está presente no fígado. A sequência de eventos que ocasionam degeneração do hepatócito pela gordura se inicia com a RI, que precede o acúmulo de gordura (REAVEN, 1998). A injúria celular ocorre após o aumento da concentração de ácidos graxos, o estresse oxidativo, a depleção energética e a disfunção mitocondrial (REAVEN, 1998; PRASAD et al., 2004; LAKKA et al., 2002).

A inflamação associada ao processo aterosclerótico é modulada pela atividade de várias famílias de enzimas, incluindo cicloxigenases, lipoxigenases, NOS e peroxidases, todas com capacidade de produzir ERO (PAIGE et al., 2007).

A participação da hipertensão arterial associada à SM pode estar relacionada ao estresse oxidativo sistêmico, que é sugerido por algumas observações de mudanças no metabolismo do NO e baixos níveis na circulação de vitamina C em pacientes com alto grau de hipertensão (BRUNINI et al., 2007) e melhora do

estresse oxidativo sistêmico com o tratamento anti-hipertensivo (BUSTAMANTE et al., 2007).

Os elevados níveis dos ânions superóxido e peroxinitrito estão presentes em pacientes com hipertensão essencial (Figura 24) (ESPLUGUES et al., 2002; MEHTA et al., 1995). Essas considerações são mais importantes quando associadas à ativação do endotélio e à sua disfunção, coincidente com níveis circulantes elevados de LDL-ox, moléculas de adesão intracelular e vascular, e proteína C reativa (proteína plasmática de fase aguda produzida pelo fígado) (CHEN et al., 1998).

A angiotensina II é um dos estímulos mais potentes de ativação das NOS vascular, o que relaciona a produção de ERO com a ativação do sistema renina-angiotensina na hipertensão. Assim, fármacos que agem sobre o sistema renina-angiotensina reduzem a atividade das NOS, fazendo, então, desta enzima um alvo específico da droga (FURUKAWA et al., 1998).

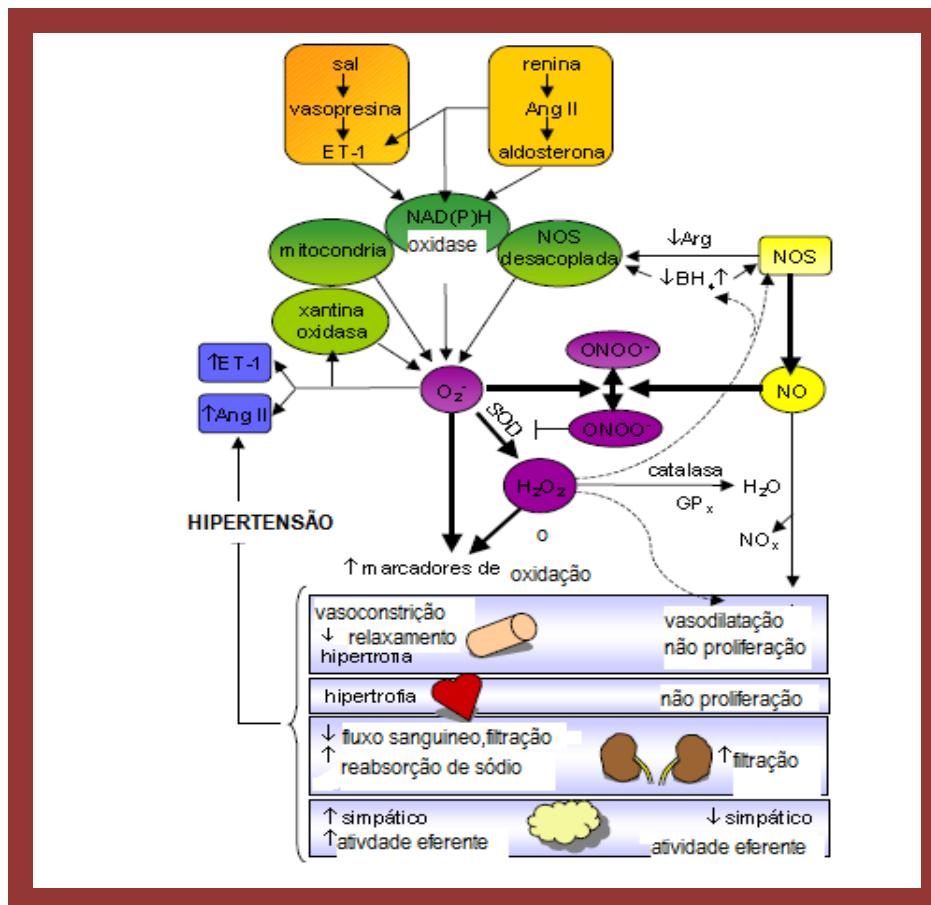


Figura 24. Hipertensão e ERO. (GONZÁLEZ, 2006)

Os danos vasculares induzidos pelo estresse oxidativo são mediados por NOS e homocisteína (VAN RIPER et al., 1997; KAMM et al., 1985). As NOS associadas à membrana são a maior fonte de ERO em condições pré-ateroscleróticas em artérias periféricas e coronárias humanas (ARCHER et al., 1994; ROBERTSON et al., 1993).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar, detalhadamente, a via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas humanas de adolescentes saudáveis e pacientes adolescentes com obesidade e síndrome metabólica, bem como avaliar o estado metabólico-hormonal, inflamatório e o estresse oxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estudar o transporte de L-arginina e sua associação à produção de óxido nítrico, através da avaliação da atividade e da expressão da NOS e da concentração intraplaquetária de GMPc em plaquetas de adolescentes saudáveis e pacientes adolescentes obesos e com SM ;
- ✓ Analisar a agregação plaquetária induzida por colágeno (2-6 $\mu\text{g/mL}$) em controles e pacientes com SM e com obesidade;
- ✓ Avaliar a relação entre concentração plasmática de marcadores inflamatórios (leucócitos, fibrinogênio e proteína C reativa ultrasensível), estado metabólico-hormonal, estresse oxidativo, aminoácidos e a via L-arginina-NO em plaquetas de pacientes e controles;

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção dos indivíduos

Participaram do estudo 30 adolescentes, sendo 10 obesos, 10 com SM, e 10 controles saudáveis pareados por idade, sexo e classificação de Tanner (Tanner, 1962) (controles: $n= 10$, 15.6 ± 0.7 anos; obesos: $n= 10$, 15 ± 0.9 anos; SM: $n= 10$, 14.9 ± 0.8 anos). Para participar do estudo os indivíduos deveriam ser classificados como jovens adolescentes de acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), ou seja, possuir idade entre 10 e 19 anos, e estar em estágios puberais a partir do estágio III de Tanner ou em estágio pós-puberal. Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, transfusão recente, infecção e uso de medicamentos antiplaquetários.

Os participantes do estudo foram recrutados do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) – Núcleo de Estudos da Saúde do Adolescente (NESA) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) –, do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia do Rio de Janeiro Luis Capriglione (IEDE) e da Escola Estadual de Formação de Professores Júlia Kubitschek (EEJK), e divididos em três grupos: controles, obesos e síndrome metabólica, de acordo com o cálculo do IMC para sexo e idade, classificado, de acordo com os gráficos nos Anexos 1 e 2 do *NCHE- National Center for Health Statistics em colaboração com CDC-Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion*.

Uma vez identificado o percentil, o estado nutricional foi determinado de acordo com a Quadro 1.

A classificação da SM foi baseada nos critérios apresentados no Quadro 3, sendo determinada pela presença de no mínimo três critérios.

3.2 Aspectos éticos

O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE-processo 451) (Anexo 3) e o consentimento dos pacientes, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável (Anexo 4).

3.3 Avaliação clínica e laboratorial

Os dados clínicos referentes aos pacientes, necessários ao estudo, foram coletados utilizando-se o Protocolo do Laboratório de Transporte de Membrana elaborado previamente (Anexos 5). As avaliações bioquímica, hematológica e hormonais foram feitas no laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto e do IEDE.

Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados:

- ✓ Altura: determinada pela média de três medições realizadas com estadiômetro Tonelli de parede com escala em milímetros (padrão nacional), amplitude de medida de 400 a 2200 mm;
- ✓ Peso: avaliado com os adolescentes vestidos com roupas leves (avental descartável) na balança eletrônica Filizolla® (capacidade para 150 kg e sensibilidade 100 g);
- ✓ IMC: peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado, conforme mencionado anteriormente;
- ✓ Relação cintura/quadril: as medições da circunferência da cintura e do quadril foram realizadas com os indivíduos em pé, usando-se fita métrica extensível. A medida da cintura é no ponto médio da distância entre a última costela e a crista ilíaca ântero-superior. O quadril foi medido na região de maior perímetro entre a cintura e a coxa (KEENAN et al., 1992).
- ✓ A pressão arterial sistólica e diastólica: foram verificadas na posição sentada (após descanso por 5 minutos e com três aferições);

- ✓ Frequência cardíaca.
- ✓ Circunferência de pescoço determinada pela média de três aferições com fita métrica extensível.

3.4 Isolamento e preparo das plaquetas

As amostras de sangue (20-30 mL) foram coletadas por venopunção nos pacientes e controles e transferidas para tubos de polipropileno, onde o sangue foi misturado com anticoagulante ACD (Ácido cítrico- 7,5g; Citrato trissódico- 12,5g; Glicose- 10g; pH=4,5). Todas as etapas de isolamento e preparo das plaquetas foram realizadas em temperatura ambiente. A primeira centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804 C) das amostras é realizada durante 15 minutos a 250g, para obtenção do plasma rico em plaquetas. Em seguida, o plasma rico em plaquetas é transferido para tubos de polipropileno e centrifugado a 900g por 10 minutos. O sobrenadante é então descartado e as plaquetas ressuspensas em solução Krebs (Quadro 5).

Solutos	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

Quadro 5. Solução de Krebs. pH=7,4

3.5 Extração de proteína e Western Blotting

Foi avaliada a expressão das isoformas endotelial e induzível da NOS em plaquetas através de Western Blotting. As proteínas foram extraídas a partir do isolamento de plaquetas de pacientes e controles por centrifugação. A dissolução dos pellets de plaquetas foi realizada em tampão de extração de proteínas (Quadro 6), 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 suspensos em tampão de amostra (Quadro 7) após desnaturação das proteínas por incubação 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 8). A transferência para as membranas de PVDF (Invitrogen - CA) foi feita em tampão de transferência (Quadro 9) com voltagem de 40V por 3h para os ensaios da NOS.

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

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

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

Quadro 6. Composição do tampão de extração de proteínas. pH =7,5

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

Quadro 7. Composição do tampão de amostra. pH= 6,8

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

Quadro 8. Composição do tampão de corrida.

Reagente	Concentração
Glicina	0,2 M
Tris	25 mM
SDS	0,10%
Etanol	18%

Quadro 9. Composição do tampão de transferência.

3.6 Dosagem de proteína

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

3.7 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.

3.8 Transporte de L-arginina em plaquetas

No experimento de transporte de L-arginina em plaquetas, L-arginina tritiada (concentrações de 1-50 μM , Sigma) foi adicionada à suspensão de plaquetas, e incubada por 5 minutos a 37⁰ C. Para fracionar o transporte total em difusão e sistema γ^+L , o aminoácido neutro L-leucina (10 mM) foi adicionado à suspensão de plaquetas. O sangue foi então centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804 C) rapidamente e lavado com Krebs, as células lisadas com Triton X-100, e a radioatividade contada em um analisador de cintilação (LS65000 Liquid Scintillation Counter Beckman Coulter, Califórnia).

3.9 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).

3.10 Análise da atividade da NOS plaquetária

A atividade basal da NOS foi avaliada em plaquetas de pacientes com SM e obesidade e controles pela conversão de L-[³H]-arginina em L-[³H]-citrulina. L-[³H]-arginina foi adicionada à suspensão de plaquetas, seguida de incubação por 45 minutos a 37°C. A reação foi interrompida por rápida centrifugação, com posterior lavagem com solução de Krebs. As plaquetas são lisadas com Tryton e transferidas para uma coluna contendo a resina Dowex. L-[³H]-citrulina foi removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade contada.

3.11 Mensuração de GMPc intracelular

A concentração basal intraplaquetária de GMPc foi avaliada por método ELISA (Kit Cayman). Foram adicionados 200 μ M de IBMX (inibidor de fosfodiesterase) à suspensão de plaquetas e realizada incubação por 30 minutos. Em seguida, ácido perclórico foi acrescentado às amostras, que foram submetidas a um banho de ultrassom (MaxiClean 1400) por 15 minutos. As amostras foram congeladas rapidamente em nitrogênio para posterior centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5417 C) a 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).

3.12 Agregação plaquetária

O sangue coletado anticoagulado com citrato trissódico a 3,8% (Quadro 10) foi centrifugado a 180g (Eppendorf Centrifuge 5804 R) por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido por centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804 R) de 900g por 10 minutos. A concentração plaquetária do plasma rico em plaquetas (PRP) foi ajustada com o PPP para uma contagem constante de $2,5 \times 10^8$ /mL. A agregação foi induzida por colágeno (2, 4 e 6 μ g/L) e a resposta monitorada por 5 minutos em um agregômetro de 4 canais (Chrono-Log) (Figura 25). Os testes foram feitos a 37° C, numa velocidade de rotação de 900 rpm. A agregação máxima foi expressa em percentual.

Soluto	mM	g/L
Citrato trissódico	130,5	38

Quadro 10. Composição do citrato de sódio. pH=4

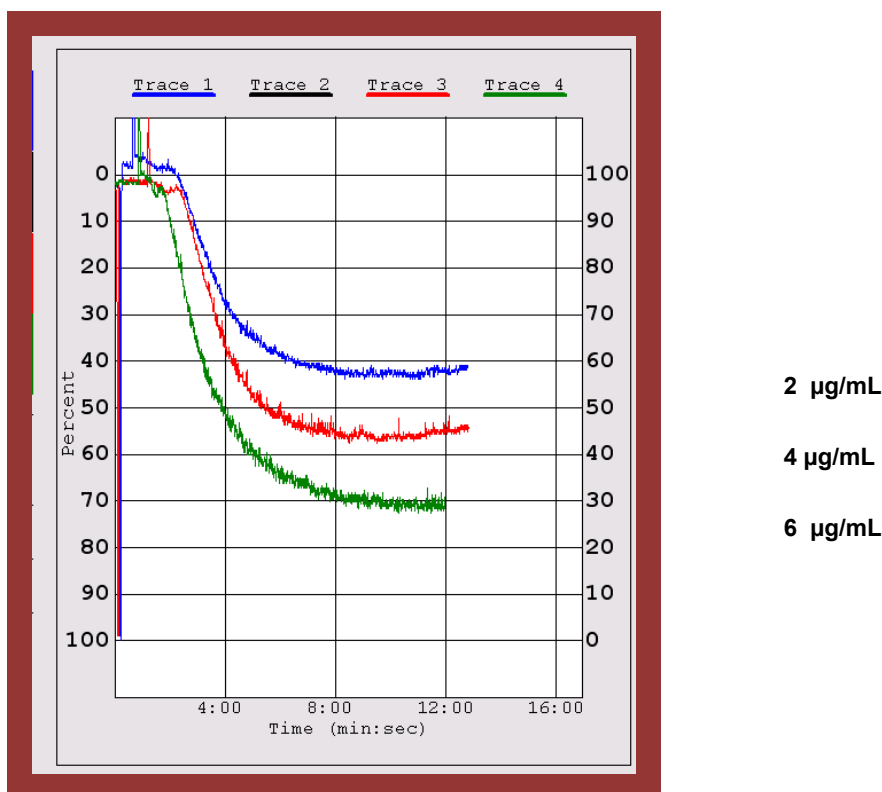


Figura 25. Exemplo de um experimento de agregação plaquetária induzida por diferentes concentrações de colágeno (2 – 6 µg/mL).

3.13 Determinação da peroxidação lipídica

Como um marcador de peroxidação lipídica, a formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada durante uma reação de aquecimento do ácido tiobarbitúrico. As amostras de plaquetas e soro foram misturadas com 1mL de ácido tricloroacético 10% e 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e 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

As plaquetas e o soro 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 Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados em forma de média \pm erro padrão (EP). O $V_{\text{máx}}$ e o K_m dos sistemas de transporte foram determinados através da equação Michaelis-Menten. A significância estatística foi determinada quando $p < 0.05$, usando Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, quando os dados apresentavam distribuição normal, e Teste de Kruskal-Wallis, para dados não distribuídos normalmente, para comparações entre os três grupos. As análises de correlação foram realizadas através do Coeficiente de Correlação de Pearson. Os cálculos estatísticos e o preparo dos gráficos foram realizados através do programa de computador GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Program, San Diego, CA, USA).

3.16 Reagentes

A maioria dos reagentes utilizados foram provenientes da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), exceto o colágeno, que foi adquirido na Chrono-Log.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados da avaliação clínica

As características clínicas e nutricionais dos pacientes e controles estão sumarizadas na Tabela 1. Os valores do IMC observados comprovam o estado de obesidade dos pacientes. Também foi evidenciado que os pacientes de ambos os grupos apresentavam aumento da circunferência do pescoço, da cintura e do quadril, das pressões arteriais sistólica e diastólica, comparados aos controles.

Tabela 1. Características clínicas e nutricionais dos controles saudáveis e dos pacientes com obesidade e SM.

Dados clínicos	Controles	Síndrome Metabólica	Obesidade
Número de pacientes (Masculino/Feminino)	10 (3/7)	10 (3/7)	10 (4/6)
Idade (anos)	15.6 ± 0.7	14.9 ± 0.8	15.0 ± 0.9
Peso ao nascer (Kg)	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.1
Circunferência do Pescoço (cm)	32.5 ± 1.1	38.6 ± 0.9*	37.3 ± 1.5*
IMC (Kg/m ²)	20.1 ± 0.7	37.1 ± 2.1*	33.1 ± 1.5*
Frequência Cardíaca (bpm)	81.2 ± 2.5	87.2 ± 1.8	87.0 ± 2.1
Pressão Arterial Sistólica(mmHg)	104 ± 3.1	129.5 ± 3.8*	116.0 ± 6.7
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	61 ± 1	77.5 ± 2.7*	71.5 ± 3.8
Cintura (cm)	68.2 ± 1.9	104.7 ± 3.8*	101.9 ± 4.3*
Quadril (cm)	95.0 ± 1.9	122.1 ± 4.3*	118.8 ± 3.1*
Relação cintura/quadril (RCQ)	0.70 ± 0.02	0.86 ± 0.02*	0.85 ± 0.02*

*p< 0.05 vs controle

4.2 Resultados laboratoriais

4.2.1. Hematologia, bioquímica e hormônios

A Tabela 2 mostra os resultados dos dados laboratoriais com significância nos seguintes resultados: os leucócitos e a insulina estavam aumentados em ambos os grupos de pacientes, comparados ao grupo controle, e nos pacientes com SM, em relação aos obesos; a GGT, a Homa IR e a leptina estavam maiores em ambos os grupos de pacientes, quando comparado ao grupo controle; os níveis de fibrinogênio elevados nos adolescentes do grupo obeso, em relação ao grupo controle; as plaquetas, o ácido úrico, os triglicérides e a PCR estavam elevados na SM, em relação aos controles, enquanto o HDL estava diminuído.

Tabela 2. Dados laboratoriais dos controles e dos pacientes com síndrome metabólica e dos pacientes com obesidade

Dados Laboratoriais	Controles	SM	Obesidade
Hemoglobina (g/dL)	11.8 ± 1.3	12.5 ± 0.4	13.6 ± 0.4
Hematócrito (%)	37.1 ± 2.9	37.3 ± 0.7	40.1 ± 0.9
Leucócitos(mm ³)	6255 ± 395.3	8230 ± 554.7*,#	7530 ± 583.9*
Plaqueta (10 ³ /mm ³)	248.3 ± 10.8	322.1 ± 20.3*	258.9 ± 26.0
Ureia (mg/dL)	22.4 ± 1.9	24.2 ± 1.7	27.2 ± 3.5
Creatinina (mg/dL)	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0
Ácido Úrico (mg/dL)	4.2 ± 0.4	5.8 ± 0.4*	5.5 ± 0.5
Sódio (mmol/L)	137.8 ± 0.8	139.9 ± 1.1	139.8 ± 1.2
Potássio (mmol/L)	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Colesterol Total (mg/dL)	147.6 ± 9.3	168.4 ± 11.9	169.8 ± 10.1
Colesterol HDL (mg/dL)	51.7 ± 3.4	37.9 ± 1.6*	43.4 ± 2.2
Colesterol LDL (mg/dL)	76.4 ± 7.4	101.8 ± 9.1	105.8 ± 9.2
Colesterol VLDL (mg/dL)	14.9 ± 1.5	29.8 ± 6.6	25.1 ± 5.3
Triglicerídeos (mg/dL)	77.2 ± 7.7	166.3 ± 28.1*	121.7 ± 16.9
TGP (U/L)	12.8 ± 1.9	26.4 ± 9.0	24.8 ± 4.0
TGO (U/L)	18.7 ± 1.0	19.8 ± 4.0	23.0 ± 2.1
GGT (U/L)	10.6 ± 1.3	29.1 ± 3.5*	30.7 ± 7.5*
Fosfatase Alcalina (U/L)	107.3 ± 25.6	169.5 ± 77.9	104.4 ± 17.4
TSH (mUI/mL)	2.1 ± 0.4	3.5 ± 0.4	2.8 ± 0.5
Glicemia (mg/dL)	85.6 ± 2.0	88.7 ± 2.3	86.2 ± 2.3
Insulina (µUI/mL)	4.2 ± 1.1	14.8 ± 1.5*,#	9.5 ± 1.1*
Homa β	81.0 ± 24.1	202.7 ± 13.6*	143.8 ± 25.2
Homa IR	0.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3*	2.3 ± 0.5*
Leptina (ng/mL)	7,9 ± 2,1	39,38 ± 5,8*	38,19 ± 6,0*
Fibrinogênio (mg/dL)	237 ± 7.2	276 ± 27.4	331.9 ± 26.3*
PCR ultrasensível(mg/L)	0,033 ±0,008	0,916 ± 0,337*	0,234 ± 0,055

*p< 0.05 vs controles, #p<0.05 síndrome metabólica vs obesidade, Homa IR - *Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance* = (U x GJ)/ 22,5, Homa β- *Homeostasis Model Assessment β-Cell Function* = (20 x U)/(GJ - 3,5), U = insulinemia de jejum (mU/L) e GJ= glicemia de jejum (mmol/L) (Matthews et al, 1985)
TGO-Transaminase Glutâmico Oxalacética; TGP-Transaminase Glutâmico Pirúvica;GGT-Gama Glutamil Transferase

Confirmam-se, assim, os critérios para a SM utilizados nesta pesquisa, de acordo Critérios de Cook modificado do ATP III para SM em adolescentes, descrito no Quadro 3. Apesar da glicemia não estar elevada, níveis aumentados de insulina foram observados em ambos os grupos de pacientes.

4.2.2 Aminoácidos

Foi analisado um total de 19 aminoácidos como mostra a Tabela 3, mas não houve diferença entre os grupos. Embora a média das concentrações plasmáticas de arginina estivesse maior em ambos os grupos de pacientes em relação aos controles, não houve significância estatística.

Tabela 3. Concentrações plasmáticas dos aminoácidos ($\mu\text{M/L}$) em controles (n=6), pacientes com SM (n=6) e pacientes obesos (n=6).

Aminoácidos	Controles	SM	Obesidade
Arginina	65,05 \pm 5,10	84,70 \pm 12,25	75,45 \pm 10,24
Ornitina	74,73 \pm 14,10	64,43 \pm 8,90	75,60 \pm 10,45
Lisina	128,90 \pm 18,98	111,40 \pm 8,38	130,60 \pm 15,59
Fenilalanina	63,00 \pm 5,46	55,82 \pm 3,90	62,10 \pm 7,65
Glicina	226,70 \pm 40,54	183,50 \pm 18,56	259,00 \pm 20,13
Isoleucina	83,02 \pm 7,07	89,08 \pm 11,46	92,25 \pm 5,57
Leucina	81,62 \pm 4,72	142,20 \pm 14,36	125,90 \pm 8,75
Metionina	21,13 \pm 4,987	19,47 \pm 2,03	27,87 \pm 3,22
Serina	137,70 \pm 17,57	125,40 \pm 14,98	108,50 \pm 6,66
Taurina	123,60 \pm 23,69	130,00 \pm 19,96	142,40 \pm 20,62
Tirosina	60,88 \pm 60,88	68,65 \pm 5,26	63,87 \pm 6,30
Treonina	160,10 \pm 33,59	87,08 \pm 2,19	86,15 \pm 2,50
Asparagina	50,23 \pm 6,293	59,05 \pm 6,16	59,13 \pm 4,294
Valina	206,60 \pm 29,40	167,20 \pm 13,51	199,00 \pm 22,11
Triptofano	48,75 \pm 6,61	52,17 \pm 5,30	45,57 \pm 7,44
Alanina	253,30 \pm 29,31	242,30 \pm 38,83	265,80 \pm 18,53
Ácido Aspártico	39,53 \pm 17,75	14,42 \pm 0,66	15,00 \pm 1,19
Ácido Glutâmico	68,18 \pm 8,90	88,85 \pm 8,89	89,42 \pm 8,487

4.2.3 Transporte de L-arginina em plaquetas

O transporte de L-arginina ($\text{pmol}/10^9\text{c\acute{e}ls}/\text{min}$) através do sistema γ^+L estava diminuído nos pacientes com SM (18.4 ± 3.8 , $n=10$) e obesidade (20.8 ± 4.7 , $n=10$), comparados aos controles (52.3 ± 14.8 , $n=10$) (Figura 26).

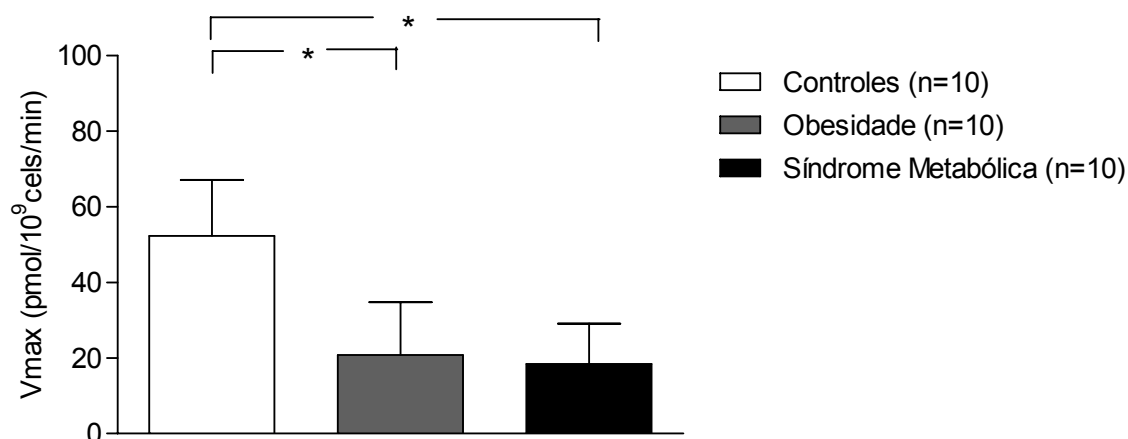


Figura 26. Transporte de L-arginina em plaquetas de controles e pacientes com SM e obesidade.

4.2.4 Atividade da NOS em plaquetas

A produção basal de L-citrulina plaquetária, $\text{pmol}/10^8\text{c\acute{e}ls}$, foi similar entre os três grupos (Obesidade: 0.16 ± 0.03 , $n=10$; SM: 0.12 ± 0.02 , $n=10$; e Controles: 0.17 ± 0.04 , $n=10$) (Figura 27).

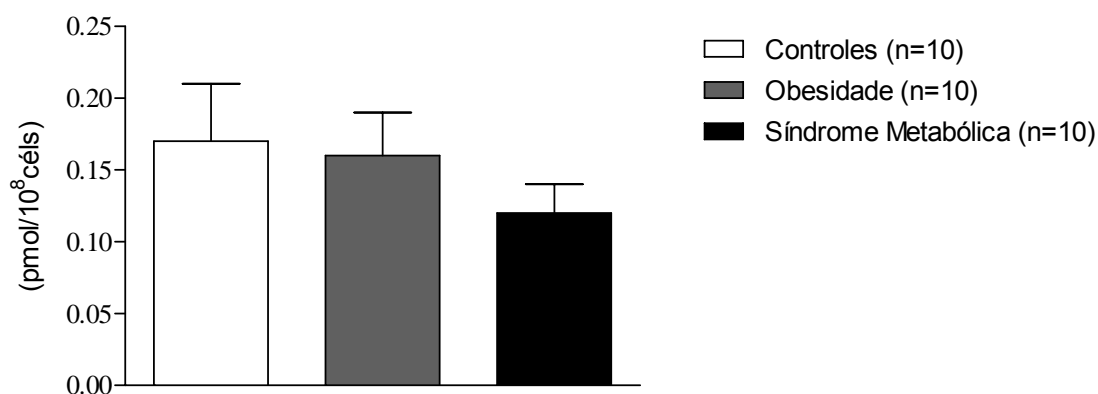


Figura 27. Produção de L-citrulina em plaquetas de controles e pacientes com SM e obesidade.

4.2.5 Concentração intraplaquetária de GMPc

Não houve diferença significativa na concentração plaquetária basal de GMP cíclico entre os três grupos (Controles: 0.19 ± 0.03 ; Obesidade: 0.15 ± 0.02 ; SM: 0.12 ± 0.02) (Figura 28).

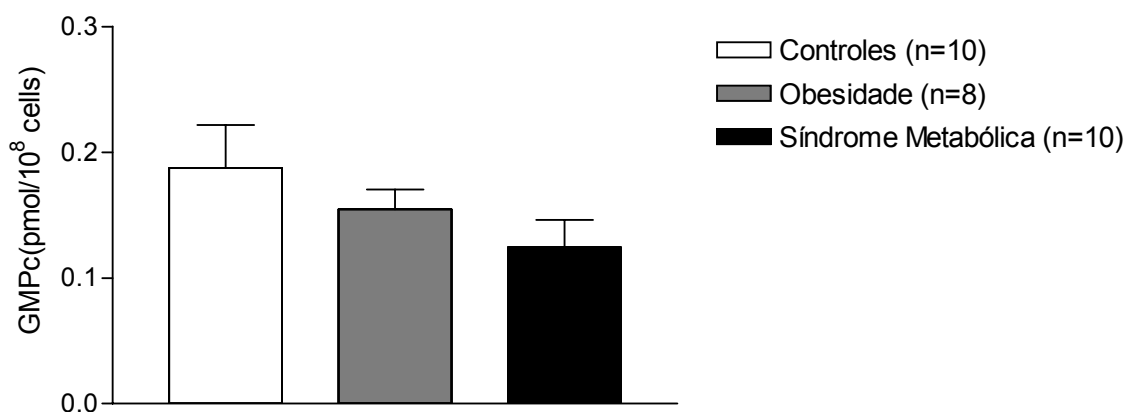


Figura 28. Concentração intraplaquetária de GMPc de controles e pacientes com SM e obesidade.

4.2.6 Agregação plaquetária

A capacidade de agregação de plaquetas isoladas em resposta ao colágeno (2-6 $\mu\text{g/ml}$) mostrou uma dose resposta, mas sem diferença significativa entre os três grupos (Figura 29).

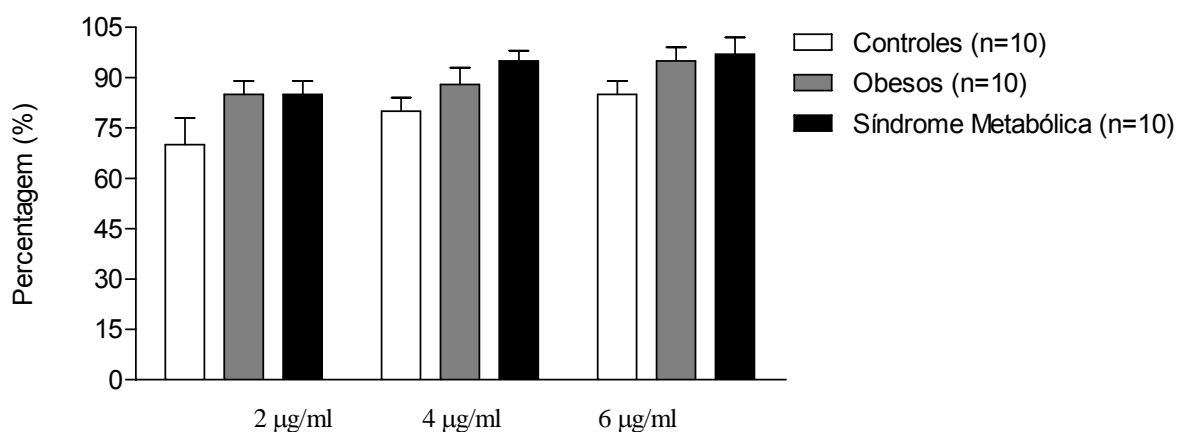


Figura 29. Agregação das plaquetas de controles e dos pacientes com SM e obesidade.

4.2.7 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 (eNOS), e que não houve diferença significativa entre pacientes obesos (1.36 ± 0.08) com SM (1.14 ± 0.18) e controles (0.87 ± 0.01) (Figura 30).

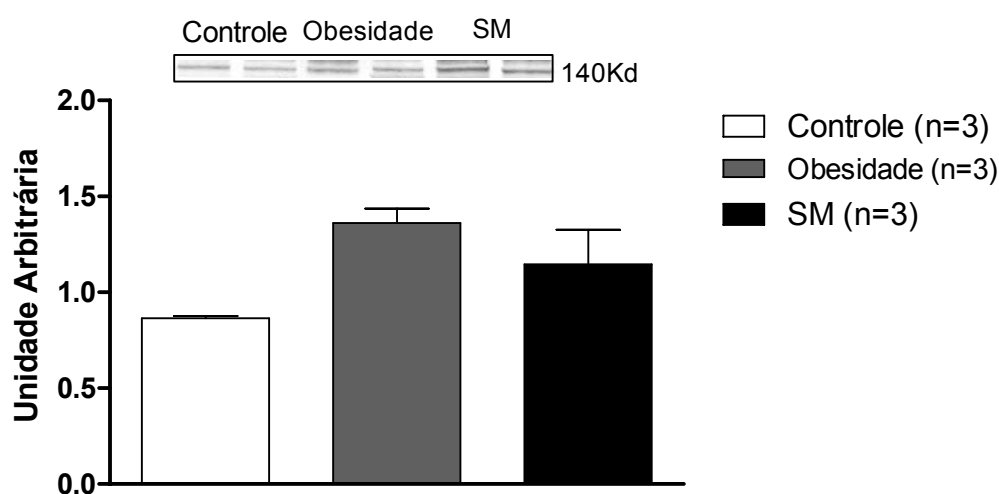


Figura 30. Expressão da NOS endotelial em plaquetas de pacientes obesos e com SM e controles.

O Western Blotting de lisado de plaquetas mostra que as plaquetas humanas expressam a enzima NOS induzível (iNOS) e que, da mesma forma que a eNOS, não houve diferença significativa entre pacientes obesos (0.77 ± 0.05), com SM (0.85 ± 0.15) e controles (0.73 ± 0.17) (Figura 31).

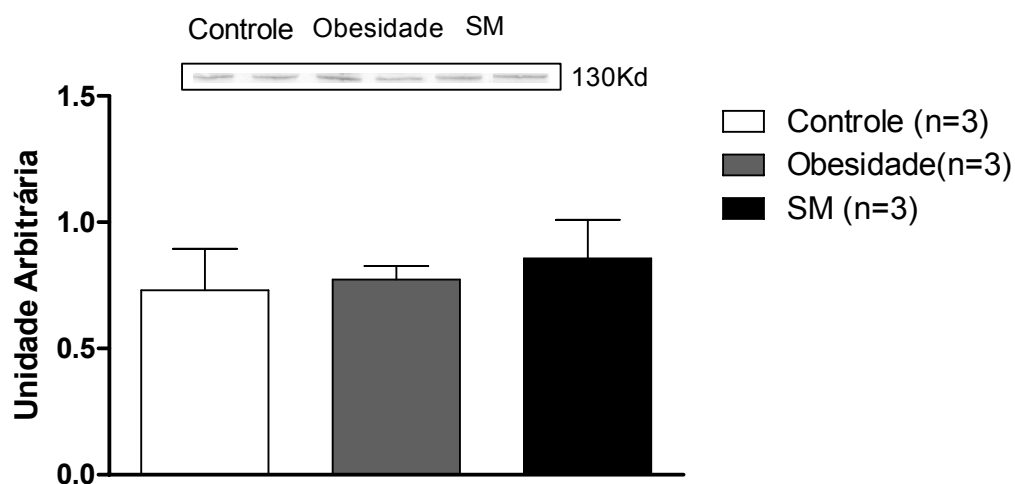


Figura 31. Expressão da NOS induzível em plaquetas de pacientes obesos e com SM e controles.

4.2.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no soro

A formação de TBARS no soro não mostrou diferença significativa entre os pacientes com obesidade ($0.0002605 \pm 6.730e-0050$ nMol/mg de proteína) e SM ($0.0003332 \pm 6,832 e-005$ nMol/mg de proteína), quando comparada aos controles (0.0003684 ± 0.00013730 nMol/mg de proteína) (Figura 32).

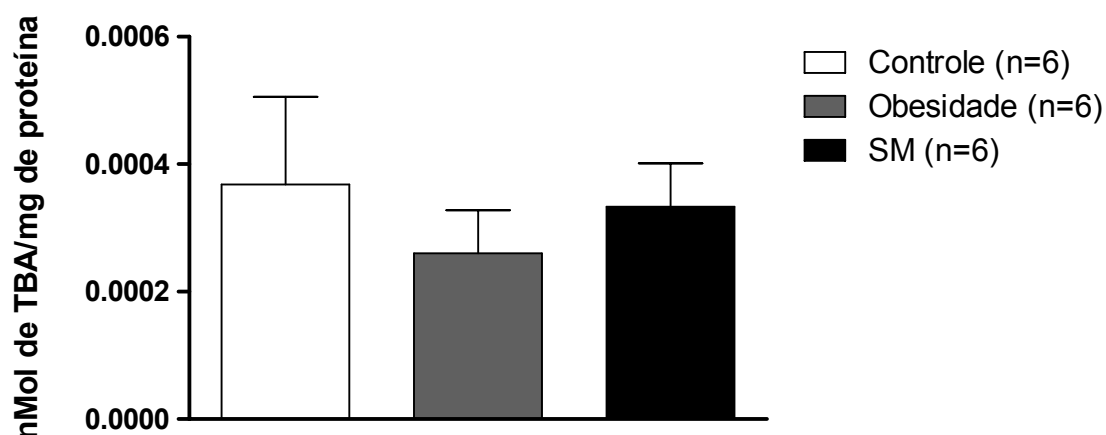


Figura 32. Formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em soro de pacientes obesos e com SM e controles.

4.2.9 Atividade da SOD nas plaquetas

A atividade da SOD, através da mensuração da inibição da auto-oxidação da adrenalina, mostrou diferença significativa nas plaquetas de pacientes com obesidade (4235 ± 613.2 nMol/mg de proteína) quando comparada a SM (1713 ± 267.7 nMol/mg de proteína) e controles (1011 ± 123.6 nMol/mg de proteína) (Figura 33).

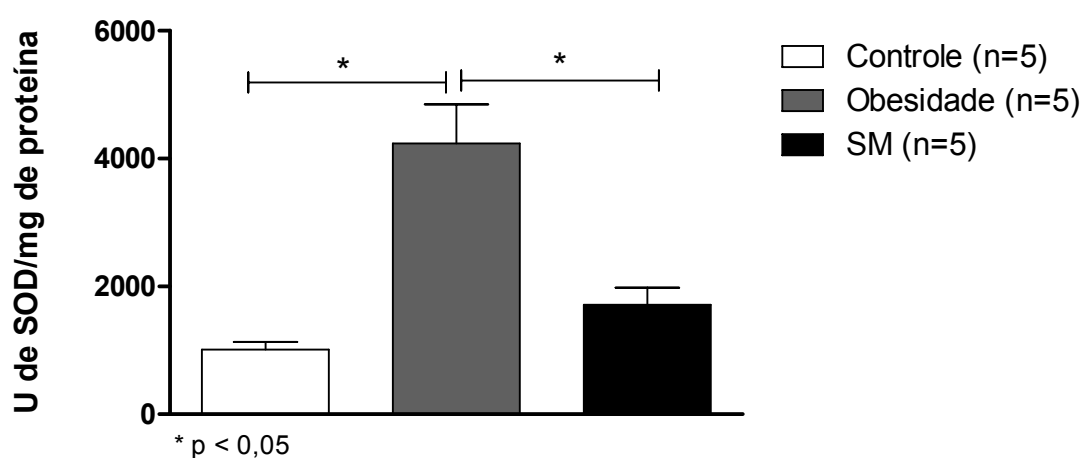


Figura 33. Atividade da SOD em plaquetas de pacientes de pacientes obesos e com SM e controles.

4.2.10 Atividade da SOD no soro

A atividade da SOD, através da mensuração da inibição da auto-oxidação da adrenalina, mostrou diferença significativa em soro de pacientes com obesidade (4235 ± 613.2 nMol/mg de proteína), quando comparada aos controles (1011 ± 123.6 nMol/mg de proteína) (Figura 34).

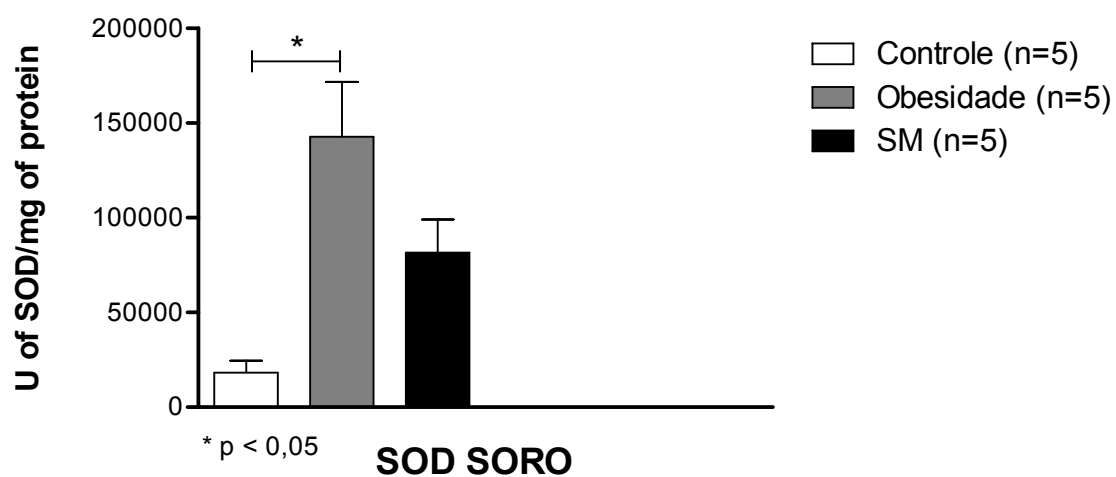


Figura 34. Atividade da SOD em soro de pacientes de pacientes, obesos e com SM e controles.

4.3 Correlações

4.3.1 HDL-C vs influxo de L-arginina via sistema γ^+L

Houve uma correlação positiva do influxo de L-arginina com os níveis de HDL-Colesterol (Figura 35).

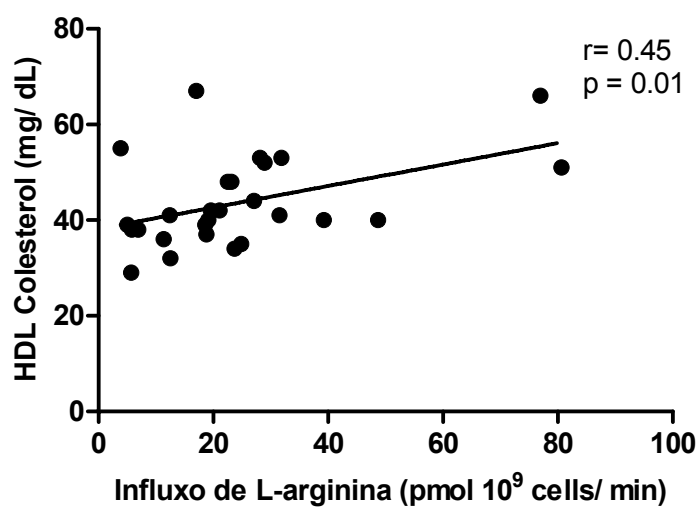


Figura 35. Correlação HDL-C vs influxo de L-arginina.

4.3.2 Correlação da insulina vs influxo de L-arginina via sistema γ^+L

Houve correlação negativa do influxo de L-arginina com os níveis de insulina (Figura 36).

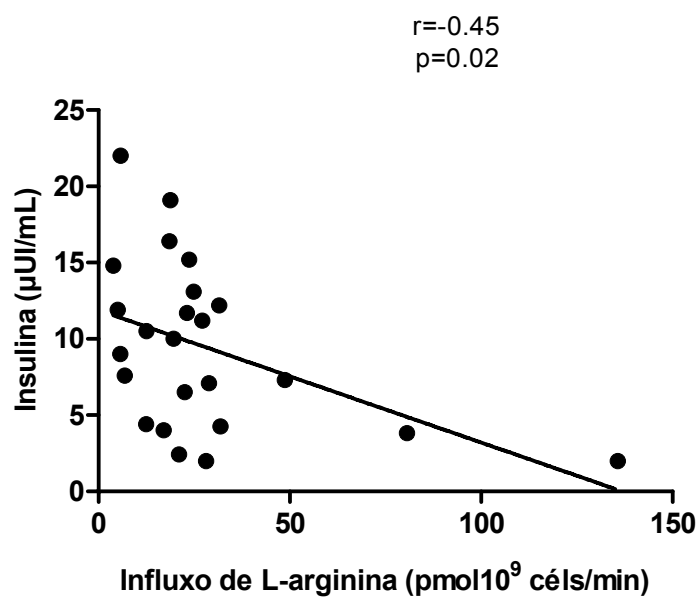


Figura 36. Correlação insulina vs influxo de L-arginina.

4.3.3 Correlação do índice Homa vs influxo de L-arginina via sistema γ^L

Houve uma correlação negativa do influxo de L-arginina com os índices Homa IR, relacionada à RI (Figura 37) e Homa Beta, relacionado à função da célula beta (Figura 38).

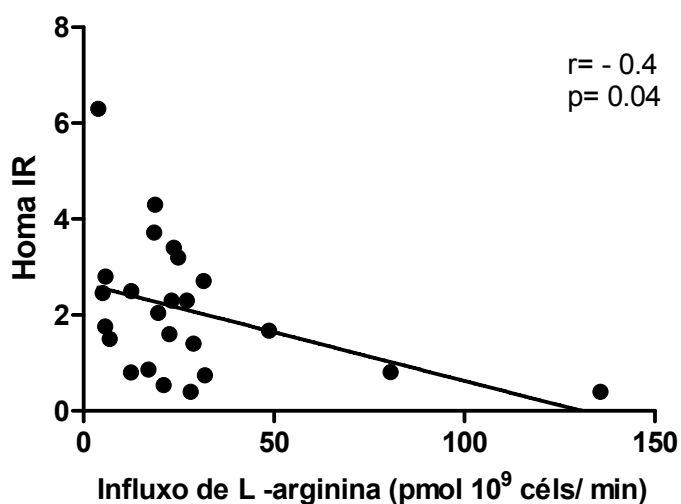


Figura 37. Índice Homa IR vs influxo de L-arginina.

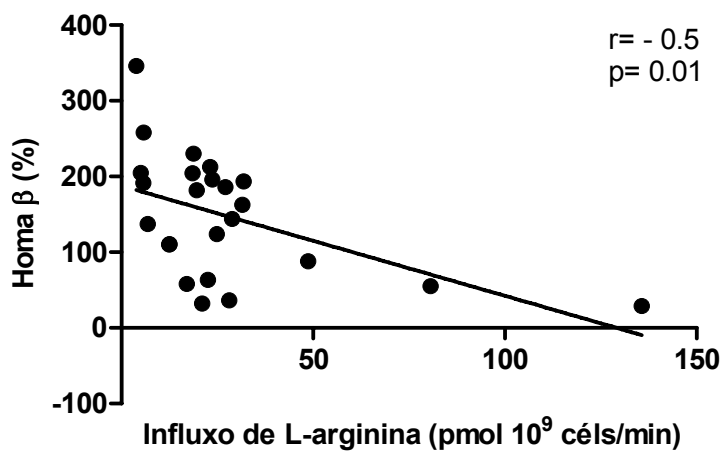


Figura 38. Índice Homa β vs influxo de L-arginina.

4.3.4 Correlação da leptina vs influxo de L-arginina via sistema γ^+L

Correlação negativa entre influxo de L-arginina e os níveis de leptina foi observada (Figura 39).

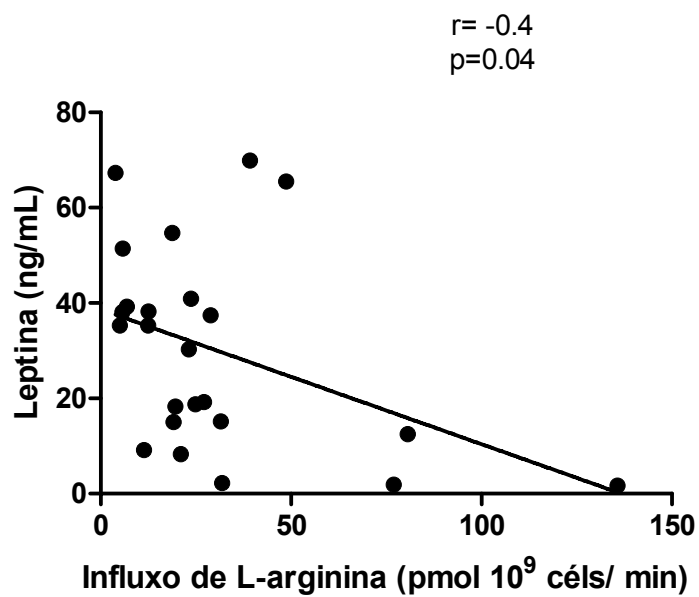


Figura 39. Leptina vs influxo de L-arginina.

5 DISCUSSÃO

Nesta tese foram observadas alterações clínicas e laboratoriais nos pacientes obesos e com SM que reforçam um estado de inflamação subclínica, pró-aterogênica e protrombótica. Levando-se em conta a faixa etária desta população, cuja média de idade foi de aproximadamente 15 anos, devemos atentar para a gravidade das condições de morbidade deste grupo tão jovem e com perspectivas cardiovasculares e metabólicas de pior prognóstico. Serão analisadas e discutidas estas alterações seguindo a ordem da Tabela 1 e Tabela 2.

Os casos de obesidade se confirmaram pelo IMC mais significativo da SM e obesidade em relação aos controles. Em seguida, foi observada alteração da pressão arterial. A pressão arterial sistólica e diastólica observada nos pacientes com SM estava elevada em relação aos controles. Esta alteração pode estar relacionada à RI, hiperatividade do sistema nervoso simpático e alterações de estrutura e função vasculares. Cerca de 30% das crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade podem apresentar hipertensão arterial sistêmica (GOOSSENS et al., 2003).

A hipertensão também pode ser explicada pelo aumento da expressão de endotelina-1 (ET-1), pela expressão dos receptores do sistema renina-angiotensina nos adipócitos viscerais e pela própria obesidade (WILLA et al., 2003).

Os ácidos graxos poli-insaturados tornam as plaquetas mais ativadas e o colesterol a membrana mais rígida, fazendo com que os receptores de plaqueta fiquem mais sensíveis. Portanto o acoplamento dos agonistas plaquetários estimula a fosfolipase a liberar o ácido araquidônico, transformando-o em TXA₂, um lipídeo eicosanóico, potente vasoconstritor, que também pode contribuir para a hipertensão (BATLOUNI, 1999. p. 327-54).

O aumento da cintura, quadril e relação cintura/quadril decorrem provavelmente do aumento de gordura abdominal e visceral. As adipocitocinas liberadas pelos adipócitos destes tecidos, principalmente o TNF-alfa, agrava a RI. O TNF- α compromete a via de sinalização da insulina, pois inibe a captação de glicose e leva a: um aumento na expressão da forma induzida da NOS no músculo; uma redução na meia-vida do mRNA da eNOS; e aumento na produção de superóxido

pelo NADPH oxidase vascular. No vaso, o TNF- α reduz a biodisponibilidade do NO em cultura de células endoteliais e impede a vasodilatação endotélio-dependente (BAHIA et al., 2006). Agravando ainda o quadro, há de se destacar o papel das outras citocinas pró-inflamatórias, secretadas pelo próprio tecido adiposo, como a IL-6, que também diminui a sinalização insulínica, e o PAI-1, na atividade inflamatória vascular, predispondo à formação de estrias e placas ateromatosas. Em contraste, adiponectina tem uma relação inversa com a obesidade, inflamação e RI (FONSECA ALANIZ et al., 2006).

Na análise dos dados laboratoriais desta tese com relação aos marcadores inflamatórios, observou-se aumento: dos leucócitos no grupo de SM e obesos em relação aos controles, do fibrinogênio e do PCR ultrassensível. Pode-se hipotetizar que o aumento dos marcadores inflamatórios observados está relacionado ao estado subinflamatório crônico da obesidade e SM, agravando o estresse oxidativo, podendo levar ao desacoplamento da NOS.

Os ácidos graxos liberados do tecido adiposo visceral estimulam a produção de ERO, as quais estão associadas a uma redução do transporte de glicose estimulado pela insulina e aos danos em órgãos-alvo, tais como as relacionados com o DM e a DAC. A inflamação medida pela PCR tem demonstrado ser um componente integral do processo aterosclerótico e da RI (SINAIKO et al., 2005).

O ácido úrico estava elevado nos pacientes com SM, o que pode estar relacionado à RI, segundo FACCHINI et al. 1991. Esta associação é explicada pela hiperinsulinemia, que, possivelmente, diminui a excreção renal de ácido úrico.

Alguns estudos mostram que níveis elevados de triglicéridios estão mais relacionados com a hiperuricemia, por um aumento do requerimento de NADPH para a síntese de novo de ácidos graxos (CLAUSEN et al., 1998).

A obesidade em adolescentes pode desencadear o estresse oxidativo com aumento da produção de superóxido (GRUBER et al., 2008). Segundo Guido et al. (2002) o aumento da oferta de ácidos graxos livres circulantes, o estresse oxidativo, a hipertensão arterial e o aumento de moléculas de LDL pequenas e densas são alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na menor oferta de NO decorrente da RI. Portanto, a elevada ingestão de dietas ricas em gorduras, em especial as saturadas, como se observa atualmente na juventude (tem uma base alimentar em *Fast Food*), reforça as observações anteriores e a hipótese de Barker, pois nos

países em desenvolvimento, há concomitância entre a desnutrição e obesidade, logo a deficiência na oxidação dos lipídeos pós-prandial. Este estado dislipidêmico pode comprometer a fluidez da membrana plasmática incluindo a plaquetária. A estabilidade da membrana plasmática deve ser mantida, uma vez que permite o arranjo tridimensional adequado dos receptores e carreadores, assim como a ação de alguns lipídios. Como já mencionado, os ácidos graxos poli-insaturados (diferentemente dos saturados que causa certa rigidez na membrana), através de suas duplas ligações, deixam a membrana mais fluida possibilitando ligações eficientes, facilitando a troca de substâncias entre o meio intra e extracelular. A vitamina E é capaz de proteger as moléculas de LDL-colesterol do processo de oxidação em humanos e o uso de óleo de peixe melhorou a função endotelial agudamente em indivíduos com hipercolesterolemia (CHIN et al., 1996), diminuindo a lipotoxicidade presente nos estados de insulino-resistência.

O aumento de VLDLs e triglicéridios, a redução do HDL-colesterol e o LDL-colesterol rico em partículas pequenas e densas constituem um perfil lipídico bastante aterogênico. Alterações na fluidez de membranas de plaquetas associadas ao LDL circulante foram recentemente descritas na obesidade (RAFFAELLI et al., 2009).

Os resultados desta tese demonstram, pela primeira vez, que o transporte de L-arginina via sistema γ^+L está inibido em pacientes adolescentes com obesidade e síndrome metabólica, comparados aos controles. No grupo geral de pacientes deste estudo, houve uma correlação positiva entre o transporte de L-arginina através do sistema γ^+L e circulação de lipoproteínas de alta densidade (HDL) antiaterogênicas. Um clássico estudo demonstrou que o HDL-colesterol diminui a função das plaquetas porque aumenta a atividade da NOS (MEHTA et al., 1995). Além disso, a HDL transporta o excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado para a sua excreção e inibe a oxidação do colesterol LDL. De acordo com o nosso conhecimento, não há nenhum estudo que prove um efeito direto do HDL-colesterol no sistema de transporte γ^+L . Uma possibilidade é de os níveis elevados de colesterol HDL participem do colesterol da membrana, com preservação biomecânica que, por sua vez, modula os transportadores de aminoácidos nas plaquetas e células do sangue.

A magnitude do efeito do colesterol na rigidez celular induzida por alterações na membrana pode levar a alterações do transporte do aminoácido catiônico L-arginina, precursor da síntese de NO, incluindo o sistema γ^+L (PETNEHAZY et al., 2006).

Devido à particular composição lipídica da cavéola, é possível propor que a conhecida associação entre hipercolesterolemia e disfunção endotelial, possa envolver uma alteração da fisiologia dessa estrutura. Portanto, a diminuição do HDL observado nos nossos pacientes, pode dificultar a troca e favorecer uma maior alteração nas cavéolas, diminuindo a expressão e a atividade da eNOs. Por outro lado, a exposição ao estresse oxidativo ou às lipoproteínas oxidadas, leva à redução do número de cavéolas, bem como da associação da eNOS com as mesmas, ocasionando uma menor produção de NO. É possível que uma diminuição da atividade do transporte de L-arginina em plaquetas através do sistema γ^+L observada limite a produção de NO em plaquetas. A ausência de alterações na atividade da NOS e na expressão da eNOS e iNOS, talvez seja por uma questão de tempo, já que os pacientes ainda são jovens.

As alterações hepáticas que acompanham a obesidade são decorrentes de mecanismos combinados, que envolvem a RI e o estresse oxidativo. Observa-se desde a infiltração gordurosa no fígado, que pode progredir e evoluir para esteatoepatite (20% dos casos) e cirrose hepática (2% dos casos). O padrão-ouro de diagnóstico da lesão hepática é a biópsia. No grupo de pacientes (SM e obesos), encontramos alterações relacionadas ao GGT.

A insulinemia e o HOMA estavam alterados em ambos os grupos de pacientes. O índice HOMA-IR vem sendo utilizado para avaliação de resistência insulínica com bons resultados. Possui boa correlação com o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico e com a insulinemia de jejum (MATTHEWS et al., 1985). Também é de fácil realização, pois é calculado por meio de uma fórmula cujas variáveis são a insulinemia e a glicemia de jejum. No grupo de pacientes do presente estudo, tanto o HOMA IR quanto o HOMA Beta se correlacionaram negativamente com o transporte de L-arginina.

Além da RI, a hiperinsulinemia compensatória também se correlacionou negativamente com o influxo de L-arginina. Mann et al. (2003) observaram que os efeitos hormonais sobre o transporte de aminoácidos têm sido extensivamente

revisados para uma variedade de células . A insulina é conhecido por ser capaz de aumentar a captação de L-arginina através de outro sistema de transporte, o y^+ (mCAT-1), e também eleva a produção de NO em culturas primárias na veia umbilical de células endoteliais humanas e das glândulas gástricas (SOBREVIA et al., 1997).

A expressão do receptor de insulina em plaquetas e a exposição da proteína de membrana na superfície de plaquetas não foram conclusivamente demonstradas. Apesar de a insulina radiomarcada pelo 125 I(iodo) ligar-se à membrana plasmática de plaquetas com ~ 570 sítios de ligação por célula, a existência de um receptor de insulina funcionalmente ativo em plaquetas permanece obscura (HAJEK et al., 1979). Como a meia-vida das plaquetas é de cerca de 7 dias, é difícil entender como uma ação hormonal direta sobre as plaquetas pode levar a um estado pró-trombótico (RAUCHFUSS et al., 2008).

É mais provável que a insulina ou os precursores da RI modulem a adesão das plaquetas através das células endoteliais, ao invés de uma ação direta sobre plaquetas. Mais estudos devem ser realizados para determinar os mecanismos exatos da insulina nos transportadores de membranas e plaquetas.

Neste estudo, os níveis circulantes de L-arginina por medições de HPLC, não foram afetados pelas condições patológicas da obesidade e SM. Em uma observação anterior realizada por Gruber et al. (2008), foi evidenciado aumento dos níveis plasmáticos de L-arginina em pacientes adolescentes obesos, mas no presente estudo avaliamos também a SM.

Os rins, juntamente com a ingestão dietética (1-2 g / dia), são responsáveis por manter os níveis plasmáticos normais da L-arginina (BRUNINI et al., 2007). Os mecanismos exatos da controvérsia em torno dos níveis plasmáticos de L-arginina na obesidade poderiam resultar de vários fatores, como dieta, grau de obesidade e o envolvimento da L-arginina em outras vias metabólicas.

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 no estudo de pacientes com AN realizados no nosso laboratório (PEREIRA et al., 2010). Esta baixa concentração de L-arginina pode ser decorrente da baixa ingestão alimentar ou do 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. No entanto, não houve diferença significativa na dosagem do aminoácido L-arginina entre os controles e pacientes com SM e obesidade.

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 (LOSCALZO, 2001; MAXWELL, 2000; BRUNINI et al., 2003). (BRUNINI et al., 2007; MANN; YUDILEVICH; SOBREVIA, 2003), situação esta descrita anteriormente como “paradoxo da via L-arginina-NO”. Um trabalho realizado em nosso laboratório comprovou que o transporte de L-arginina em plaquetas humanas é realizado por um sistema de transporte de baixa capacidade e elevada afinidade [Constante de Michaelis-Menten (K_m) \cong 10 μ M] para aminoácidos catiônicos e que também transportava aminoácidos neutros com elevada afinidade na presença de Na^+ ($K_m \cong 10 \mu\text{M}$), via sistema y^+L (MENDES RIBEIRO et al., 1999). Os exatos mecanismos envolvidos na regulação do sistema y^+L na obesidade e SM não são claros. É possível que essas patologias induzam mudanças na afinidade do sistema y^+L pelo substrato, L-arginina, ou na expressão desse transportador em plaquetas. Outra hipótese é que a concentração aumentada na circulação de análogos da L-arginina na hipertensão, um dos componentes da SM, já descrita em estudos prévios participe dessa inibição (SYDOW et al., 2005; EID et al., 2004). Em um outro trabalho, nosso grupo demonstrou que a inibição do transporte de L-arginina em plaquetas por ambos, L-NMMA e ADMA, é mais eficiente em pacientes hipertensos do que em controles (BRUNINI et al., 2004).

Redução do transporte de L-arginina ocorre sob condições de depleção intraplaquetária de aminoácidos (*zero-trans*) (CHILLARÓN et al., 1996; SIQUEIRA et al., 2007). No entanto futuros estudos são necessários para quantificar a concentração de aminoácidos intraplaquetários na obesidade e SM.

Há evidências de que as concentrações plasmáticas de arginina estejam marcadamente reduzidas em animais e em pacientes diabéticos, provavelmente devido à diminuição da síntese endógena e ao catabolismo aumentado por tecidos extraintestinais. Quando tanto arginina e BH_4 são deficientes (por exemplo, sob condições de diabetes e estresse oxidativo), a redução enzimática do oxigênio molecular pela eNOS não é mais ligada à L-arginina e a oxidação da eNOS produz

quantidades relativamente grandes de superóxido. Este reage com o NO e forma peroxinitrito, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade de NO. Inversamente, quando arginina e BH₄ são abundantes, a eNOS continua associada à oxidação de L-arginina e NO é sintetizado, enquanto a produção de ERO é inibida. Elevadas concentrações extracelulares de arginina impedem a formação de superóxido, reduz o estresse oxidativo e melhora a RI em pacientes com DM2. Além disso, o aumento de BH₄ no endotélio e o aumento da síntese de NO através da suplementação dietética com L-arginina ou suco de melancia (que contém altos níveis de L-citrulina, precursora eficaz de L-arginina) reduziu a adiposidade, bem como as concentrações plasmáticas de glicose e triglicérides. Além disso, estudos recentes com suínos (um excelente modelo para estudar a função vascular humana) revelaram que, a longo prazo, a suplementação dietética com L-arginina reduziu toda a gordura corporal, aumentou o ganho de músculo esquelético e melhorou o perfil metabólico (WU et al., 2007; WU; MEININGER, 2009).

O GMPc intraplaquetário e agregação plaquetária não foram alterados nos pacientes, comparados aos controle. Apesar de existir uma elevação dose-resposta em relação ao gráfico da agregação, não foi estatisticamente significativo.

A peroxidacao lipídica estava inalterada no soro, porém a linha de defesa SOD plaquetária e do soro estavam aumentadas, demonstrando talvez um primeiro estágio de defesa do organismo contra os fatores já descritos da obesidade. Estudo em nosso laboratório demonstrou atividade da SOD, reduzida nas plaquetas de pacientes com anorexia nervosa (AN) em relação aos controles (PEREIRA et al., 2010). Podemos concluir que em condições extremas de subnutrição existe o comprometimento do sistema antioxidante de defesa.

A leptina é uma proteína codificada pelo gene obesidade (*ob*) e secretada pelos adipócitos. Sua secreção é sensível tanto ao balanço energético quanto à quantidade de massa gorda. Ela age pela ativação dos seus receptores situados no plexo coróide e no hipotálamo, inibindo a ingestão alimentar e estimulando o gasto energético (KONSTANTINIDES et al., 2001).

Curiosamente, a forma longa do receptor de leptina foi detectada em plaquetas humanas e altas concentrações de leptina agem sinergicamente com ADP para promover agregação plaquetária *in vitro*. Estas observações aumentam a possibilidade de que a leptina também possa promover trombose e contribuir para

distúrbios do equilíbrio hemostático na obesidade (NAKATA et al., 1999). A leptina foi considerada, em um grande estudo prospectivo, um fator de risco independente para doença cardiovascular (WALLACE, et al., 2001).

Com relação à sinalização celular, descrita anteriormente (LUZ, 2005 p. 269 e 270), os receptores de insulina pertencem à família tirosinoquinase, logo a ativação da via AKT libera o NO, exercendo ação antiaterogênica; enquanto que um defeito na autofosforilação da tirosina levará a ativação da segunda via que é da proteína ras-MAPK, que, ao contrário da anterior, promove aterogênese.

Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina estimula a via MAPK, que é de importância na disfunção sistêmica porque provoca defeito tanto na captação de glicose quanto na vasodilatação dependente do endotélio mediada por insulina. Esta via, portanto, regula a produção do NO dependente do endotélio, logo o defeito na captação de glicose leva a um defeito no estímulo da vasodilatação endotelial estimulado pela insulina. A via da MAPK é importante para as ações proliferativas da insulina. Entretanto, na vasculatura, essa via medeia não somente o crescimento celular, mas também a capacidade migratória das células endoteliais, do músculo liso vascular e dos monócitos (GUIDO et al., 2002).

No tecido adiposo, os ácidos graxos livres estimulam a via mitogênica MAPK, que estimula a PKC. Os receptores tipo 3 tirosinoquinases (via de fosforilação) estão presentes nas células endoteliais e plaquetas.

A PKC em plaquetas estimula glicoproteínas IIa/IIIb e, conseqüentemente, estimula a agregação plaquetária .

A via PKC ativada leva a um retardo do relaxamento vascular induzido pela acetilcolina, aumentando a permeabilidade vascular à albumina, a expressão do fator de crescimento vascular do endotélio (VEGF) (microvascularização da retina) e proliferação mesangial. Os produtos finais de glicação avançada (AGES) também estimulam a PKC (GUIDO et al., 2002).

A disfunção endotelial ocasionada pela hiperinsulinemia também pode decorrer do estresse oxidativo, pois a insulina pode ativar os sistemas nitrérgicos e endotelinérgicos, como também induzir o aumento de ET-1, elevando a expressão da NADPH oxidase, com geração do ânion superóxido (GUIDO et al., 2002).

Os efeitos metabólicos da adiponectina incluem aumento na sensibilidade à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, mediados por aumentada oxidação de

gordura nos tecidos. Existe forte evidência de que a sinalização para adiponectina nesses tecidos seja através da via AMPK a qual representa um sistema regulador metabólico que funciona em paralelo à sinalização para insulina (KAHN et al., 2005).

No DM, não está claro se a hiperatividade plaquetária decorre dos efeitos deletérios diretos da insulina sobre a plaqueta e/ou dos originados nas células endoteliais. A intervenção terapêutica com a metformina promove efeitos vasculares diretos através da ativação da enzima AMP-quinase (AMPK) nas células endoteliais, promovendo oxidação de ácidos graxos e diminuindo a lipotoxicidade presente nos estados de insulino-resistência (DORMANDY et al; 2005).

A adesão, ativação e agregação plaquetárias podem estar relacionadas à produção do NO estimulada pelas tradicionais vias GMPc-dependentes, onde principal via de atuação do NO, é originado a partir de 5´trifosfato de guanosina (GTP) pela ação da GCs(guanilato ciclase solúvel) no citosol, dependente do transporte de L-arginina; ou pela via não-tradicional (menos caracterizada, por exemplo, NO, por meio desse mecanismo independente de GMPc, pode ativar a ADP ribosiltransferase e inibir a mobilização de Ca^{++} no interior das plaquetas (EGBRINK et al., 2005).

Na avaliação do grupo de obesos e SM, a ausência de correlação entre elevados níveis de glicose e sistema γ^+L em plaquetas não foi surpreendente porque, em estudo cinético prévio, nosso grupo evidenciou que o sistema γ^+L não foi afetado (SIQUEIRA et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- 1- O transporte de L-arginina encontra-se diminuído nas plaquetas dos pacientes adolescentes com obesidade e SM;
- 2- O sistema de defesa antioxidante representado pela SOD nas plaquetas estava aumentado em pacientes adolescentes com obesidade quando comparado a SM e controles e no soro também estava aumentado nos obesos comparados ao controle.

3- Existe uma correlação positiva do influxo de L-arginina e os níveis de HDL-colesterol;

4- Há uma correlação negativa do influxo de L-arginina e níveis de insulina, e índice de HOMA IR e HOMA BETA.

A partir dessas conclusões, podemos sugerir que a inibição do transporte de L-arginina na obesidade e SM correlaciona-se negativamente com a RI e a hiperinsulinemia, sem afetar a produção de NO e a função plaquetária. Um conhecimento mais detalhado dos mecanismos subjacentes à regulação do sistema y^+L pode fornecer o surgimento de novas estratégias terapêuticas para a obesidade e SM em pacientes adolescentes e prevenir a hiper-reatividade plaquetária e eventos cardiovasculares na fase adulta.

Como transporte de L-arginina extracelular é essencial para a produção de NO em plaquetas, a redução do transporte desse aminoácido observada no presente estudo pode ser um marcador precoce da disfunção da via L-arginina-NO em plaquetas de pacientes adolescentes obesos e com SM.

Finalizando, é necessário interromper o processo de obesidade e SM nas crianças e adolescentes, pois o início da doença cardiovascular possui mecanismos operantes desde a infância.

7 REFERÊNCIAS

ACHARYA, J. et al. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron Deficiency. **European Journal Haematology**, v. 47, p. 287-91, 1991.

ALANIZ, F. M. H. et al. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, v.83, n.5, 2007.

ALATORRE, E.O.B.Estrutura e função dos microdomínios de membrana. **Tese de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade de Colima** ,Out 2004

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Rio de Janeiro: Artes Médicas, 4ª Ed. 2004.

American Diabetes Association. Conference development on in insulin resistance. **Diabetes Care**, v.21, n.2, p.310-4, 1998.

ANDERSON, J.B. The status of adolescent nutrition. **Nutrition Today**, v.26, p.7-10, 1991.

ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5, p. 447-53, 2004.

ANJOS, LA. et al. Crescimento e estado nutricional em amostra probabilística de escolares no Município do Rio de Janeiro, 1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 171-179, 2003.

ARCHER S.L. et al. Nitric oxid and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by dGMP-dependent protein kinase. **Proceeding National Academy Science**, v.91, p.7583-7587, 1994.

ASSUMPÇÃO, C.R. et al. Impact of the L-Arginine-Nitric oxide pathway and oxidative stress on the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Biochemistry Journal**, v. 2, p. 100-107, 2008.

BAHIA, L. et al. Endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p.291-303, 2006

BALABAN, G.; SILVA, G.A.P.. Prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes de uma escola da redeprivada de Recife. **Jornal de Pediatria**, v. 77, p. 96-100, 2001.

BAO W. ; SRINIVASAN S.R.; BERENSON G.S. Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. **Circulation**, v. 93, p.54-59, 1996.

BARBUL, A. Arginine: biochemistry, physiology and therapeutic implications. **Journal Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 10, p.227-38, 1985.

BARKER, D.J.P.. Fetal and infant origins of adult disease. **Monatsschr Kinderheilkd**, 149; 52-560, 2001.

BARRETO, A.C.N.G.; BRASIL, L.M.P.; MARANHÃO, H.S.. Sobre peso: uma nova realidade no estado nutricional de pré-escolares de Natal, RN. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 4, p. 311-6, 2007.

BATLOUNI, M. Antiplaquetários. In:_____. **Farmacologia e terapêutica cardiovascular**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 327-54.

BELLÓ, A.. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Porto Alegre: Ulbra, 2002. p. 15-19.

BÖGER, R.H. et al. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the 'l-arginine paradox' and acts as a novel cardiovascular risk factor. **Journal of Nutrition**, v.134, Supl., p. 2842-2847, 2004.

_____. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. **Chemistry Laboratory Clinical Medicine**, v.43, n.10, p.1124-1129, 2005.

BOGLE, R.G. et al. Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. **Journal Physiology**, v. 490, p.229-241, 1996.

BONADONNA, R. et al. Obesity and insulin resistance in humans: A dose response study. **Metabolism**, v.39, n.452-459, 1990.

BOPP, M.; BARBIERO, S. Prevalence of metabolic syndrome in outpatients of the institute of cardiology of Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.93, n.5, p.473-7, 2009.

BRASIL, L.M.P.; FISBERG M.; MARANHÃO, H.S. Excesso de peso de escolares em região do Nordeste brasileiro: contraste entre as redes de ensino pública e privada. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 4, p. 405-412, 2007.

BRETT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic Messenger molecule. **Annual Review Biochemistry**, v. 63, p. 175-95, 1994.

BRUNINI, T.M.C. et al. Inhibition of L-arginine transport in platelets by ADMA and L-NMMA: effects of arterial hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, p.738-40, 2004.

_____. Inhibition of L-arginine transport in platelets by ADMA and L-NMMA: effects of arterial hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, p.738-40, 2004.

_____. L-arginine-availability as a pathological mechanism in essential hypertension, chronic renal and HF. **Vascular Disease Prevention**, v.2, p. 37-51, 2005.

_____. Activation of L-arginine transport in undialysed chronic renal failure and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**. V. 33, n.1-2, p.114-8, 2006.

_____. Nitric oxide, malnutrition and chronic renal failure. **Cardiovascular Hematological Agents Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 155-161, 2007.

_____. Platelet nitric oxide synthesis and activation in uremia and malnutrition: a role for L-arginine supplementation in vascular protection? **Cardiovascular Research**, v.73, n.2, p. 359–367, 2007.

BUSTAMANTE, J.; CZERNICZYNIEC, A.; LOREZ-ARNAIZ, S. Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. **Frontiers Bioscience**, v. 12, p.1034-1040, 2007.

CARR, A.C.; MCCALL, M.R.F.B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 2000;20:1716-1723.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CERSOSIMO, E.; DeFRONZO, R. A. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular disease. **Diabetes Metabolism Research Reviews**, v.22, n.6, p.423-36, 2006.

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 Jul; 32(1): 57-61.

CHICOINE, L.G, et al.Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. **American Journal Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.287,L60-L68., 2004

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. **Journal Biological Chemistry**, v.271, n.30, p17761-17770, 1996.

CHIN, J.P.; DART, A.M. Therapeutic restoration of endothelial function in hypercholesterolemic subjects: effects of fish oils. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**, v. 21, n 10, p.749-55, 1994.

CHOI, J.W. et al. Increases in Nitric Oxide Concentrations Correlate Strongly with Body Fat in Obese Humans. **Clinical Chemistry**, v.47, n.6, 2001.

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. **Biochimica Biophysica Acta**, v.298, n.4, p.932-950, 1973.

CLAUSEN, J.O. Et al. Analysis of the relationship between fasting serum uric acid and the insulin sensitivity index in a population-based sample of 380 young healthy Caucasians. **European Journal Endocrinology**, v.138, p. 63 -9, 1998.

CLOSS, E.I. et al. Plasma membrane transporters for arginine. **Journal Nutrition**, v.134, n.10, p. 2752-2759, 2765-2767, 2004.

COHEN, R.A.The potential clinical impact of 20 years of nitric oxide research **Am J Physiol.** 1999 Apr;276(4 Pt 2):H1404-7.

COLE TJ, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. **British Medical Journal**, v.320, p.1240-3, 2000.

CONDE, W.L.; MONTEIRO, C. A. Body mass index cutoff points for evaluation of nutritional status in Brazilian children & adolescents. **Jornal de Pediatria**, v.82, p.266-72, 2006.

COOK, S. et al. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Archives Pediatric Adolescents Medicine**, v.157, p.821-827, 2003.

COSTA, R. F.; CINTRA, I. P.; FISBERG, M.. Prevalência de sobrepeso e obesidade em escolares da cidade de Santos, SP. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n.1, p. 60-67, 2006.

COUTINHO, J.C.;GENTIL,P.C.;TORAL,N.Malnutrition and obesity in Brazil:dealing with the problem throug a unified nutritional agenda.**Cad Saúde Pública**,24 Suppl 2:S332-40,2008

CRUZ, M. L. et al. The metabolic syndrome in overweight hispanic youth and the role of insulin sensitivity. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 89, p. 108-113, 2004.

CYLWIK, D.; MOGIELNICKI, A.; BUCZKO, W. L-arginine and cardiovascular system. **Pharmacology Rep.**, v.57, p.14-22, 2005.

DAHL, S.G.; SYLTE, I. RAVNA, A. W. Structures and models of transporter proteins. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v.309, n.3, p. 853-60, 2004.

DAVÌ, G.; PATRONO, C.Platelet activation and atherothrombosis.**N Engl J Med.** 2007 Dec 13;357(24):2482 94

DE NIGRIS, F. et al. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. **Nitric Oxide**, v.17, n.1, p. 50-54, 2007

DeFRONZO, R.A.; Tobin, J.D.; Andres R. Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. **American Journal Physiology**, v.237, n.3, E214, 223, 1979.

DELL'OMO, G. et al. Chlorthalidone improves endothelial-mediated vascular responses in hypertension complicated by nondiabetic metabolic syndrome. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**. 2005 Dec;10(4):265-72

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.

DERBYSHIRE, E. R. et al.Characterization of Two Different Five-Coordinate Soluble Guanylate Cyclase Ferrous-Nitrosyl Complexes. **Biochemistry**, v.47, p. 3892-3899, 2008.

DEVÉS, R.; BOYD, C.A.. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. **Physiological Reviews**, v.78, p.487-545, 1998.

DIETZ, W.H.; ROBINSON, T.N. Use of the body mass index (BMI) as a measure of overweight in children and adolescents. **Journal of Pediatric**, v.132, p.191-3, 1998.

DORMANDY, J.A. et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomized controlled trial. **Lancet**, v.366, p.1279-89, 2005.

DRAPER, H.H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic. Biol. Med.**; 15: 353–363,1993.

DUDZINSKI, D.M. et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.46, p.235-276, 2006.

DURSUN, E. et al. Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. **Acta Diabetológica**, v. 42, n. 3, p. 123-128, 2005.

DUSSERRE, E. et al. ω -3 Fatty acids in smooth muscle cell phospholipids increase membrane cholesterol efflux. **Lipids**, v. 30, p. 35-41, 1995.1995.

ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v.365, n.9468, p. 1415-1428, 2005.

EGBRINK, O. et al. Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. **Microcirculation**, v. 12, n. 3, p. 287-300, 2005.

EID, H.M. et al. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. **Metabolism**, v. 53, n.12, p.1574-9, 2004.

EJERBLAD, E. et al. Obesity and risk for chronic renal failure. **Journal of the American Society Nephrology**, v.17, n. 6, p.1965-1702, 2006.

ELFERING, S.L.; SARKELA, T.M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. **Journal Biologic Chemistry**, v. 277, p. 38079-38086, 2002.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signaling molecule in the nervous system. **British Journal Pharmacology**, v. 135, p.1079-1095, 2002.

EVERSON, W.V.; SMART, E.J. Influence of caveolin, cholesterol, and lipoproteins on nitric oxide synthase: implications for vascular disease. **Trends Cardiovasc Med**. 2001 Aug;11(6):246-50.

FACCHINI, F. S. et al. Relationship between resistance to insulin-mediated glucose uptake urinary uric acid clearance, and plasma uric acid concentration. **JAMA**, v. 266, p. 3008-11, 1991.

FEATHERSTON, W.R.; ROGERS, Q.R.; FREELAND, R.A. Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. **American Journal Physiology**, v. 224, p.127-129, 1973.

FEENER E. P.; DZAU, V. J Pathogenesis of cardiovascular disease in diabetes. In: JOSLIN EP. **Joslin's diabetes mellitus**. 14.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2005. p. 867-884.

FERREIRA, H. S. et al. Hipertensão, obesidade abdominal e baixa estatura: aspectos da transição nutricional em uma população favelada. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 209-218, 2005.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo **Rev. Assoc. Med. Bras**. vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997

FLEMING, I.; BUSSE R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 532-41, 1999.

FLORÊNCIO, T.M. et al Obesity and undernutrition in a very-low-income population in the city of Maceió, northeastern Brazil. **Br J Nutr**. Aug;86(2):277-84,2001.

FREEDMAN et al. The Relation of Overweight to Cardiovascular Risk Factors Among Children and Adolescents: The Bogalusa Heart Study; **Pediatrics** Vol. 103 No. 6 June, pp. 1175-1182,1999.

FUJIMOTO, T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. **J Cell Biol.**; 120:1147-57,1993.

FURCHGOTT, R.F. et al. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 6, p.336-343, 1984.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADSKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p. 373-376, 1980.

FURUKAWA, K.;TAWADA, Y.; SHIGEKAWA, M.J. Regulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. **Journal Biological Chemistry**, v. 263, p.8058-8065, 1988.

GALLI C.Lipid lowering drugs and polyunsaturated fatty acids. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. Feb;15(1):3-5,2005.

GARCIA-CARDENA G et al.Dissecting the interaction between nitric oxide synthase(NOS) and caveolina.Functional significance of the nos caveolina binding domain in vivo. **J Biol Chem**. 1997 Oct 10;272(41):25437-40

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase in mitochondria. **FEBS Letters**, v.418, n.3, p.291-296, 1997.

GIULIANO, R.; MELO, A.L.P. Diagnóstico de sobrepeso e obesidade em escolares: utilização do índice de massa corporal segundo padrão internacional. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 129-134, 2004.

GODOY-MATOS, A.F. **Síndrome metabólica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

GONZÁLEZ, R.C.. **Efectos cardiovasculares de isoflavonas em hipertensión genética**. Tese/Dissertação (Doutorado) Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Granada, 2006.

GOOSSENS, G.H. et al. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. **Obesity Reviews**, v.4, n. 3, p.43-55, 2003.

GOYA, K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. **Arteriosclerosis and Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p.658-663, 2004.

GROSS, S.S. Nitric oxide synthases and their cofactors. In: GOLIGORSKY, M.S.; GROSS, S.S. **Nitric oxide and the kidney: physiology and pathophysiology**. New York: Chapman and Hall, 1997. p. 52-65.

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

GUIDO, A. et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. **Circulation**, v. 105, p.576-82, 2002.

HAJEK, A.S. et al. Demonstration and partial characterization of insulin receptors in human platelets. **Journal Clinical Investigation**, v.63, p.1060-1065, 1979.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defence mechanisms. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford, Out; 31(4): 261-72,1999.

HARTWIG, J.H. Platelet structure. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

HIMMSWORTH, H.P. Diabetes Mellitus: Its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. **Lancet**, i127-130, 1936.

HOENICKA, M.; SCHMID, C. Cardiovascular effects of modulators of soluble guanylyl cyclase activity. *Cardiovasc. Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, v. 6, n.4, p.287-301, 2008.

HOFMAN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. **Journal of Cell Science**, v. 113, n.10, p.1671-1676, 2000.

HUBERT, H.B.; FEINLEIB, M; MCNAMARA,P.M. CASTELLI,W.P. Obesity as na independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framing-han Heart Study. **Circulation**, v.67:968-77, 1983

IGNARRO L. J. Nitric oxide as an unique signaling molecule in the vascular system: a hystorical overview. **Journal Physiology Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 503-514, 2002.

IGNARRO, L.J. Nitric oxide as an unique signaling molecule in the vascular system: a hystorical overview. **Journal Physiology Pharmacology**, v.53, p.503-14, 2002.

JAQUET, D. et al. Intrauterine growth retardation predisposes to insulin resistance but not to hyperandrogenism in young women. **J Clin Endocrinol Metab.** Nov;84(11):3945-9,1999.

JIN, R.C. et al. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. **Microcirculation**, v. 12, n. 3, p. 247-58, 2005.

JONK, A. M. et al. Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. **Physiology**, v. 22, p.252-260, 2007.

KAC, G.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.. The nutritional transition and the epidemiology of obesity in Latin America. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, Supll.1, S54-55, 2003.

KAHN, B.B.; ALQUIER, T.; HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metabolism**, v.1, p.15-25, 2005.

KAMM, K.E.; STULL, J.T. The function of muosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Annual Reviews Pharmacology Toxicology**, v. 25, p.593-620, 1985.

KANAI, A.J. et al. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 14126-14131, 2001.

KAUR, I.P.;GEETHA, T. Screening methods for antioxidants-a review. **Mini Reviews Medical Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 305-312, 2006.

KEENAN, N.L.et al.Distribution and correlates of waist-to-hip ratio in black adults: the Pitt County Study. **Am J Epidemiol**. Mar 15;135(6):678-84,1992.

KUCZMARSKI, R.J. et al. CDC growth charts for the United State: methods and development. **Vital Health Statistics**, v. 246, p. 1-190, 2002.

KOH, K. K. et al. Vascular and metabolic effects of candesartan: insights from therapeutic interventions. **Journal of Hypertension**, v. 24, S31-38, 2006.

KONSTANTINIDES S., et al Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity **J Clin Invest.**;108(10):1533–1540., 2001.

KOPPLE, J.D. Distúrbios renais e nutrição. In: SHILS, M.E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença** . São Paulo: Manole,. p. 1543-1578, 2003.

KULKARNI, S. et al. A revised model of platelet aggregation.**J Clin Invest**;105(6):783-791. 2000.

LANDMESSER U; HARRISON D G. Oxidant Stress as a Marker for Cardiovascular Events.**Circulation.**;104:2638-2640,2001

LANDMESSER, U.; HARRISON, D.G.; DREXLER, H.. Oxidant stress: a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. **European Journal Clinical Pharmacology**, v. 62, Suppl. 1, p. 13-19, 2006.

LAKKA, H.M. et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, v. 288, p. 2709-2716, 2002.

LAUER, T. et al. L-arginine preferentially dilates stenotic segments of coronary arteries thereby increasing coronary flow. **Journal Internal of Medicine**, v. 264, n. 3, p. 237-244, 2008.

LINCOLN, J.; HOYLE, C. H.V.; BURNSTOCK, G. Synthesis and properties of nitric oxide. Nitric oxide in health and disease. **Cambridge University Press**, p. 12-25,1997.

LEÃO, L.S. et al. Prevalência de obesidade em escolares de Salvador, Bahia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, p. 151-157, 2003.

LEON, D. A. et al Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years **BMJ**;312:406-410 ,1996.

LEWIS, G.D. et al. Sildenafil improves coronary artery patency in a canine model of platelet-mediated cyclic coronary occlusion after thrombolysis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, p. 1471-1477, 2006.

LIADAKI, K.N. et al .Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. **J Biol Chem**. Jul 14;275(28):21262-7, 2000.

LIEB, W.R. A kinetic approach to transport studies. In: **Red cell membranes a methodological approach**. New York: Academic Press, 1982. p. 135-164.

LORGERIL, M. Dietary arginine and the prevention of cardiovascular diseases. **Cardiovascular Research**, v. 37, p. 560-563, 1997.

LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, pratelet activation, and arterial thrombosis. **Circulation Research**, v. 88, p. 756-762, 2001.

LUZ, P. L. ; LAURINDO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P.. **Endotélio: doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu,. 2005.

MACALLISTER, R.J.; VALLANCE, P. Endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis: How are important are they? **Exp. Nephrol**. 1998; 6: 195-199.

MANN, G.E.; YUDILEVICH, D.L.; SOBREVIA, L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. **Physiology Reviews**, v. 83, n.1, p. 183-252, 2003.

MASON, R. P.; JACOB, R. F. Membrane microdomains and vascular biology: emerging role in atherogenesis. **Circulation**, v. 107, p. 2270-2273, 2003.

MATTHEWS D.R., et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**,28:412-418, 1985.

MAXWELL, A.J.,et al Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is reversed by a nutritional product designed to enhance nitric oxide activity. **Cardiovasc Drugs Ther**. Jun;14(3):309-16,2000.

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". **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p. 31213-31216, 1997.

MEHTA, J.L. et al. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 125, p. 340-7, 1995.

MELLO F A C, HOFFMANN M E, MENEGHINI R Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**. February 15; 218(1): 273–275,1984.

MENDES RIBEIRO, A.C et al. Identification of system y+L as the high affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. **European Journal Physiology**. v.438, p. 573-575, 1999.

_____. et al. Abnormalities in L-arginine transport and NO biosynthesis in chronic renal and heart failure. Review. **Cardiovascular Research**, v. 49, n. 4, p. 697-712, 2001.

_____. Effects of nutritional status on the L-arginine–nitric oxide pathway in platelets from hemodialysis patients. **Kidney Internacional**, v.68, p. 2173–2179, 2005.

MENDES RIBEIRO, A.C; BRUNINI, T.M.C. L-arginine transport in disease. **Current Medicinal Chemistry Cardiovascular Hematologic Agents**. v.2, n. 2, p. 123-131, 2004.

MICHEL, T.;VANHOUTTE, M.P. Cellular signaling and NO production. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**. v 459, n. 6, 2010.

MINEO, C.; SHAUL, Philip Warren. HDL stimulation nitric oxide sunthase: a novel mechanism of HDL action. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 13, n. 6, p. 226-231, 2003.

MINSHALL, RD, et al.Caveolin regulation of endothelial function.**AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol**.285:L1179-L83,2003.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. et al. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal Pharmacology**, v. 147, v. 1, S193-201, 2006.

MONTEIRO, C. A. et al. The nutrition transition in Brazil. **European Journal Clinical Nutrition**, v. 49, p. 105-113, 1995.

MORLEY, J.E. et al Measurement of nitric oxide synthase and its mRNA in genetically obese (ob/ob) mice. **Life Science**, v. 57, p. 1327-31, 1995.

MORREL, C.N. et al. Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation. **Proceeding of the Nationla Academy of Science**, v. 10, n. 102, p. 3782-7, 2005.

MOSS, M.B. et al. Diminished L-arginine availability in hypertension. **Clinical Science**, v. 107, p. 391-397, 2004.

MOTA, M.E.; SILVA, G.A. Desnutrição e obesidade em crianças: delineamento do perfil de uma comunidade de baixa renda. **Jornal de Pediatria**, v.77, p. 288-293, 2001.

MOYANO, D. et al. Plasma amino acids in anorexia nervosa. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 684-689, 1998.

MULLERSHAUSEN, F. et al. In vivo **reconstitution** of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 9, p. 4023-30, 2004.

MURPHY, M.G. Dietary fatty acids and membrane protein function. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 68-79, 1990.

NAKATA, M. et al. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. **Diabetes**, v. 48, p. 426-9, 1999.

NCEP ATPIII, Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III). **JAMA**, v.285, p.2486-2497, 2001.

NEEL, J.V. Diabetes Mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **American Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 4, p. 353-362, 1962.

NEUTZLING, M.B. et al. Overweight and obesity in Brazilian adolescents. **International Journal Obesity Related Metabolism Disord**, v. 24, p. 869-74, 2000.

NHANES National Health and Nutrition Examination Survey,3, (**NHANES III**). Disponível em: http://www.cdc.gov/nchs/products/elec_prods/subject/nhanes3.htm. acesso em: 2010.

NHANES National Health and Nutrition Examination Survey,4, (**NHANES IV**) Disponível em: http://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about_nhanes.htm Acesso em: 2010.

OGDEN, C.L. et al. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. **JAMA**, v. 288, n. 1728-1732, 2002.

OLIVEIRA, O.; RIBEIRO, E.; SILVA, J. C.. **Desafios Biologia**. Porto: ASA, 2.ed., 2007. cap.1.

PAIGE, J.S.; JAFFREY, S.R. Pharmacologic manipulation of nitric oxide signaling: targeting NOS dimerization and protein-protein interactions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 97-114, 2007.

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, Supl. 2, S170-80, 2008.

PEREIRA, N. R. et al. Oxidative stress, L-arginine–nitric oxide and arginase pathways in platelets from adolescents with anorexia nervosa. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 44, n. 3, p. 164-168, 2010.

PERTICONE, F. et al. Asymmetric dimethylarginine, l-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. **Journal American College Cardiology**, v. 246, n. 3, p. 518-23, 2005.

PETNEHAZY, T. et al. Role of blood cell associated AT1 receptors in the microvascular responses to hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 313-318, 2006.

PETTITT, D.J. et al. Diabetes and obesity in the offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. **Diabetes Care**, v. 16, Suppl. 1, p. 310-314, 1993.

_____. et al. Breast feeding in infancy is associated with lower rates of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Lancet**, v. 350, p. 166-168, 1997.

PINTO, V.L. et al. Depression and Cardiovascular Disease: Role of Nitric Oxide. **Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 142-149, 2008.

PRASAD, A.; QUYYUMI, A. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 110, n. 11, p. 1507-1512, 2004

PREETHI, B.L. **Assessment of insulin resistance in health young adults**. M.S. Ramaiah Medical College. Dissertation submethed to the Rajiv Gandhi University of health sciences, 2005.

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica **Arq. Bras. Cardiol.** vol.84 suppl.1 São Paulo Apr. 2005

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 85: 5193-5197,1990.

RAFFAELLI, F. et al. Interactions between lipoproteins and platelet membranes in obesity. **Obesity**, v. 17, p. 1375-1380, 2009.

RAUCHFUSS, S. et al. Insulin inhibition of platelet-endothelial interaction is mediated by insulin effects on endothelial cells without direct effects on platelets. **Journal Thrombosis and Hemostasis**, v. 6. n. 5, p. 856-64, 2008.

REAVEN, G.M. Banting Lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

REYES, A.A.; KARL, I.; KLAHR, S. Role of L-arginine in health and in renal disease. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: 331-346.

ROBERTSON, B.E. et al. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **American Journal Physiology**, v. 265, C299-303, 1993.

ROMAIN, M. Larive et al. Cell membrane extensions, generated by mechanical constraint, are associated with a sustained lipid raft patching and an increased cell signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1798, n. 3, p. 389-400, 2010.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton: *CRC Press*. 1991, p.151-170.

SAAD, Mário J.A. Resistência à insulina, obesidade e dislipidemias. In: SAAD, Mário J.A.; MACIEL, Rui M.B.; MENDONÇA, Berenice B. **Endocrinologia**. São Paulo: Atheneu, 2007. pt. 8, p. 981-1000.

SAIER, M.H. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transport. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 354-411, 2000.

SPECTOR, A.A.; YOREK, A.M. Membrane lipid composition and cellular function. **Journal of Lipid Research**, v. 26, p. 1015-1035, 1985.

SHAUL PW et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. **J Biol Chem**. Mar 15;271(11):6518-22,1996.

SHAUL PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. **Annu Rev Physiol**. 2002;64:749-74.

SHAUL. P.W. Endothelial nitric oxide synthase caveolae and the development of atherosclerosis. **Journal Physiology**, v. 547, p. 21-33, 2003.

SCHNEIDER D. International trends in adolescent nutrition. **Soc Sci Med**. Sep;51(6):955-67, 2000.

SIES H et al Cellular redox changes and response to drugs and toxic agents. **Fundam Appl Toxicol**. Jul-Aug;3(4):200-8,1983.

SINAIKO, A.R. et al Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence. **Circulation**. Apr 19;111(15):1985-91,2005

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

SIQUEIRA, A.F.A.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, S.R.G.R. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 334-346, 2006.

SIQUEIRA, M.A.S. 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 Experimental Nephrology**, v. 107, n. 4, p. 132-138, 2007.

SOBREVIA, L.; MANN, G.E. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 423-452, 1997.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of Cellular Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 59-71, 2007.

SONG, P.; WEI, J.; WANG, H.C..Distinct roles of the ERK pathway in modulating apoptosis of Ras-transformed and non-transformed cells induced by anticancer agent FR901228. **FEBS Lett.** Jan 3;579(1):90-4, 2005.

SOTELO, Y.O.; COLUGNATI, F.A.; TADDEI, J.A. Prevalência de sobrepeso e obesidade entre escolares da rede pública segundo três critérios de diagnóstico antropométrico. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 233-240, 2004.

SOUZA, M. S. F. et al. Síndrome metabólica em adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, p. 214-220, 2007.

STEIN, W.D. Carrier-mediated transport systems. In: **channels, carrier and pumps**. London: Academic Press,. p.127-173,1996.

STEUHR, DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annual Reviews of Pharmacology**, v. 37, p. 339-59, 1997.

STÜHLINGER, M.C. et al Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor.JAMA. Mar 20;287(11):1420-6, 2002.

SUN, W. et al.Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Circulation*. 2006 Dec 12;114(24):2655-62. EpubNov 20, 2006.

SYDOW,K.; MONDON, C.E.;COOK, J.P.Insulin resistance:potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA.**Vasc Med**,10 Suppl 1:S35-43,2005

TATOYAN, A; GIULIVI, C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. **Journal Biology chemistry**, v. 273, p. 11044-11048, 1998.

TERRES, N.G. et al. Prevalence and factors associated to overweight and obesity in adolescents. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 627-633, 2006.

TONG, B.C.; BARBUL, A. Cellular and physiological effects of arginine. **Mini Reviews in Medical Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 823-832, 2004.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. **Histochem Cell Biol.** Out; 122(4): 339-52,2004.

TRETJAKOV, P et al. Plasma HDL-Cholesterol has an effect on nitric oxide production and arachidonic acid metabolism in the platelet membranes of coronary heart disease patients without LDL-hypercholesterolemia. **Medical Science Monitor**, v. 6, n. 3, p. 507-511, 2000.

TRIOANO, R.P. et al. Overweight prevalence and trends for children and adolescents: the national health and examination survey, 1963 to 1991. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 149, p. 1085-1091, 1995.

TSIKAS, D. et al. Inhibition of platelet aggregation by S-nitrosocysteine via cGMP-independent mechanisms: evidence of inhibition of thromboxane A2 synthesis in human blood platelets. **FEBS Letters**, v. 442, p. 162-166, 1999.

UITTENBOGAARD, A.; et al. High Density Lipoprotein Prevents Oxidized Low Density Lipoprotein-induced Inhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase Localization and Activation in Caveolae **The journal of biological chemistry** Vol. 275, No. 15, Issue of April 14, pp. 11278–11283, 2000

VAGUE, J. Lês obésités: études biométriques. **Press Medical**, v. 30, p. 339, 1947.

VALDEZ, L.B.; ZAORNTJ, T.; BOVERIS, A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 166-172, 2006.

VALKO M et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** Mar 10;160(1):1-40. Epub 2006 Jan 23, 2006.

VAN RIPER, D.A.; McDANIEL, N.L.; REMBOLD, C.M. Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1355, p. 323-330, 1997.

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. **Journal Biological Chemistry**, v. 63, p.3150-3163, 1988.

VANNI, D. S.. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.3, p. 181-189, 2007.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537-49, 2008.

WALLACE, A.M. *et al.* Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the West of Scotland coronary prevention study. **Circulation**, v. 104,n. 25, p. 3052-6, 2001.

WANG Y.; MONTEIRO, C.; POPKIN, B.M. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States Brazil, China, and Russia. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 75, p. 971-7, 2002.

WEI, J.N.*et al.* Low birth weight and high birth weight infants are both at an increased risk to have type 2 diabetes among schoolchildren in taiwan. **Diabetes Care**, v.26, p. 343-348, 2003.

WEISS, R. *et al.* Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 2362-74, 2004.

WIDDER J D. *et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling Impairs Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Function in **Diabetes**.Jun 59(6) 2010.

WILLA, A.H.S.U.E.H.; QUIÑONES, M. J. Role of Endothelial Dysfunction in Insulin Resistance **Am J Cardiol**;92(suppl):10J–17J, 2003.

WILLIAMS, D.L. *et al.* Binding and cross-linking studies show that scavenger receptor BI interacts with multiple sites in apolipoprotein A-I and identify the class A amphipathic alpha-helix as a recognition motif.**Biol Chem**. Jun 23;275(25):18897-904, 2000

WHO Global Database on Body Mass Index.
http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html

WHO Expert Committee on Physical Status: the use and interpretation of anthropometry physical status: the use and interpretation of anthromometry: report of a who expert committee. Disponível em: <http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html> acesso em: 2010.

WITHROW D.; ALTER, D.A. **The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity**. Disponível em: <<http://ww3.interscience.wiley.com/journal/12326580/abstracts>> acesso em: 27 jan 2010.

WU, G.; MORRIS, S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemistry Journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

WU, G. MEININGER, C. J. Arginine nutrition and cardiovascular function. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 11, p. 2626-2629, 2000.

WU, G. et al. Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2680-2685, 2007.

_____. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids**, v. 37, n.1, p. 153-168, 2009.

WU, G.; MEININGER C.J. Nitric oxide and vascular insulin resistance. **Biofactors**. Jan-Feb;35(1):21-7,2009.

XU, Weiling et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. **FASEB Journal**, v. 18, p. 1746-1748, 2001.

YEAGLE PL. Transport in the membranes of cells. London: **Academic Press London**, 231-262,1998.

YUHANNA, I.S. et al High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. **Nat Med**. 2001 Jul;7(7):853-7

ZALBA, G. et al Oxidative stress in arterial hypertension role of NAD(P)H Oxidase . **Hypertension**.38:1395, 2001

ZENG, G. et al. Roles for insulin receptor,PI3-Kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. **Circulation**, v. 101, p.1539-45, 2000.

Anexo 3- CEP/HUPE processo 451

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




Rio de Janeiro, 11 de abril de 2007

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
 Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
 Para: Aut. Carmen Regina Leal de Assumpção
 Orient. Profª. Tatiana Marlowe Cunha Brunini

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1712-CEP/HUPE) " A VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO EM PLAQUETAS. RELAÇÃO COM A OBESIDADE, SÍNDROME METABÓLICA E DOENÇA RENAL. ESTUDO EM UMA POPULAÇÃO DE ADOLESCENTES " 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. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


 Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 HUPE / UERJ

Anexo 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Avaliação da via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de .
adolescentes com Obesidade, Síndrome Metabólica e Doença Renal. Estudo em
uma população de Adolescentes

Pesquisadores participantes: Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, Doutoranda
Carmen Regina Leal de Assumpção
Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Departamento de Farmacologia e Psicobiologia
Laboratório de Transporte de Membrana
Tel.:(21)25876141

Eu, _____
_____, CPF/RG nº _____, responsável pelo
menor _____

____ abaixo assinado, concordo em deixá-lo participar da pesquisa acima como
sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela Doutoranda Carmen Regina
Leal de Assumpção sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, os
possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação, permitindo o exame
físico e coleta sanguínea, 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 Responsável

Assinatura do paciente

ANEXO 5 – Protocolo do Laboratório de Transporte de Membrana**Laboratório de Transporte de Membrana-UERJ**

Data: _____ / _____ / _____

Nome:**Data de nascimento:** ____ / ____ / ____**Idade Atual:****Cor:** branca negra parda**Sexo:** feminino masculino**Local de nascimento:****Nacionalidade:****Filiação:****Responsável:****Endereço:****Município:** _____ **Estado:** _____**Telefone:** (_____) _____**Celular do responsável:** (____) _____**Queixa principal:****Idade de surgimento da queixa principal:****H.D.A.:****Anamnese dirigida:** Medicamentos em uso pela criança roncos noturnos, problemas, transtorno alimentar**H.Fisiológica:**Duração da gestação: _____ Parto: vaginal cesáreoIntercorrências durante a gestação ? Não Sim. Quais ? _____Intercorrências durante o parto Não Sim. Quais? _____

Peso ao nascimento: _____ Comprimento ao nascimento: _____

Desenvolvimento psico-motor (sugar, sentar, andar, falar):

Cursando (série escolar atual):

♀ : Idade pubarca: _____ Idade telarca: _____

Idade menarca: _____

Ciclos menstruais: regulares irregulares

♂ : Idade pubarca: _____

H.P.P. (Patologias, cirurgias, alergias):

H. Alimentar: (rotina alimentar e horários das refeições)

H. Familiar:

Obesidade: sim não Quem? _____

Dislipidemia: sim não Quem? _____

Hipertensão arterial: sim não Quem? _____

Diabetes: sim não Quem? _____

Doença coronariana: sim não Quem? _____

Endocrinopatia: sim não Qual e quem? _____

Irmão/ã(s): número: ♀ - _____ ♂ - _____

saudáveis. Quantos ? _____

obesos(s). Quantos ? _____ Patologia(s) associadas: _____

H social: Horário escolar: _____

Familiar que atende _____

Nº total de pessoas na casa _____

Tempo de TV, Games e Computador: _____

Nível de cooperação familiar: _____

Exame físico:

Peso: _____ Comprimento: _____ cm Altura: _____

IC: _____ IE: _____ IO: _____ IMC: _____ Kg/m²

Percentil: _____ Cintura: _____ cm Percentil: _____ Q: _____ cm

RCQ: _____ PA: _____ Percentil: _____

Circunferência braço: _____ cm

Padrão de distribuição de gordura corporal: (universal, andróide, ginecóide, lipodistrofia)

Estado geral: (mucosas, estado de higiene inclusive bucal, cooperação com examinador, estigmas genéticos ?)

Exame de pele e fânero

Pêlos axilares: ausentes presentes Características: finos grossos

Quantidade: pequena moderada grande

Exame do pescoço:

Circunferencia do Pescoço: _____ cm

Tireóide:

Exame do abdome:

Exame do tórax

FC: _____

Ausculta cardio-vascular:

Ausculta respiratória:

FR: _____

Mamas:  Tanner M1 M2 M3 M4 M5

Exame da genitália:

Aparência geral: feminina masculina indeterminada/ ambígua

Pêlos:Tanner P1 P2 P3 P4 P5

 Tanner G1 G2 G3 G4 G5

Testículos : Direito: diâmetro maior: _____ cm; diâmetro menor: _____ cm

Esquerdo: diâmetro maior: _____ cm; diâmetro menor: _____ cm

Volume D: _____ ml Volume E _____ ml

 Tanner G1 G2 G3 G4 G5

Exames Laboratoriais

<u>Dados Laboratoriais</u>	Resultados
Hemoglobina (g/dL)	
Hematócrito (%)	
Leucócitos(mm ³)	
Plaqueta (10 ³ /mm ³)	
Ureia (mg/dL)	
Creatinina (mg/dL)	
Ácido Úrico (mg/dL)	
Sódio (mmol/L)	
Potássio (mmol/L)	
Colesterol Total (mg/dL)	
Colesterol HDL (mg/dL)	
Colesterol LDL (mg/dL)	
Colesterol VLDL (mg/dL)	
Triglicerídeos (mg/dL)	
TGP (U/L)	
TGO (U/L)	
GGT (U/L)	
Fosfatase Alcalina (U/L)	
TSH (mUI/mL)	
Glicemia (mg/dL)	
Insulina (μUI/mL)	
Homa β	
Homa IR	
Leptina(ng/mL)	
Fibrinogênio (mg/dL)	
<u>PCR ultrasensível(mg/L)</u>	

ANEXO 6 – Produção científica.**Produção científica oriunda de 2006-2010**

ASSUMPÇÃO C.R., BRUNINI T.M.C., MATSUURA C., RESENDE A.C., MENDES-RIBEIRO, A.C. (2008) Impact of the L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress on the pathogenesis of the metabolic syndrome. *The Open Biochemistry* 2: 100-107.

PEREIRA, N.R., MOSS, M.B., ASSUMPÇÃO C.R., CARDOSO, C.B., MANN G.E., BRUNINI, T.M.C., MENDES RIBEIRO, A.C. (2010) Oxidative stress, L-arginine-nitric oxide and arginase pathways in platelets from adolescents with anorexia nervosa. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 44(3):164-168.

Insulin resistance in Obesity and Metabolic Syndrome: is there a connection with L-arginine transport? Carmen R.L Assumpção.1,2, Tatiana.M.C Brunini.1, Natália R Pereira1, Amélio F Godoy-Matos 2, Mariana A.S. Siqueira1, Giovanni Mann.E.3, Antonio.C Mendes-Ribeiro.1,3 *Blood Cells, Molecules, and Diseases* (submetido)

Trabalhos apresentados em eventos nacionais e internacionais

XXII Reunião Anual da FESBE, 22 a 25 de agosto de 2007, Águas de Lindóia, São Paulo. Pereira R.N., Assumpção C.R.L., Cardoso C., Marques G.T., Brunini T.M.C., Mendes-Ribeiro, A.C. Anorexia nervosa, **via L-arginina-óxido nítrico e plaquetas.**

40^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 16-19 de outubro de 2008, Águas de Lindóia. Via L-arginina-óxido nítrico em anorexia nervosa. Pereira, N.R., Assumpção, C.R.L., Okinga, A., Cardoso, C., Brunini, T.M.C., Mendes-Ribeiro, A.C.

13th International Congress of Endocrinology, 8-12 de novembro de 2008, Rio de Janeiro.

- 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.
- Mc Cardle Disease, Assumpção C.L., Vaisman F.

Physiological Society Meeting, 7-10 de Julho de 2009, King's University College Dublin, Irlanda. Pereira N.R., Moss M.B.; Assumpção, C.R., Mann G.E., Brunini T.M.C., Mendes-Ribeiro A.C. Nitric oxide production and bioavailability in red blood cells from patients with anorexia nervosa.

XII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 3 a 5 de setembro de 2008, Rio de Janeiro. Pereira N.R., Assumpção C.R.L., Cardoso C., Brunini T.M.C., Mendes-Ribeiro A.C. O papel do óxido nítrico e sua relação com a função plaquetária em pacientes com anorexia nervosa.

Capítulo de Livro

Transtorno Alimentares e Obesidade. Diagnóstico e manejo das condições clínicas associadas aos transtornos alimentares cap 16 p.195-208, 2.ed Ed Artmed, 2006

Tradução de capítulo de livro

Williams Tratado de Endocrinologia 11^a Ed, Cap 4 e 5

Outros Trabalhos

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Complicações Clínicas da anorexia nervosa e bulimia nervosa. Revista Brasileira de Psiquiatria. , v.24, p.29 - 33, 2002.

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Bócio Multinodular Tóxico-reavaliação após terapia com alcoolização Conduta médica. , v.4, p.10 - 17, 2000.

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Alterações Psiquiátricas no Hipertireoidismo. Jornal Brasileiro de Psiquiatria. , v.43, p.591 - 597, 1994.

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Mapeamento dos protocolos de pesquisa examinados pelo Comitê de Ética em Pesquisa- CEP do Instituto estadual de diabetes e endocrinologia luiz Capriglioni- IEDE(1999-2003) In: I Congresso de Bioética do Rio de Janeiro, 2003, Rio de Janeiro. I Congresso de Bioética do Rio de Janeiro. , 2003. v.1.

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Hepatite pelo Propiltiouracil:relato de 2 casos In: 24º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. , 2000. v.44. p.S214 .

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Hipertireoidismo e Diabetes In: 24º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, 2000, Rio de Janeiro. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. , 2000. v.44. p.S245.

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Tireoidite Aguda:Relato de Caso In: 24º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, 2000, Rio de Janeiro. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. , 2000. v.44. p.S231.

ASSUMPÇÃO, C. R. L. Formas Incomuns de Hipertireoidismo. Monografia. RJ:PUC/RJ, 1984.

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](#)