



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Monique Bandeira Moss**

**Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da  
via L-arginina-óxido nítrico em hipertensão e insuficiência renal  
crônica**

Rio de Janeiro

2010

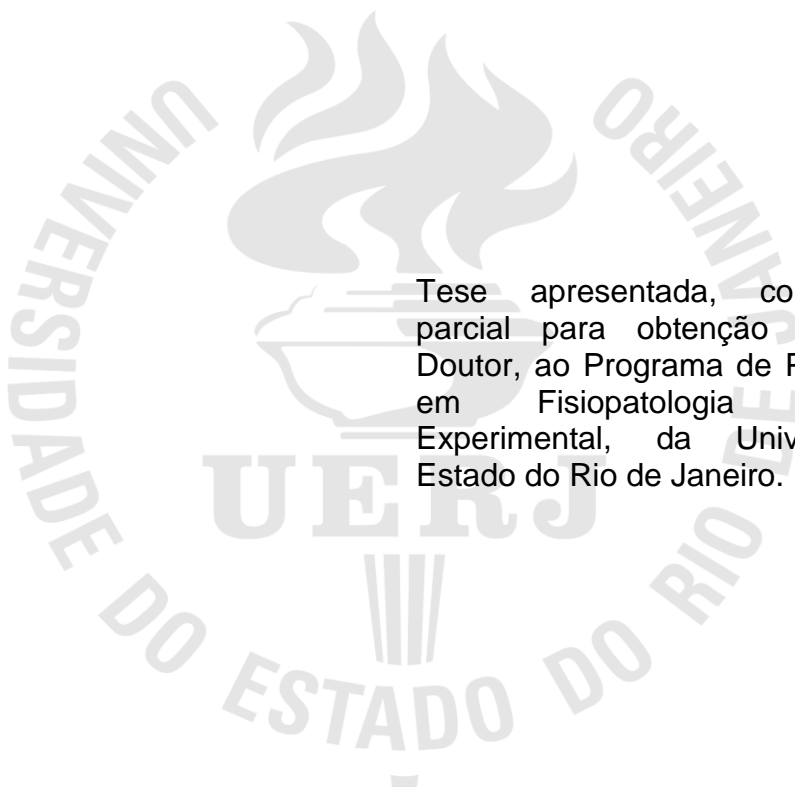
# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Monique Bandeira Moss

**Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em hipertensão e insuficiência renal crônica**



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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Marlowe Cunha Brunini

Rio de Janeiro

2010

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

M913 Moss, Monique Bandeira.

Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em hipertensão e insuficiência renal crônica / Monique Bandeira Moss. – 2010.

129 f. : il.

Orientador: Antônio Cláudio Mendes Ribeiro.

Coorientadora: Tatiana Marlowe Cunha Brunini.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade Ciências Médicas.

1. Plaquetas (Sangue) – Teses. 2. Óxido nítrico – Teses. 3. Insuficiência renal crônica – Teses. 4. Hipertensão arterial – Teses. I. Ribeiro, Antônio Cláudio Mendes. II. Brunini, Tatiana Marlowe Cunha. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

CDU 612.111.7

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

---

Assinatura

---

Data

Monique Bandeira Moss

**Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em hipertensão e insuficiência renal crônica**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

Aprovada em 30 de julho de 2010.

Coorientadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Marlowe Cunha Brunini - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro (Orientador)  
Instituto de Biologia - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadja Lima Pinheiro  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Miguel Luís Graciano  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Sérgio F. F. Santos  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2010

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais John e Nancy, a quem eu devo tudo o que sou e que conquistei até hoje, meu carinho e minha gratidão em reconhecimento ao amor incondicional a mim devotado, pelo exemplo de vida que norteia minha existência e por todo o apoio que sempre me deram.

Ao meu amado noivo Patrick, por todo amor e carinho a mim dedicado. Obrigada por iluminar a minha vida e por me fazer ver o Mundo de uma forma muito mais bela. Te amo!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

Ao meu orientador Prof. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, médico e pesquisador brilhante, com quem venho trabalhando a mais de 10 anos. Obrigada por toda a amizade, atenção e pelos ensinamentos que me foram transmitidos ao longo de todos esses anos.

À Prof<sup>a</sup>. Tatiana Marlowe Cunha Brunini, minha co-orientadora. Agradeço pelo auxílio e pelo exemplo de pessoa alegre, íntegra e dedicada, capaz de passar tantos conhecimentos de forma simplificada e inteligível.

A meus pais, John e Nancy Moss, que sempre incentivaram meus estudos, me apoiaram em minhas decisões e, com uma paciência que só a paternidade oferece, compreenderam meus momentos de mau humor e as intermináveis horas na frente do computador. Sem eles nada disso seria possível. Amo vocês.

Ao meu amado noivo, Patrick, pelo amor, carinho, apoio e compreensão a mim dispensados. Sua presença em minha vida tornou a execução dessa tese uma tarefa mais alegre. Obrigada por aceitar o desafio dessa relação e por manter sempre vivo o nosso amor, o qual a cada dia se torna mais forte. Te amo muito!

À minha avó Eurides Moss, por todo o apoio e carinho nos momentos difíceis (e não foram poucos). Sempre com uma palavra acalentadora, consegue me fazer enxergar que os problemas sempre terão uma solução.

Às minhas amadas sobrinhas, Maria Clara e Manuela, que mesmo tendo chegado ao mundo em tão pouco tempo, vieram para a Terra como dois anjinhos, trazendo paz, harmonia e felicidade. A tia ama vocês!

À minha irmã Ingrid e seu esposo Adriano, também vítimas do meu mau humor. Obrigada pela paciência e incentivo.

À minha quase irmã, Mariana Siqueira. Exemplo de caráter e detentora de uma mente brilhante. Como se não bastasse ser uma excelente profissional ainda é uma grande amiga e tem um coração de ouro. Obrigada por TUDO o que tem feito por mim. Serei eternamente grata a você e você sabe que pode sempre contar comigo.

Às amigas Marcela Anjos e Natália Pereira. Ver vocês entrarem no laboratório como alunas de iniciação científica e se tornarem verdadeiras pesquisadoras, competentes e capazes é motivo de extrema felicidade. Tenho muito orgulho de vocês e agradeço a toda a ajuda e amizade.

Às amigas Carmen Assumpção, Paula Fontoura, Vivian Liane e Luíza Meirelles e Cristiane Matsuura pela amizade e por trazerem ao laboratório sua alegria e competência. Obrigada por tudo!

Ao Professor Giovanni Mann pela orientação e apoio durante o estágio sanduíche na Cardiovascular Division, Kings College-London.

Aos amigos Sarah Chapple, Xinghua Cheng, Tabasum Mughal, e Bijal Patel por tornarem muito mais alegre minha estada em Londres. Obrigada pela amizade e pelos momentos muito agradáveis que passamos juntos.

À Capes e à FAPERJ pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram desta dissertação, por terem me ajudado a superar os obstáculos e por terem colaborado para que fosse possível a realização deste trabalho. O fato de terem sido transitórios não os fez menos fundamentais.



I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.

*Marie Curie*

## RESUMO

MOSS, Monique Bandeira. *Mecanismos Moleculares e Celulares Envolvidos na Modulação da Via L-arginina-Óxido Nítrico em Hipertensão e Insuficiência Renal Crônica*. 2010. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A insuficiência renal crônica (IRC) e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) são patologias com alta morbidade e mortalidade, consumindo grandes verbas de saúde pública. A disfunção endotelial presente tanto na IRC, como na hipertensão, contribui para a manutenção de elevada resistência periférica, favorecendo complicações como a aterosclerose. Esta disfunção endotelial é parte de um estado pró-trombótico, levando à ocorrência de eventos cardiovasculares, principal causa de morte nestas patologias. O óxido nítrico (NO) tem um papel importante na modulação da atividade plaquetária. Anormalidades na síntese e/ou inativação do NO são descritas tanto na insuficiência renal crônica como na hipertensão. Estudos prévios demonstraram uma redução do influxo de L-arginina em eritrócitos e plaquetas de pacientes hipertensos e em um modelo animal de hipertensão. Além disso, em IRC, nosso grupo mostrou uma ativação da via L-arginina-NO em plaquetas. O objetivo dessa tese é avaliar a via L-arginina-NO na HAS e em diferentes estágios da IRC, bem como investigar o ciclo da uréia, e a presença de marcadores de estresse nesses pacientes. De acordo com o presente estudo pôde-se verificar que não houve alteração na síntese de NO em eritrócitos na hipertensão, todavia ocorre uma ativação do ciclo da uréia, que pode ser dada pelo aumento do influxo de L-arginina eritrocitário previamente demonstrado. Não foi demonstrada diferença significativa na peroxidação lipídica sistêmica, em plaquetas ou eritrócitos na HAS. Em plaquetas, no entanto, houve uma redução da atividade da NO sintase (NOS), que não foi acompanhada por alteração da expressão das isoformas da NOS, da arginase, da fosfodiesterase 5 (PDE5) ou da guanilato ciclase (GC) solúvel. Essa redução na síntese de NO em plaquetas pode ser explicada por um menor influxo de L-arginina que está presente na hipertensão. Os eritrócitos de pacientes renais crônicos em hemodiálise mostraram um maior influxo de L-arginina associado a um aumento da expressão e da atividade da arginase, não havendo diferença na atividade da NOS. Além disso, apesar e não ter sido mostrado alteração nos marcadores de peroxidação lipídica em eritrócitos e plaquetas, foi detectado um aumento dos mesmos no soro de pacientes com IRC em hemodiálise. Por outro lado, as plaquetas dos mesmos pacientes apresentaram uma maior expressão da eNOS, da iNOS e da GC solúvel, acompanhada de uma redução da atividade da arginase, o que pode justificar a disfunção plaquetária que existe nesses pacientes. Plaquetas de pacientes portadores de IRC em tratamento conservador mostraram um aumento da atividade da NOS associado com maior expressão tanto da iNOS como da eNOS. Curiosamente foram detectados menores concentrações de 3'5'-monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), não havendo no entanto, diferença nos padrões de agregação plaquetária induzida por colágeno ou adenosina difosfato (ADP). As descobertas aqui apresentadas certamente contribuirão para uma melhor compreensão da fisiopatologia da HAS e da IRC.

Palavras chave: Insuficiência Renal Crônica. Hipertensão Arterial Sistêmica. L-arginina. Óxido Nítrico. Arginase. Plaquetas. Eritrócitos.

## ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) and essential hypertension (EH) are diseases associated with high rates of morbidity and mortality, consuming huge amounts of money from the public health system. The endothelial dysfunction existent in both diseases, CRF and EH, contributes to the maintenance of the high peripheral resistance, and contribute to circulatory complications such as atherosclerosis. This endothelial dysfunction is part of a pro-thrombotic state, leading to cardiovascular events, which are the major cause of death in these disorders. Nitric oxide (NO) plays an important role in the modulation of platelet function. Abnormalities of NO synthesis or inactivation are described in CRF and EH. It was previously reported an inhibition of L-arginine transport in erythrocytes of hypertensive patients and in an animal model of hypertension. Moreover, we have also demonstrated an activation of L-arginine-NO pathway in platelets taken from uraemic patients. The aim of the present thesis is to investigate L-arginine-NO pathway in arterial hypertension and in different stages of chronic renal failure. It will also be evaluated urea cycle and the presence of oxidative stress markers in these patients. According to the present study it was not detected any alteration in erythrocytes NO synthesis in hypertension, however, there was an activation of urea cycle, which could be explained by an increase in L-arginine influx. The present study has not demonstrated significant difference in markers of lipid peroxidation in the serum, platelets or erythrocytes in hypertension. In platelets however, there was an inhibition of NO synthase (NOS) activity without any alterations of NOS isoforms, arginase, phosphodiesterase 5 (PDE5) or soluble guanylyl cyclase (sGC) expression. This reduction of NO synthesis may be explained by a lower influx of L-arginine that is present on hypertension. Erythrocytes from chronic renal failure patients under haemodialysis have shown an increased influx of L-arginine associated with a higher expression and activity of arginase with no difference in NOS activity. Therefore, although it was not shown abnormalities of lipid peroxidation markers in erythrocytes and platelets, it was detected increased levels of these markers in the serum of chronic renal failure patients under hemodialysis. On the other hand, platelets from the same patients exhibited increased expression of eNOS, iNOS and soluble guanylyl cyclase associated with reduced arginase activity, which can explain the platelet dysfunction observed in these patients. Platelets taken from patients with chronic renal failure under conservative treatment have shown increased NOS activity associated with higher expression of both iNOS and eNOS. Curiously, it was been detected a lower concentration of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), although there was no difference in the patterns of platelet aggregation induced by collagen or adenosine diphosphate (ADP). The findings reported in this study may contribute to a better understanding of EH and CRF pathophysiology.

Key words: Chronic Renal Failure. Essential Hypertension. Nitric Oxide. L-arginine. Arginase. Platelets. Erythrocytes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Principais vias metabólicas do aminoácido L-arginina.....	21
Figura 2 -	A síntese da L-arginina em seres humanos.....	22
Figura 3 -	A via L-arginina-óxido nítrico.....	25
Figura 4 -	Modelo molecular esquemático do sistema $\gamma^+L$ .....	27
Tabela 1 -	Características principais das três isoformas das NOS.....	29
Figura 5 -	Via L-arginina – NO e ações do NO em plaquetas.....	35
Quadro 1 -	Classificação da pressão arterial sistêmica para adultos.....	38
Quadro 2 -	Classificação da gravidade da falência renal.....	42
Tabela 2 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes hipertensos e controles.....	48
Tabela 3 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento conservador e controles.	49
Tabela 4 -	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de insuficiência renal em hemodiálise e controles.....	50
Figura 6 -	Exemplo ilustrativo das curvas de saturação dos sistemas de transporte de L-arginina.....	52
Figura 7 -	Produção de L-citrulina em eritrócitos de pacientes saudáveis.....	53
Figura 8 -	Registro da hemólise provocada por diferentes concentrações de NaCl.....	54
Figura 9 -	Exemplo ilustrativo de uma curva de fragilidade osmótica de um paciente saudável.....	55
Quadro 3 -	Composição do tampão de extração de proteínas.....	57
Quadro 4 -	Composição do tampão de amostra.....	58
Quadro 5 -	Composição do tampão de corrida.....	58
Quadro 6 -	Composição do tampão de transferência.....	58
Figura 10 -	Produção basal de L[ <sup>3</sup> H]-citrulina em eritrócitos de pacientes hipertensos e controles.....	61
Figura 11 -	Atividade da arginase em eritrócitos de pacientes hipertensos e controles.....	62
Figura 12 -	Expressão das isoformas de arginase I e II em eritrócitos de controles e pacientes hipertensos.....	63

Figura 13 - Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes e controles.....	64
Figura 14 - IC50 da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes hipertensos e controles.....	64
Figura 15 - Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em eritrócitos de pacientes e controles.....	65
Figura 16 - Atividade da NOS em plaquetas de pacientes hipertensos e controles.....	66
Figura 17 - Expressão da NOS endotelial em plaquetas de pacientes hipertensos e controles.....	67
Figura 18 - Expressão da NOS induzível em plaquetas de pacientes hipertensos e controles.....	67
Figura 19 - Atividade da arginase em plaquetas de pacientes hipertensos e controles.....	68
Figura 20 - Expressão das isoformas da arginase I e II em plaquetas humanas.....	69
Figura 21 - Expressão da GCs em plaquetas de controles e pacientes portadores de HAS.....	70
Figura 22 - Expressão da PDE5 em plaquetas de controles e pacientes portadores de HAS.....	70
Figura 23 - Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em plaquetas de pacientes e controles.....	71
Figura 24 - Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no soro de pacientes e controles.....	72
Figura 25 - Atividade da NOS em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento conservador e controles saudáveis.....	73
Figura 26 - Expressão das isoformas eNOS e iNOS em plaquetas de pacientes com IRC em tratamento conservador e controles.....	74
Figura 27 - Concentrações intracelulares de GMPc de pacientes e controles....	75
Figura 28 - Agregação plaquetária induzida por concentrações crescentes de colágeno em plaquetas de controles e de pacientes com	

insuficiência renal crônica.....	75
Figura 29 - Agregação plaquetária induzida por concentrações crescentes de ADP em plaquetas de controles e de pacientes com insuficiência renal crônica.....	76
Figura 30 - Influxo de L-arginina total aparente, via sistema $y^+$ e $y^+L$ em eritrócitos.....	76
Figura 31 - Atividade da NOS em plaquetas de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise.....	77
Figura 32 - Atividade da arginase em eritrócito de pacientes com IRC em hemodiálise e controles.....	78
Figura 33 - Expressão das isoformas I e II da arginase em eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodiálise e controles.....	79
Figura 34 - Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em eritrócitos de controles e pacientes portadores de IRC em hemodiálise.....	80
Figura 35 - Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes e controles.....	81
Figura 36 - IC50 da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodialise e controles.....	81
Figura 37 - Expressão da NOS endotelial em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise.....	82
Figura 38 - Expressão da NOS induzível em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise.....	83
Figura 39 - Expressão da GCs em plaquetas de controles e pacientes portadores IRC em hemodiálise.....	84
Figura 40 - Expressão da PDE5 em plaquetas de pacientes portadores de IRC em hemodiálise e controles.....	84
Figura 41 - Atividade da arginase em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica e controles.....	85
Figura 42 - Expressão das isoformas da arginase I e II em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica e controles.....	86
Figura 43 - Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em plaquetas de pacientes e controles.....	87

Figura 44 - Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma de pacientes e controles.....	88
Figura 45 - Resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em eritrócitos de pacientes portadores de HAS.....	98
Figura 46 - Resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em plaquetas de pacientes portadores de HAS.....	99
Figura 47 - Resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodiálise.....	100
Figura 48 - Resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em plaquetas de pacientes portadores de IRC em hemodiálise.....	100
Figura 49 - Resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em plaquetas de pacientes portadores de IRC em tratamento conservador.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	Dimetil-L-arginina-assimétrica
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
COX	Ciclo-oxigenase
DO	Densidade ótica
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EP	Erro padrão
EPO	Eritropoetina
FAD	Dinucleotídeo adenina-flavina
FMN	Mononucleotídeo flavina
FvW	Fator de von Willebrand
GFR	Taxa de filtração glomerular
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GP	Glicoproteína
GTP	Guanosina trifosfato
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRC	Insuficiência renal crônica
Km	Constante de afinidade
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocondrial
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida
NEM	N-etil-maleimida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOHA	N-hidroxi-L-arginina



NOS	Óxido nítrico sintase
PBMCs	Células mononucleares sanguíneas periféricas
PDE	Fosfodiesterase
PKG	Proteína quinase G
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TxA2	Tromboxano A <sub>2</sub>
VII JNC	VII Joint National Committee

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
1.1	<b>L-arginina</b> .....	20
1.2	<b>Via L-arginina-óxido nítrico-GMPc</b> .....	23
1.3	<b>A via L-arginina-NO ciclo da uréia e estresse oxidativo em elementos figurados do sangue</b> .....	31
1.3.1	<u>Plaquetas</u> .....	31
1.3.2	<u>Hemácias</u> .....	36
1.4	<b>Hipertensão arterial sistêmica</b> .....	38
1.4.1	<u>Definição e epidemiologia</u> .....	38
1.4.2	<u>A via L-arginina-NO, ciclo da uréia e estresse oxidativo em hipertensão arterial sistêmica</u> .....	40
1.5	<b>Insuficiência renal crônica</b> .....	41
1.5.1	<u>Definição e epidemiologia</u> .....	42
1.5.2	<u>A via L-arginina-óxido nítrico na insuficiência renal crônica</u> .....	44
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
2.1	<b>Objetivos gerais</b> .....	46
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	46
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	48
3.1	<b>Seleção de Controles e Pacientes</b> .....	48
3.2	<b>Análise clínica e laboratorial dos pacientes</b> .....	50
3.3	<b>Transporte de L-arginina em eritrócitos</b> .....	50
3.4	<b>Análise da atividade da NOS em eritrócitos</b> .....	52
3.5	<b>Análise da fragilidade osmótica</b> .....	53
3.6	<b>Análise da atividade da NOS plaquetária</b> .....	55
3.7	<b>Atividade da arginase em plaquetas e eritrócitos</b> .....	56
3.8	<b>Extração de proteínas e western blotting</b> .....	56
3.9	<b>Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)</b> .....	58
3.10	<b>Agregação plaquetária</b> .....	59
3.11	<b>Mensuração de GMP cíclico intracelular</b> .....	59
3.12	<b>Dosagem de proteína</b> .....	60

3.13	<b>Análise estatística.....</b>	60
4	<b>RESULTADOS.....</b>	61
4.1	<b>Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na atividade da NOS em eritrócitos.....</b>	61
4.2	<b>Efeitos da hipertensão arterial Sistêmica na atividade da arginase em eritrócitos.....</b>	61
4.3	<b>Expressão da arginase em eritrócitos na hipertensão arterial sistêmica.....</b>	62
4.4	<b>Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na fragilidade osmótica de eritrócitos.....</b>	63
4.5	<b>Avaliação da peroxidação lipídica em eritrócitos.....</b>	65
4.6	<b>Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na atividade da NOS em plaquetas.....</b>	65
4.7	<b>Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na expressão das isoformas da NOS em plaquetas.....</b>	66
4.8	<b>Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na atividade da arginase em plaquetas.....</b>	68
4.9	<b>Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na expressão das isoformas da arginase em plaquetas.....</b>	68
4.10	<b>Expressão da guanilato ciclase solúvel em plaquetas na hipertensão arterial sistêmica.....</b>	69
4.11	<b>Expressão da fosfodiesterase 5 em plaquetas na hipertensão arterial sistêmica.....</b>	70
4.12	<b>Avaliação da peroxidação lipídica em plaquetas em pacientes hipertensos.....</b>	71
4.13	<b>Avaliação da peroxidação lipídica sistêmica em pacientes hipertensos.....</b>	71
4.14	<b>Atividade da NOS em plaquetas de controles e pacientes renais em tratamento conservador.....</b>	72
4.15	<b>Expressão das isoformas eNOS e iNOS em plaquetas de controles e pacientes renais em tratamento conservador.....</b>	73
4.16	<b>Concentração basal de GMPc em plaquetas de controles e pacientes renais em tratamento conservador.....</b>	74

4.17	<b>Avaliação da função plaquetária.....</b>	<b>75</b>
4.18	<b>Transporte de L-arginina em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>76</b>
4.19	<b>Atividade da NOS em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>77</b>
4.20	<b>Atividade da arginase em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>77</b>
4.21	<b>Expressão das isoformas da arginase em eritrócitos de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise e controles.....</b>	<b>78</b>
4.22	<b>Peroxidação lipídica em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>79</b>
4.23	<b>Efeitos da insuficiência renal crônica em hemodiálise na fragilidade osmótica de eritrócitos.....</b>	<b>80</b>
4.24	<b>Expressão das isoformas eNOS e iNOS em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise.....</b>	<b>82</b>
4.25	<b>Expressão da guanilato ciclase solúvel em plaquetas de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>83</b>
4.26	<b>Expressão da fosfodiesterase 5 em plaquetas de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise .....</b>	<b>84</b>
4.27	<b>Atividade da arginase em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>85</b>
4.28	<b>Expressão das isoformas da arginase em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise.....</b>	<b>85</b>
4.29	<b>Peroxidação lipídica em plaquetas de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>86</b>
4.30	<b>Peroxidação lipídica no plasma de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.....</b>	<b>87</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
5.1	<b>Hipertensão arterial sistêmica.....</b>	<b>89</b>
5.2	<b>Insuficiência renal crônica.....</b>	<b>93</b>
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102
<b>ANEXO A</b> – Aprovação do Comitê de Ética 1.....	118
<b>ANEXO B</b> - Aprovação do Comitê de Ética 2.....	119
<b>ANEXO C</b> - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	120
<b>ANEXO D</b> - Protocolo de transporte de membrana 1.....	121
<b>ANEXO E</b> - Protocolo de transporte de membrana 2.....	123
<b>ANEXO F</b> - Trabalhos publicados e submetidos no período de 2007 a 2010.....	126
<b>ANEXO G</b> - Apresentações em congressos e publicados em anais de eventos no período de 2007 a 2010.....	128

## INTRODUÇÃO

A L-arginina, um aminoácido catiônico semi-essencial, é o precursor do óxido nítrico (NO), um gás inorgânico de meia vida curta envolvido em várias funções fisiológicas como neurotransmissão, atividade imune, vasodilatação, adesão e agregação plaquetárias (Moncada *et al.*, 1991; Vallance, 2002; Huynh & Chindusting, 2006; Moncada & Higgs *et al.*, 2006). Embora as concentrações intracelulares de L-arginina sejam mais do que suficientes para a produção de NO. A entrada da L-arginina extracelular em alguns tipos celulares e doenças parece ser fundamental para a produção de NO, fenômeno denominado “paradoxo da L-arginina” (Mann *et al.*, 2003; Verrey *et al.*, 2004). Foram descritos em células de mamíferos quatro sistemas de transporte de aminoácidos catiônicos:  $y^+$ ,  $y^+L$ ,  $B^{0,+}$  e  $b^{0,+}$ , cada um com características cinéticas específicas e expressas de forma distinta em diferentes tipos celulares (Mann *et al.*, 2003; Verrey *et al.*, 2004; Deves & Boyd, 1998).

Uma vez no interior da célula, a L-arginina é convertida em L-citrulina e NO pela ação da família de enzimas NO sintase (NOS). A nomenclatura das duas primeiras representa o tecido no qual a enzima foi primeiramente descrita e são constitutivas, enquanto que a última é geralmente induzida em doenças: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS) (Mendes Ribeiro *et al.*, 2001, Closs *et al.*, 2004; Mendes Ribeiro & Brunini, 2004; Moncada & Higgs *et al.*, 2006). Já foi descrito um novo subtipo de NOS, a NOS mitocondrial, embora pouco ainda se saiba sobre ela (Elfering *et al.*, 2002).

Os efeitos do NO são mediados diretamente por segundos mensageiros, sendo que a via mais estudada é a da ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) que transforma guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), resultando em vasodilatação e redução da agregação plaquetária (Radomski *et al.*, 1987).

A arginase também é uma enzima envolvida no metabolismo da L-arginina e foi primeiramente detectada no fígado, tendo um importante papel no ciclo da uréia (Morris, 1992). São descritas duas isoformas de arginases: arginase I, citosólica e arginase II, mitocondrial. Ambas são responsáveis pela conversão de L-arginina em L-ornitina e uréia (Morris, 1992). Sabe-se hoje que essas enzimas são expressas em

diversos outros tipos celulares como células endoteliais (Bachetti *et al.*, 2004), no entanto, seus efeitos na biodisponibilidade de L-arginina e conseqüentemente na produção de NO permanecem incertos, embora alguns estudos relatem alterações na atividade da arginase em patologias como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Rodriguez *et al.*, 2000), asma (Ceylan *et al.*, 2005) e insuficiência renal crônica (IRC) (Durak *et al.*, 2001).

A HAS e a IRC são patologias com alta morbidade e mortalidade cujos mecanismos fisiopatológicos não foram totalmente esclarecidos. Sabe-se, no entanto, que essas doenças cursam com disfunção endotelial e plaquetária, ativação inflamatória e elevados índices de estresse oxidativo (Descamps-Latscha *et al.*, 1995; Drexler & Horning, 1999; Annuk *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2001). Existe um importante papel da via L-arginina-NO-GMPc nos processos aterotrombóticos freqüentemente associados à HAS e à IRC (Staessen *et al.*, 2005).

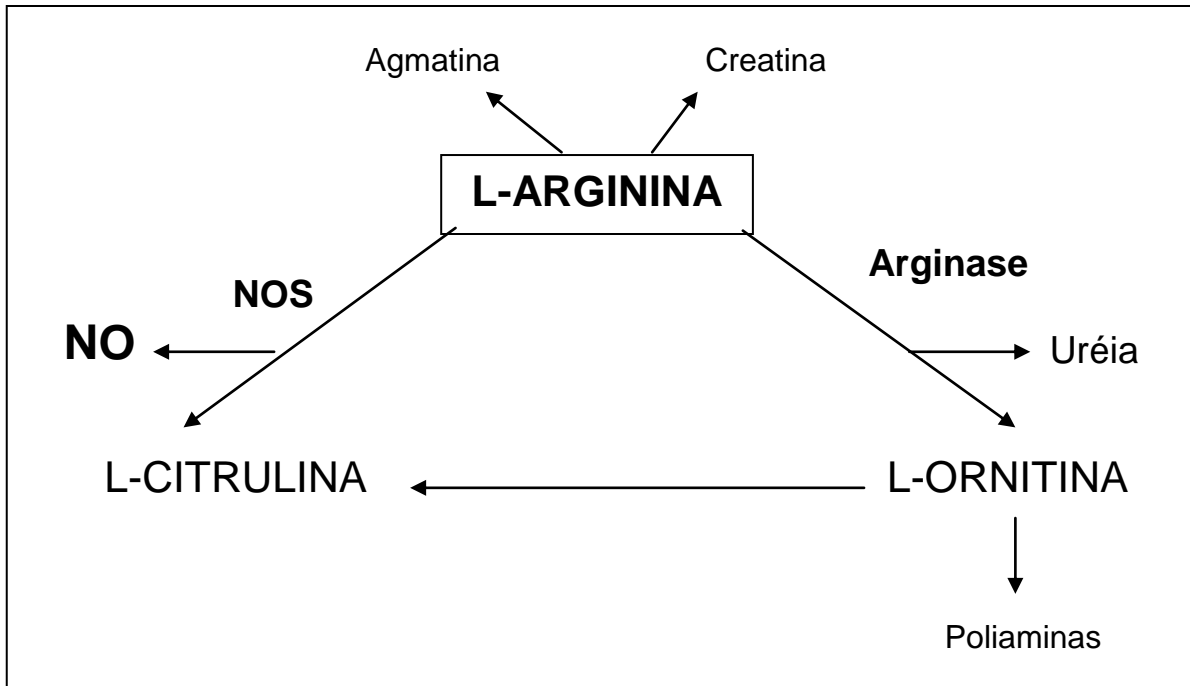
O objetivo do presente estudo é investigar os efeitos da HAS e de diferentes estágios da IRC na via L-arginina-NO, no ciclo da uréia e do estresse oxidativo em plaquetas e eritrócitos humanos.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 L-arginina

A L-arginina é um aminoácido catiônico semi-essencial em seres humanos, pois mamíferos adultos são capazes de sintetizá-lo, no entanto, no período de crescimento e em condições catabólicas, torna-se um aminoácido condicionalmente essencial (Beaumier *et al.* 1996; Coman *et al.*, 2008). É um produto da detoxificação da amônia, participa do ciclo da uréia, é precursor de proteínas e está envolvido na formação de várias enzimas. Além disso, uma de suas principais funções é ser o substrato para a produção de NO (Kopple, 2003).

A L-arginina participa também de outras vias metabólicas, como as da síntese de agmatina, poliaminas e bases pirimidinas (Figura 1). A liberação de certos hormônios – catecolaminas, glucagon, insulina, corticosteróides, hormônio do crescimento, prolactina e somatostatina – também é modulada pela concentração de L-arginina (Barbul, 1985; Cylwik *et al.*, 2005).

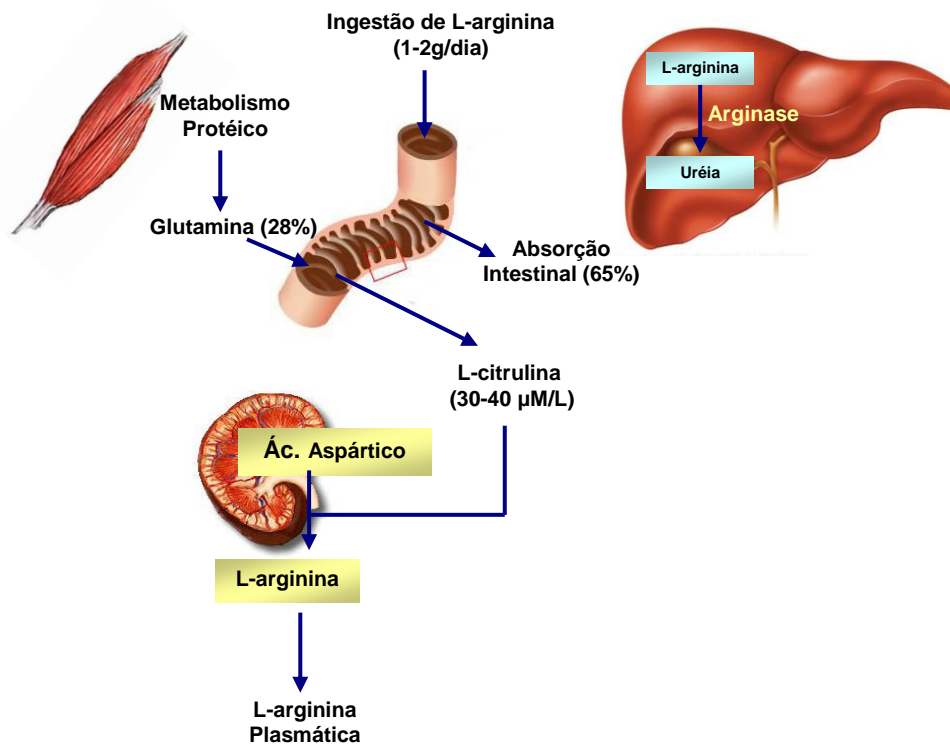


**Figura 1:** Principais vias metabólicas do aminoácido L-arginina (adaptado de Morris, 2004)

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).

A maior parte da síntese de L-arginina em seres humanos ocorre no fígado e rim a partir de L-citrulina liberada pelo intestino como produto do metabolismo nitrogenado da glutamina (Featherston *et al.*, 1973; Morris, 2006). Entretanto, no fígado há um aumento da atividade da enzima arginase, enquanto nos rins predomina a arginina sintetase, enzima responsável pela síntese de L-arginina (Barbul, 1985; Morris, 2006). Assim, o fígado utiliza grande parte da L-arginina produzida por ele no ciclo da uréia, e o rim, junto com a ingestão dietética diária (1-3 g/dia) é responsável por manter os níveis plasmáticos normais de L-arginina (80-100  $\mu\text{M}$ ) (Reyes *et al.*, 1994; Mendes Ribeiro *et al.*, 2004) (Figura 2).





**Figura 2:** A síntese da L-arginina em seres humanos (adaptado de Reyes *et al.* 1994)

O metabolismo deste aminoácido é altamente complexo e rigorosamente regulado por diversos tipos de enzimas que são expressas em padrões diferentes em tipos celulares distintos (Wu *et al.*, 1998). Dentre todas essas vias metabólicas tem sido dado muito destaque para a via da arginase, enzima que converte L-arginina em uréia e L-ornitina, competindo, desta forma, pelo mesmo substrato que a NOS (Topal *et al.*, 2006).

São descritas duas isoformas de arginase, que são codificadas por genes diferentes (Dizikes *et al.*, 1986), no entanto elas compartilham propriedades enzimáticas como a necessidade de manganês e diferem quanto sua localização subcelular e expressão em tecidos distintos (Wu *et al.*, 1998). A arginase I é uma enzima preferencialmente citosólica e é expressa de forma induzível em diversos tipos celulares. No entanto, no fígado, ela está presente de forma constitutiva e é uma enzima chave do ciclo da uréia neste órgão (Lerzynski *et al.* 2005). Por outro

lado, a arginase II é uma proteína de localização mitocondrial e existe de forma constitutiva no rim, intestino delgado e cérebro.

Diversos estudos mostram alterações da atividade e da expressão da arginase em patologias como asma, câncer, psoríase, pré-eclâmpsia, anemia falciforme, hipertensão arterial sistêmica e IRC (Ishikawa *et al.*, 2007; Sabbatini *et al.*, 2003; Demougeot *et al.*, 2005; Raghavachari *et al.*, 2007). Além disso, a arginase possui um importante papel na regulação da disponibilidade da L-arginina para a síntese de NO, uma vez que, tanto a NOS como a arginase compartilham o mesmo substrato. Outro mecanismo importante de interseção dessas duas vias é o fato de a NOS produzir, durante a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO, um intermediário capaz de inibir a arginase denominado N-hidroxi-L-arginina (Bugá *et al.* 1996). Apesar da sua importância na regulação da via L-arginina-NO, existem poucos estudos sobre a presença e a atividade da arginase em plaquetas e em eritrócitos.

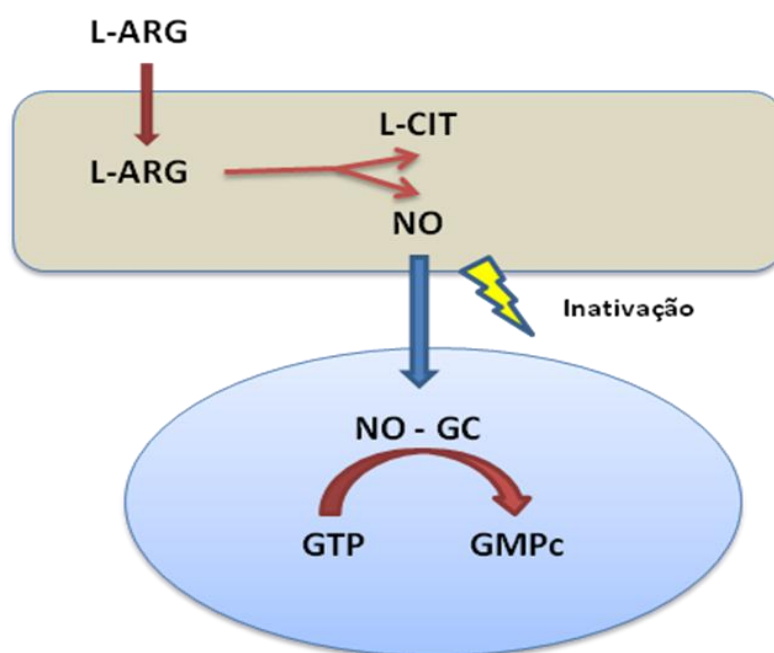
## 1.2 Via L-arginina-óxido nítrico-GMPc

Muito embora a nitroglicerina seja utilizada para tratamento da angina do peito desde o final século XIX, a descoberta de seu mecanismo de ação e das moléculas envolvidas nesse processo só ocorreu 80 anos depois (Marsh & Marsh, 2000). Nos anos 70, Ferid Murad e colaboradores demonstraram que a enzima guanilato ciclase de fígado de ratos e do músculo liso traqueal bovino era estimulada por compostos a base de nitrito, gerando aumento dos níveis de GMPc e levando a um relaxamento do músculo liso (Katsuki *et al.*, 1977), ganhando com isso o Prêmio Nobel. Independentemente de Murad, Furchgott e Zawadzki notaram que, apesar de seu potente efeito vasodilatador *in vivo*, a acetilcolina nem sempre causava vasodilatação nos experimentos *in vitro*. Os pesquisadores investigaram esses efeitos discrepantes e descobriram que a perda do efeito vasodilatador da acetilcolina era conseqüente a remoção não-intencional da íntima durante o preparo do vaso, ressaltando a importância das células endoteliais no relaxamento do músculo liso vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980). O grupo de Furchgott propôs

que o relaxamento provocado pela histamina, bradicinina, ADP e ATP ocorria pela liberação de uma substância instável a qual eles denominaram fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (Cherry *et al.*, 1982). Após diversos experimentos, Ignarro e Moncada concluíram que o EDRF na verdade se tratava no NO (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987).

Atualmente se sabe que o NO é um gás inorgânico lipofílico com uma meia vida de menos de 30 segundos em sistemas biológicos, e que é produzido por diferentes tipos celulares, nos quais pode controlar ou influenciar importantes processos fisiológicos, como neurotransmissão, atividade citotóxica do sistema imune, além dos efeitos já citados na adesão e agregação plaquetárias e na vasodilatação (Moncada *et al.*, 1997, Huynh & Chin-Dusting, 2006).

O NO é formado a partir do átomo de nitrogênio guanidino terminal da L-arginina, pela ação da família de enzimas NOS (Figura 3). Essa reação requer oxigênio ( $O_2$ ) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida (NADPH), ocorrendo uma hidroxilação inicial de L-arginina formando N-hidroxi-L-arginina (NOHA). Uma subsequente oxidação leva a formação de NO e L-citrulina (Gross & Roye, 1997). A síntese de NO, em várias condições fisiológicas e patológicas e diferentes tipos celulares, depende de L-arginina extracelular. Como mencionado previamente, esta dependência, ocorre mesmo quando o nível intracelular de L-arginina disponível está em excesso para o  $K_m$  das NOS, fenômeno denominado "O paradoxo da L-arginina" (Deves & Boyd, 1998, Brunini *et al.*, 2003).



**Figura 3:** A via L-arginina-óxido nítrico (adaptado de MacAllister and Vallance, 1998). NOS = óxido nítrico sintase; GC = guanilato ciclase; GTP = guanosina trifosfato; GMPc = guanosina monofosfato cíclica; L-ARG = L-arginina; L-CIT = L-citrulina.

Estudos mostram que os níveis intracelulares de L-arginina variam entre 0,1 e 2 mM (Xu et al. 2004, 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  $\mu$ M (Palmer et al. 1988, Bogle et al. 1996, Rodríguez-Crespo et al. 1996). 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. Parece existir em certos tipos de células, a co-localização da eNOS e do transportador de L-arginina  $y^+$  em porções específicas da membrana denominadas cavéolos (Shaul et al. 2003, Mann et al. 2003, McDonald, 1997). Para responder a este paradoxo, Closs e colaboradores, em 2000, propuseram que células endoteliais e macrófagos possuíam dois reservatórios intracelulares de L-arginina, sendo que um deles teria a capacidade de troca com o meio extracelular e o outro não. De acordo com o estudo, este segundo reservatório seria inacessível à NOS em macrófagos, sendo fundamental o transporte de L-arginina para a produção

de NO, o que seria uma das possíveis explicações para o paradoxo da via L-arginina-NO (Closs *et al.*, 2000). Outro fator importante que deve ser considerado é a presença de outras vias metabólicas que utilizam a L-arginina como substrato, sendo a mais importante delas a hidrólise da arginina em L-ornitina e uréia por ação da arginase e que é capaz de reduzir a disponibilidade da L-arginina intracelular para a NOS, limitando a produção de NO (Chicoine *et al.* 2004).

Apesar das diversas teorias propostas, não existe um consenso sobre o exato mecanismo envolvido no paradoxo da L-arginina, no entanto, ele corrobora a importância dos carreadores de aminoácidos catiônicos na produção de NO.

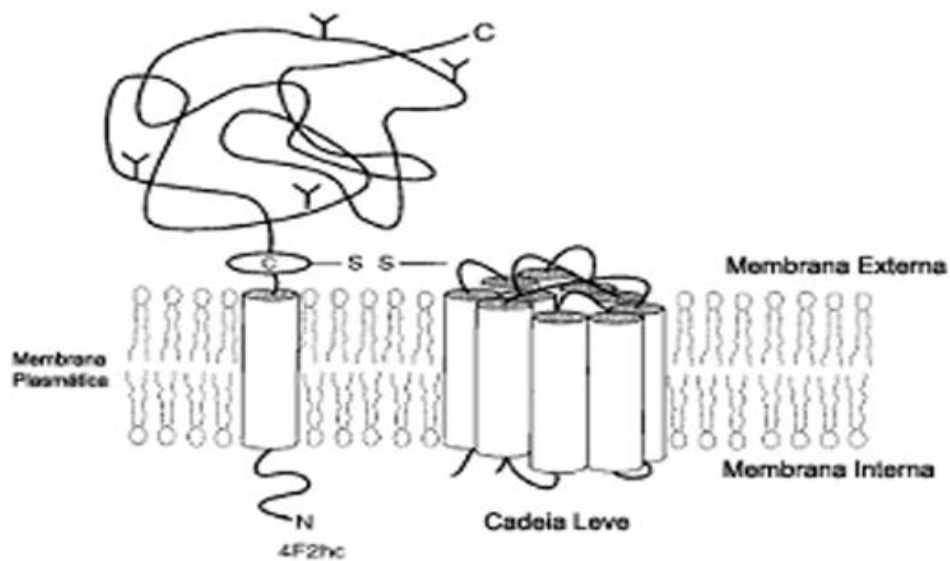
Quatro sistemas de transporte têm sido descritos como responsáveis pelo transporte de aminoácidos catiônicos (L-arginina, L-lisina e L-ornitina) em mamíferos:  $y^+$ ,  $y^+L$ ,  $b^{0,+}$  e  $B^{0,+}$  (Ignarro, 2002, Mann *et al.*, 2003).

O sistema  $y^+$  foi descoberto por um estudo pioneiro iniciado no laboratório de Halvor Christensen, sendo caracterizado como  $Na^+$  independente e seletivo para aminoácidos catiônicos (Christensen & Cullen, 1973). Os demais sistemas,  $y^+L$ ,  $b^{0,+}$  e  $B^{0,+}$ , transportam tanto aminoácidos catiônicos quanto neutros, mas diferem na dependência ou não de  $Na^+$  (Ignarro, 2002, Mann *et al.*, 2003). Características adicionais do sistema  $y^+$  são: a insensibilidade ao pH, e potente ativação induzida pela hiperpolarização e pela *trans*-estimulação. O sistema  $y^+L$ , inicialmente identificado em eritrócitos por Deves e colaboradores em 1998, transporta aminoácidos catiônicos na ausência de  $Na^+$  e aminoácidos neutros somente na presença de  $Na^+$ . Van Winkle e colaboradores, em 1990, distinguiram dois sistemas de transporte de aminoácidos catiônicos:  $b^{0,+}$  e  $B^{0,+}$  (Van Winkle *et al.*, 1990). Ambos os sistemas transportam aminoácidos neutros e catiônicos, sendo o sistema  $B^{0,+}$   $Na^+$ -dependente e o  $b^{0,+}$   $Na^+$ -independente (Stein, 1996; Brunini *et al.*, 2005).

O transporte de L-arginina nas hemácias e nas células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) é mediado pelos sistemas  $y^+$  e  $y^+L$ , enquanto nas plaquetas o fluxo desse aminoácido é mediado somente pelo sistema  $y^+L$  (Ignarro, 2002, Mann *et al.*, 2003). Por meio de estudos cinéticos, nosso grupo demonstrou previamente a primeira evidência de que o transporte de L-arginina em plaquetas humanas é mediado via sistema  $y^+L$  e não pelo sistema de transporte de aminoácidos catiônicos clássico, sistema  $y^+$ . O sistema  $y^+L$  foi identificado como um sistema de transporte de alta afinidade e baixa capacidade de transporte ( $K_m$  10 $\mu$ M)

para aminoácidos catiônicos, que também transporta aminoácidos neutros com elevada afinidade na presença de  $\text{Na}^+$  (Mendes Ribeiro *et al.*, 1999).

A atividade do sistema  $\text{y}^+\text{L}$  ocorre em resposta à expressão de no mínimo dois transportadores heterodiméricos: glicoproteína 4F2 (cadeia pesada) associada a um carreador de aminoácidos (cadeia leve),  $\text{y}^+\text{LAT1}$  ou  $\text{y}^+\text{LAT2}$  (Figura 4). A cadeia pesada (glicoproteína 4F2) é codificada pela família SLC3, enquanto as cadeias leves ( $\text{y}^+\text{LAT1}$  ou  $\text{y}^+\text{LAT2}$ ) pertencem à família SLC7 (Stein, 1996, Deves e Boyd, 1998). Recentemente, nosso grupo confirmou em plaquetas, que o sistema  $\text{y}^+\text{L}$  pode ser afetado pela *trans* estimulação, pelo potencial de superfície e pela concentração intracelular de sódio (Alves de Sá Siqueira *et al.*, 2007), no entanto existem poucos estudos sobre o comportamento desse sistema de transporte de aminoácidos.



**Figura 4:** Modelo molecular esquemático do sistema  $\text{y}^+\text{L}$  (Adaptado de Devés e Boyd, 1998).

Apesar da atividade do transporte 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).

As três isoformas das NOS: nNOS (neuronal) ou NOS I; iNOS (induzível) ou NOS II; e eNOS (endotelial) ou NOS III (Dudzinski *et al.*, 2006) que são produtos de genes distintos, no entanto apresentam semelhanças em suas propriedades químicas e enzimáticas (tabela 1). O resíduo N terminal liga a tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) e o 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 N e C são unidos por uma pequena seqüência que liga a calmodulina, um co-fator essencial para a atividade da NOS (Steuhr, 1997; Michel & Vanhoutte, 2009).

**Tabela 1:** Características principais das três isoformas das NOS (adaptado de Lincoln *et al.*, 1997).

	nNOS ou tipo I	iNOS ou tipo II	eNOS ou tipo III
Primeira identificação	Neurônios	Macrófagos	Endotélio
Peso Molecular (kDa)	160	130	133
Localização cromossomial	12p24.2	17cen-q12	7q35-36
Função principal	Neurotransmissão	Imunocitotoxicidade	Relaxamento do músculo liso vascular
Níveis de produção de NO	pmoles	nmoles	pmoles
Regulação da expressão	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



A eNOS pode se tornar desacoplada pela ausência de seu substrato ou dos cofatores. 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 (Vergnani *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008).

A nNOS é expressa de forma constitutiva difusamente no sistema nervoso central e periférico, mas também pode ser encontrada no músculo esquelético. A eNOS, que também é uma enzima constitutiva, está presente no endotélio vascular, em cardiomiócitos e em plaquetas. A iNOS foi primeiramente descrita em macrófagos, monócitos, neutrófilos e músculo liso vascular ativados por citocinas (Dudzinski *et al.*, 2006). No entanto foi demonstrado em 1996 a presença dessa isoforma da enzima NOS em plaquetas humanas não estimuladas (Chen *et al.*, 1996), embora a existência dessa proteína em plaquetas humanas seja ainda controversa.

Apesar de compartilharem uma série de características cinéticas, a ligação 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 cálcio. Sabe-se que a iNOS não está sujeita à regulação pelo cálcio intracelular pois ela se liga completamente à calmodulina (Cho *et al.*, 1992). No entanto, eNOS e 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).

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). A esta enzima tem sido dado o nome de NOS mitocondrial (mtNOS). Embora ainda não se saiba ao certo se a mtNOS é uma nova isoforma ou se é uma variante da nNOS, foi demonstrado que a mtNOS é uma proteína constitutiva expressa na membrana interna da mitocôndria e que produz NO de forma dependente de cálcio (Tatoyan *et al.*, 1998; Elfering *et al.*, 2002, Valdez *et al.*, 2006; Lacza *et al.*, 2009).

Uma vez liberado, o NO se difunde externamente através da dupla camada lipídica e forma um complexo com a GC solúvel, ativando-a. A GC solúvel é membro de uma família de enzimas relacionadas que compartilham domínios catalíticos semelhantes, mas que são ativadas por vias diferentes. 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 sGC melhor caracterizada é a forma  $\alpha 1/\beta 1$ , que responde a concentrações nanomolares de NO e catalisa a conversão de GTP em GMPc e pirofosfato (Derbyshire *et al.*, 2008). Os efeitos celulares do GMPc são mediados por diferentes proteínas efetoras do GMPc como as proteínas quinases dependentes de GMPc (Hofmann *et al.*, 2000), fosfodiesterases reguladas por GMPc (Juilfs *et al.*, 1999) e canais iônicos ligados ao GMPc (Biel *et al.*, 1999; Cary *et al.*, 2006). A elevação na concentração de GMPc induzida pelo NO é contrabalançada pela ativação de fosfodiesterases, que são responsáveis pela degradação do GMPc (Francis *et al.*, 2001).

O NO é um radical livre, que pode participar de diversos tipos de reações redox (Allen *et al.*, 2009). Algumas dessas reações são responsáveis por seus efeitos biológicos e outras limitam sua atividade. A inativação do NO ocorre em grande parte pela reação com espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (Kelm *et al.*, 1999). Essas espécies são encontradas em quantidades aumentadas em diversas disfunções vasculares, incluindo a HAS, hipercolesterolemia, diabetes mellitus (DM) e IRC (Zalba *et al.*, 2000)

### **1.3 A via L-arginina-NO ciclo da uréia e estresse oxidativo em elementos figurados do sangue**

#### **1.3.1 Plaquetas**

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados derivados dos megacariócitos localizados na medula óssea. Elas possuem um papel fundamental

na hemostasia e na trombose. Para que haja a formação do tampão plaquetário, é necessária a ocorrência de três fases distintas nas plaquetas: adesão, ativação e agregação plaquetária. Nos vasos sanguíneos normais não-traumatizados, as plaquetas mostram pouca tendência de se aderirem ao endotélio, em parte devido à prostaciclina, produzida pelas células endoteliais, que induz a síntese de adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico (AMPc) em plaquetas e inibe a adesão plaquetária (Löwemberg et al., 2010). O óxido nítrico, também normalmente secretado pelas células endoteliais e pelas próprias plaquetas, é um inibidor natural da adesão, da ativação e da agregação plaquetária. A lesão da camada íntima, mesmo que a parede do vaso permaneça intacta leva, todavia, à exposição de proteínas da matriz extracelular subendotelial, como o colágeno, a fibronectina o fator de von Willebrand (FvW), a trombospondina e a laminina (Löwemberg et al., 2010) .

A presença dessas proteínas, particularmente do FvW faz com que as plaquetas deixem o fluxo laminar do sangue e adiram à área lesada. As plaquetas possuem uma elevada densidade de receptores de superfície que respondem a essas proteínas e elas sofrem uma migração extremamente rápida para o local da lesão, iniciando a formação de um trombo. Estão envolvidos na adesão dois receptores principais: a glicoproteínas (GP) Ia/IIa heterodimérica, a qual se liga diretamente, mas de forma fraca, ao colágeno, e o heterotrímero GP Ib/IX/V, que se liga com alta força de cisalhamento ao FvW do tecido conjuntivo associado ao colágeno de superfície (Löwemberg et al., 2010). A ativação das plaquetas é um passo crucial na formação do trombo propriamente dito. A ativação pode ocorrer a partir da ação de diversos agonistas, alguns dos quais são fracos e outros fortes. São exemplos de agonistas a trombina, a adenosina difosfato (ADP), o tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), a 5-hidroxitriptamina (serotonina), a epinefrina, a vasopressina, o fibrinogênio. A maior parte dos agonistas derivados do plasma exerce suas ações através de diversos receptores de membrana acoplados à proteína G. Quando um desses receptores se liga ao seu agonista específico, se inicia uma cascata protéica intraplaquetária que por fim promove uma ativação dos transportadores de Ca<sup>++</sup> e mobilização de Ca<sup>++</sup> das reservas no sistema tubular denso para a matriz intracelular geral da plaqueta. O aumento nas concentrações intracelulares de Ca<sup>++</sup> atua nas vesículas citoplasmáticas conhecidas como grânulos α ou nos grânulos densos (ou δ), fazendo com que eles migrem para a superfície das células e degranulem (Packham et al., 2005). Os grânulos densos liberam ADP, ATP, serotonina e Ca<sup>++</sup>. Os grânulos α

contêm diversas proteínas envolvidas na coagulação. A liberação de ADP pelos grânulos densos no meio extracelular possui um efeito auto-catalítico na plaqueta pela qual ele foi liberado, além de estimular as plaquetas ao redor. Na medida em que as plaquetas ativadas interagem umas com as outras elas começam a agregar. A agregação é iniciada pela ativação conformacional da GP IIb/IIIa, uma proteína transmembrana heterodimérica, mediada pelo  $\text{Ca}^{++}$ . Nas plaquetas circulantes, o receptor GP IIb/IIIa em repouso tem pouca atividade sob seus ligantes (primariamente o fibrinogênio), de forma que a formação do trombo é minimizada. Todavia, quando ocorre a ativação, a GP sofre uma mudança conformacional que garante a ela uma alta afinidade por seus ligantes.

Embora as plaquetas de mamíferos sejam células anucleadas, diversos estudos demonstraram que elas contêm RNA mensageiro (RNAm) oriundo dos megacariócitos, durante a trombopoiese (Harrison & Goodall, 2008). Originalmente acreditava-se que esse RNAm fosse instável e que tivesse uma meia vida curta. Todavia, evidências sugerem que as plaquetas são capazes de sintetizar proteínas e que as reservas de RNAm nas plaquetas são muito mais ricas e diversificadas do que se acreditava previamente (Harrison & Goodall, 2008; Schubert & Devine, 2010).

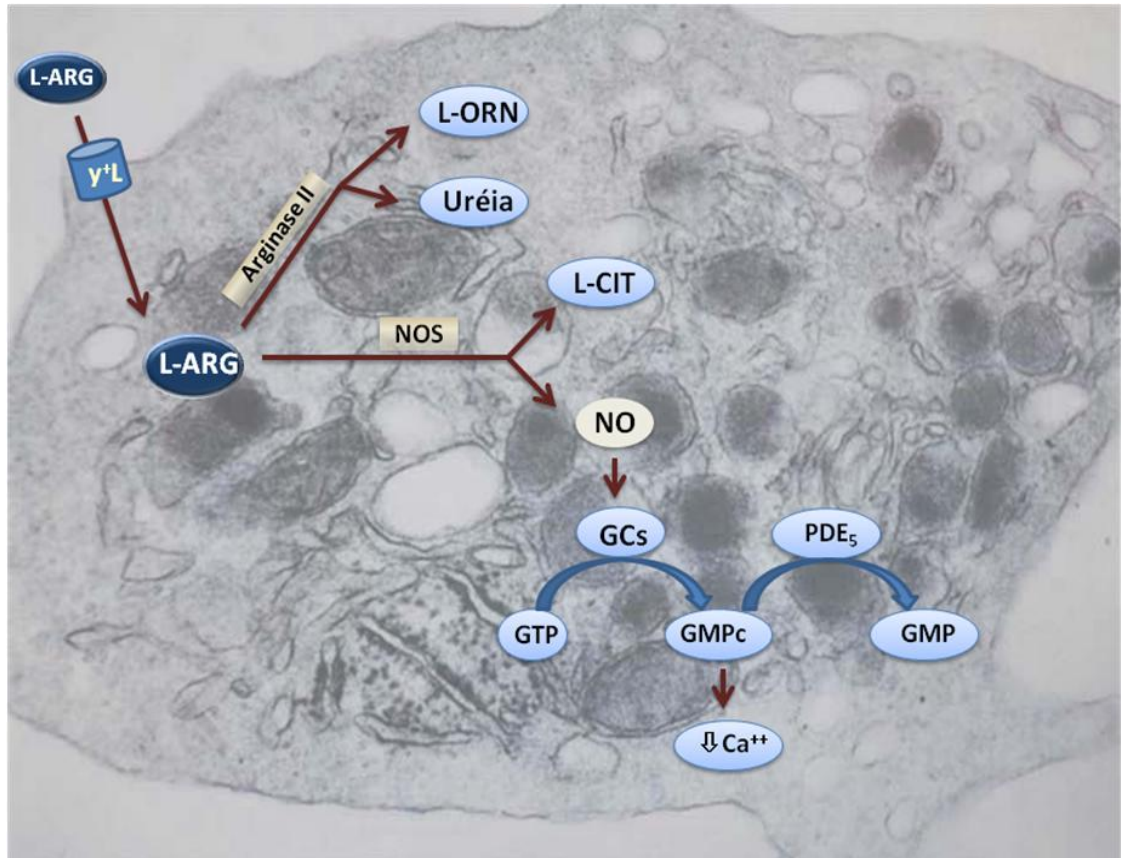
Inicialmente, acreditava-se que apenas o NO produzido pelo endotélio modulava a função das plaquetas. No entanto, Freedman e colaboradores demonstraram que o NO produzido pela própria plaqueta era capaz de modular sua função e inibia de forma marcante o recrutamento de plaquetas na formação do trombo. Esses achados foram confirmados em um modelo animal que utilizava animais deficientes em eNOS, cujas plaquetas produziam quantidades indetectáveis de NO e que apresentavam menor tempo de sangramento (Freedman *et al.*, 1999), confirmando que o NO produzido pela própria plaqueta era fundamental para a modulação de sua atividade e que elas possuíam uma via de produção de NO.

Por meio de estudos cinéticos, nosso grupo demonstrou previamente a primeira evidência de que o transporte de L-arginina em plaquetas humanas é mediado via sistema  $y^+L$  e não pelo clássico sistema de transporte de aminoácidos catiônicos, sistema  $y^+$ . Além disso, Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que o transporte de L-arginina pelo sistema  $y^+L$  é limitante para a produção de NO em plaquetas, independente das concentrações intracelulares deste aminoácido (Brunini *et al.*, 2003).

As plaquetas expressam ambas as isoformas de NOS, endotelial e induzível (Lincoln *et al*, 1997; Marjanovic *et al.*, 2008). A via L-arginina-NO foi demonstrada em plaquetas pela primeira vez por Radomski e colaboradores, envolvendo a isoforma da NOS cálcio-dependente, eNOS (Radomski *et al*, 1990). Posteriormente, Chen e Metha foram capazes de demonstrar a presença da isoforma óxido nítrico sintase induzível através da incubação das plaquetas com citocinas. Na ausência de cálcio, a L-arginina foi convertida a citrulina e óxido nítrico, indicando a presença da iNOS, isoforma da NOS cálcio-independente (Mehta *et al*, 1995). Todavia, os dados a respeito da expressão, função e regulação das NOS em plaquetas, permanecem controversos.

Em plaquetas, o NO causa uma ativação da GC com aumento da produção de GMPc e uma consequente ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG inibe o influxo de íons cálcio para o retículo endoplasmático da plaqueta (Gkaliagkousi *et al.*, 2007). Além disso, ela também fosforila o receptor do TxA2, inibindo sua função. Além dos efeitos mediados pelo GMPc foi demonstrado que o NO age por vias independentes do GMPc. Diversos doadores de NO parecem inibir a função plaquetária sem que esse efeito seja revertido pelo uso de inibidores da GC, mas ainda não há um consenso sobre os mesmos (Gkaliagkousi *et al.*, 2007).

Outras enzimas importantes na via efetora do NO são as fosfodiesterases. Foram isolados em extratos de plaquetas humanas três isoformas distintas de fosfodiesterases (PDE): PDE2, PDE 3 e PDE5. Nas plaquetas humanas, a PDE5 e a PDE3 são as principais isoformas que hidrolisam GMPc e AMPc, respectivamente (Ito *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2008). 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 devida à estimulação direta da PDE5 pelo próprio GMPc ou pela fosforilação pela proteína quinase G (PKG) (Mullershausen *et al.*, 2004).



**Figura 5:** Via L-arginina – NO e ações do NO em plaquetas. L-ARG = L-arginina; L-ORN = L-ornitina; L-CIT = L-citrulina; GC = guanilato ciclase solúvel; NO = óxido nítrico; PDE5 = fosfodiesterase 5 (adaptado de Gkaliagkousi, 2007) .

Além de gerar NO, a L-arginina pode também seguir a via do ciclo da uréia, e já foi comprovado que essas duas vias interagem e são capazes de modular suas atividades. O primeiro relato da existência da arginase em plaquetas humanas foi feito por Villanueva e Giret em 1980 e, além disso, foi evidenciada a atividade desta enzima em plaquetas tanto de ratos como de coelhos (Mendez *et al.* 1997 e de La Pena *et al.*, 2000). Recentemente, um estudo realizado em plaquetas de pacientes portadores de anemia falciforme, demonstrou presença de RNAm da arginase II em plaquetas humanas (Raghavachari *et al.*, 2007) e nosso grupo demonstrou uma expressão aumentada da isoforma II da arginase em plaquetas de pacientes com anorexia nervosa (Rodrigues Pereira *et al.*, 2010). No entanto, ainda existem poucos dados disponíveis sobre o comportamento dessa enzima nessas células, o que demonstra a necessidade de mais estudos sobre essa via em plaquetas humanas.

Merece destaque também o efeito das espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plaquetas. Embora o termo ROS se refira a diversos compostos distintos, o ânion superóxido talvez seja uma das ROS de maior relevância, pois reage com o NO para formar peroxinitrito, bem como é convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD). Estudos mostram que existe uma produção fisiológica de ROS em plaquetas durante a sua ativação. De forma semelhante ao endotélio, as ROS produzidas pela plaqueta são geradas por diferentes fontes enzimáticas - NADPH-oxidase, NOS e ciclo-oxigenase (COX) - sendo que o uso de inibidores da NADPH oxidase é capaz de inibir a agregação plaquetária (Krötz et al., 2004). Além da produção endógena de ROS, foi demonstrado *in vitro* que a administração de superóxido exógeno torna as plaquetas mais sensíveis à ação de seus agonistas como o colágeno e a trombina e esse efeito é explicado, em parte, pela redução da biodisponibilidade do NO com uma consequente formação de peroxinitrito (Krötz et al., 2004).

### 1.3.2 Hemácias

Os eritrócitos, também conhecidos como hemácias ou células vermelhas (RBC), são células bicôncavas anucleadas produzidas na medula óssea e são responsáveis pelo transporte de oxigênio e dióxido de carbono entre os tecidos corporais e os pulmões. Originalmente acreditava-se que, nessas células, o NO reagisse com a hemoglobina, sendo retirado da circulação (Gladwin *et al.*, 2003). Embora relatos iniciais tenham sugerido a existência de uma via L-arginina – NO em RBC (Chen *et al.*, 1996), estudos subsequentes não comprovaram a atividade da NOS nessas células (Kang *et al.*, 2000). Além disso, acreditava-se que mesmo que os eritrócitos contivessem uma NOS ativa, a produção de NO seria apenas uma função vestigial e que ele seria imediatamente inativado pela hemoglobina. Mais recentemente, em uma elegante série de experimentos, Kleinbongard e colaboradores demonstraram por microscopia confocal por imunofluorescência que os eritrócitos expressam uma eNOS funcional (Kleinbongard *et al.*, 2006). A

regulação da NOS em eritrócitos parece ser diferente da regulação em outros tipos celulares devido à ausência de determinadas organelas e de maquinaria de produção de proteínas (Bratosin et al., 2001). Os primeiros experimentos demonstraram que um dos mais importantes fatores que regula as propriedades da NOS em eritrócitos é a disponibilidade de L-arginina (Kleinbongard et al., 2007). Nesse sentido, em eritrócitos, o ciclo da uréia tem fundamental importância. RBCs expressam a enzima arginase I, a qual hidrolisa a conversão de L-arginina em ornitina e uréia e existem relatos da alteração da atividade dessa enzima em patologias como a diabetes e na anemia falciforme (Özüyaman et al., 2008).

O transporte da L-arginina em eritrócitos é mediado por dois sistemas de transporte: o sistema  $y^+$  e o sistema  $y^+L$ . Está presente uma alteração da atividade desses transportadores em eritrócitos em diversas doenças, como insuficiência renal crônica, hipertensão arterial sistêmica, pré-eclâmpsia e insuficiência cardíaca (Mendes Ribeiro et al., 1997; Moss et al., 2004; da Costa et al., 2004), sendo que essas células são um bom modelo para o estudo da cinética dos transportadores de aminoácidos catiônicos e de seu comportamento em estados patológicos.

Além disso, foi levantada a hipótese de que o NO produzido pelas hemácias pudesse alterar as características funcionais de sua membrana plasmática. Foi previamente demonstrado que doadores de NO são capazes de alterar a fluidez da membrana e a deformabilidade dos eritrócitos (Tsuda et al., 2000; Bor-Kucukatay et al., 2003), e que a incubação de eritrócitos com inibidores da NOS também diminui a deformabilidade dessas células (Kleinbongard et al., 2006; Ozuyaman et al., 2008, Suhr et al., 2009), mostrando que o NO produzido pelas próprias hemácias tem um papel importante em sua função. Cada vez mais tem se dado importância ao NO gerado pela hemácia. Acredita-se que o NO exógeno atravesse a membrana da hemácia e se ligue à hemoglobina, formando S-nitroso hemoglobina como uma forma de armazenamento de NO. Atualmente existe uma teoria de que as hemácias são uma fonte importante de NO na circulação e esse NO estaria envolvido na regulação da função plaquetária (Pawloski et al., 1998) e do fluxo sanguíneo (Jia et al., 1996)

A existência de uma via L-arginina-NO bem estabelecida em eritrócitos e as evidências de que o NO produzido pela própria célula é importante em suas funções, corroboram a importância da avaliação dessa via em diversas patologias.



## 1.4 Hipertensão arterial sistêmica

### 1.4.1 Definição e epidemiologia

A HAS é uma patologia com imensas repercussões sociais devido a sua alta morbidade e mortalidade. De acordo com o VII *Joint National Committee* (VII JNC) são considerados hipertensos pacientes com pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg ou pressão diastólica maior ou igual a 90 mmHg (Quadro 1). Neste mesmo estudo, foi introduzida uma nova classificação, com o termo pré-hipertensão, aplicado aos indivíduos cujos níveis tensionais sistólicos variam entre 129-139 mmHg e diastólicos entre 80-89 mmHg. Todavia, segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão arterial retornam com a classificação em três diferentes estágios de hipertensão (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Nesse estudo optou-se por utilizar a classificação do VII *Joint National Committee* (VII JNC).

**Quadro 1:** Classificação da pressão arterial sistêmica para adultos (Adaptado VII JNC, 2003)

<b>Classificação</b>	<b>Pressão Arterial Sistólica (mmHg)</b>	<b>Pressão Arterial Diastólica (mmHg)</b>
Normal	< 120	e < 80
Pré-hipertensão	120-139	ou 80-89
Hipertensão Estágio 1	140-159	ou 90-99
Hipertensão Estágio 2	≥ 160	ou > 100

Independente da gravidade da hipertensão arterial sistêmica essencial sabe-se que os mecanismos fisiopatológicos propostos para explicar esta síndrome são uma combinação de fatores moleculares, genéticos, cardíacos, renais, hormonais, vasculares e neurais. Se aceita que todos estes mecanismos inter-relacionem-se em

um modelo de mosaico que origine e perpetue a hipertensão arterial (Ribeiro *et al.*, 1997, Passos *et al.*, 2006).

Os dados sobre a prevalência da HAS no Brasil são escassos e, muitas vezes, limitados a determinadas regiões geográficas, principalmente nas regiões sul e sudeste do país (Lessa *et al.* 2001; Passos *et al.*, 2006). No entanto, de acordo com as V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial a hipertensão arterial sistêmica, apresenta uma alta prevalência na população adulta que varia de 22 a 40% no Brasil (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2007). Estima-se que, no mundo, cerca de um bilhão de pessoas apresentem hipertensão essencial e que aproximadamente 7,1 milhões de mortes sejam atribuídas a esta doença (VII JNC, 2003). Dados de estudos observacionais realizados nos anos 90 demonstram que, tanto hipertensão arterial sistólica como diastólica estão associadas com aumento do risco de desenvolvimento de doença cardiovascular e acidentes vasculares encefálicos (Lewington *et al.*, 2002; Passos *et al.*, 2006), sendo que a redução dos níveis tensionais reduz o risco dessas complicações em 20% para doenças cardíacas isquêmicas e em até 40% para acidentes vasculares cerebrais (Turnbull, 2003; VII JNC).

Tanto a hipertensão, como outros fatores de risco convencionais para doença cardiovascular, como hipercolesterolemia, diabetes mellitus e tabagismo estão fortemente associados à disfunção endotelial (Brunner *et al.*, 2005). A presença da disfunção endotelial em pacientes hipertensos é considerada um marcador de eventos cardiovasculares futuros (Panza *et al.*, 1990; Perticone *et al.*, 2001; Münzel *et al.*, 2008). Além da disfunção endotelial, ocorre na hipertensão arterial sistêmica um quadro de hiperagregabilidade plaquetária (Konstantinova *et al.*, 2006) e, segundo Gabbasov, o aumento da agregação plaquetária encontrada em pacientes hipertensos estaria relacionado ao grau de hipertrofia ventricular esquerda e à doença arterial coronariana (Gabbasov *et al.*, 1998)

Neste contexto de disfunção plaquetária e endotelial, o NO teria um papel importante na regulação destes dois mecanismos e, alterações na via L-arginina-NO presentes em pacientes hipertensos poderiam contribuir para os eventos aterotrombóticos tão frequentes nestes indivíduos (Remková & Remko; 2009).

#### 1.4.2 A via L-arginina-NO, ciclo da uréia e estresse oxidativo em hipertensão arterial sistêmica

Apesar de existirem vários estudos na literatura que abordam o papel do NO em hipertensão essencial, os dados ainda são controversos, entretanto a maior parte dos trabalhos indica que há uma diminuição na produção ou ação de NO na vasculatura e em células sanguíneas (Cockcroft *et al.*, 1994; Taddei *et al.*, 1996; Cardillo e Panza, 1998; Holm *et al.*, 2002; Brunini *et al.*, 2005; de Meirelles *et al.*, 2009). Em contraste, outros estudos demonstraram níveis plasmáticos de nitritos e nitratos aumentados tanto em modelos animais como em pacientes hipertensos (Dubei *et al.*, 1996; Campase *et al.*, 1996; Vaziri *et al.*, 1998, Goch *et al.*, 2009).

Além disso, foram constatadas elevações nos níveis plasmáticos de dimetil-L-arginina-assimétrica (ADMA) em hipertensão que poderiam contribuir para a disfunção endotelial e plaquetária observada nestes pacientes (Boger *et al.*, 2005; Perticone *et al.*, 2009). De forma interessante, um estudo desenvolvido em nosso laboratório demonstrou que tanto o ADMA como o N-monometil-L-arginina (L-NMMA) inibe dramaticamente o transporte de L-arginina e NOS em plaquetas humanas, sendo que esse efeito é mais pronunciado em pacientes hipertensos (Brunini *et al.*, 2004, de Meirelles, 2007).

Assim, embora não haja consenso, as evidências apontam para uma inibição da via L-arginina-NO em hipertensão (Cardillo & Panza, 1998; Holm *et al.*, 2002; Brunini *et al.*, 2005). Dessa forma, a baixa disponibilidade de NO pode ser provocada por alterações em diversas etapas da via L-arginina-NO, podendo haver uma baixa produção de NO, elevada degradação por stress oxidativo ou reduzida sensibilidade ao NO (Hermann *et al.*, 2006; Rajapakse *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2008).

A inflamação crônica tem sido identificada como um fator importante na gênese da doença vascular (Croce & Libby, 2007). Ao mesmo tempo, diversos estudos têm mostrado a elevação de marcadores inflamatórios como a proteína C reativa e o fibrinogênio em pacientes com hipertensão (Cottone *et al.*, 2006; de Meirelles *et al.*, 2009; Vyssoulis *et al.*, 2007). Esse estado inflamatório presente nos pacientes hipertensos pode estar envolvido nas disfunções endotelial e plaquetária

bem como alterar a biodisponibilidade do NO em HAS (Boos & Lip, 2006). Além disso, estudos realizados *in vitro* mostram que citocinas são capazes de induzir a expressão e a atividade da arginase em células endoteliais (Nelin *et al.* 2005; Chicoine *et al.*, 2004). Uma vez que a arginase é uma enzima que compete pela L-arginina com a NOS, alterações na atividade dessa enzima poderiam interferir na L-arginina-NO, contribuindo para o prejuízo na síntese de NO observado em hipertensão.

Nosso grupo recentemente demonstrou que há uma redução do transporte de L-arginina via sistema  $y^+L$  em eritrócitos de ratos espontaneamente hipertensos e de pacientes com HAS (Moss *et al.*, 2004). De forma adicional, Schlaich e colaboradores mostraram uma redução do influxo de L-arginina em células mononucleares de pacientes com HAS (Schlaich *et al.*, 2004). Foi observado por nosso grupo também, pela primeira vez, que em hipertensão arterial essencial ocorre uma redução do influxo de L-arginina via sistema  $y^+L$  em plaquetas humanas (Moss *et al.*, 2004). É possível que a diminuição da atividade de transporte de L-arginina em plaquetas através do sistema  $y^+L$  seja responsável pela redução da concentração da L-arginina intracelular limitando a produção de NO em hipertensão. Associado à redução do influxo da L-arginina em plaquetas, foi demonstrado também uma redução da atividade da NOS, medida através da conversão da L-[ $^3H$ ]-arginina em L-[ $^3H$ ]-citrulina, em plaquetas de pacientes hipertensos quando comparadas com controles saudáveis, confirmando os dados da literatura que mostram uma redução na produção de NO em hipertensão arterial, associada com uma hiperagregabilidade plaquetária (Holm *et al.*, 2002; Brunini *et al.*, 2005; de Meirelles *et al.*, 2009). Além disso, evidências do desacoplamento da eNOS e maior atividade da NADPH oxidase, com aumento da produção de superóxido foram descritas em hipertensão arterial, o que levaria a uma redução da biodisponibilidade do NO (Schulz *et al.*, 2008)

## 1.5 Insuficiência renal crônica

### 1.5.1 Definição e epidemiologia

Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Nefrologia a doença renal crônica consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função do rim (glomerular, tubular e endócrina). Estudos no Brasil mostram que a prevalência da disfunção renal é de 0.5 % na população adulta podendo atingir 5% na população idosa (Oliveira *et al.*, 2005). Os pacientes hipertensos diabéticos ou com história de doença renal crônica apresentam uma maior probabilidade de desenvolverem a doença (Romão Júnior, 2004), sendo a hipertensão arterial uma das principais causas de falência renal.

A insuficiência renal pode ser classificada de acordo com a taxa de filtração glomerular (GFR) conforme descrito no quadro 2 (Romão Júnior, 2004).

**Quadro 2:** Classificação da gravidade da falência renal

<b>Estágio</b>	<b>GFR (ml/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>
leve	60-89
moderada	30-59
grave	15-29
terminal	< 15

A medida mais freqüentemente utilizada para avaliação da atividade renal é a taxa de filtração glomerular, que é calculada a partir da mensuração dos níveis séricos de creatinina após ajustes para raça, sexo e idade (Snyder & Pendergraph, 2005). Atualmente, a fórmula Cockcroft-Gault é a mais utilizada para estimar a filtração glomerular (Romão Júnior, 2004):

$$C_{Cr} = \frac{(140 - \text{idade}) \times \text{peso}}{72 \times S_{Cr}} \times 0.85 \text{ (caso seja mulher), onde:}$$

$C_{Cr}$  = depuração de creatinina;

$S_{Cr}$  = concentração sérica de creatinina (em mg/dL);

Idade em anos e peso em Kg

Com a progressão da doença, os rins perdem a capacidade de controlar o meio interno tornando-se necessários métodos de depuração artificial de sangue (hemodiálise e diálise peritoneal) ou transplante renal. No entanto, o transplante renal não é uma opção viável para a maioria dos pacientes, sendo que 50% dos pacientes em hemodiálise irão a óbito antes de 4 anos de tratamento (Perosa & Genzini, 1999; El Nahas & Bello, 2005; Oliveira *et al.*, 2005).

A síndrome urêmica, que surge ao longo do curso da IRC gera uma constelação de sinais clínicos e sintomas (El Nahas & Bello, 2005; Zandi-Nejad & Brenner, 2005). Esta síndrome surge como conseqüência do acúmulo de metabólitos (toxinas) combinado com a falha das funções endócrinas e homeostáticas do rim (El Nahas & Winearls, 1996; El Nahas & Bello, 2005, Zandi-Nejad & Brenner, 2005). Ela é caracterizada clinicamente por mal-estar, fraqueza, náusea e vômito, câibra muscular, prurido, alterações de paladar, e freqüentemente dano neurológico, decorrente de um nível inaceitável de resíduos nitrogenados (Wilkins, 1998; Yavuz *et al.*, 2005).

As principais causas de co-morbidade e mortalidade nos pacientes com insuficiência renal crônica são as complicações cardiovasculares (Moe & Chen, 2004; Campean *et al.*, 2005; Guérin *et al.*, 2006). No entanto, tem sido demonstrado que os fatores de risco cardiovascular tradicionais explicam apenas parcialmente a elevada incidência da doença cardiovascular nesses pacientes (Fort, 2005; Brunini *et al.*, 2006). Por outro lado, alguns fatores de risco tradicionais como a hipercolesterolemia e a obesidade, estão associados com um melhor prognóstico nos pacientes com IRC. A explicação para esse fenômeno denominado de “epidemiologia reversa ou paradoxal” permanece incerta (Nurmohamed & Nubé, 2005). Nesse contexto, torna-se crescente a busca de fatores de risco não-tradicionais para os eventos cardiovasculares nos pacientes com IRC, incluindo a desnutrição, estresse oxidativo e a inflamação (Fort, 2005; Brunini *et al.*, 2006).

Os estudos mostram que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte entre os indivíduos portadores de doença renal crônica em tratamento de substituição renal (Guzon *et al.*, 2006). Além disso, um recente estudo realizado por

Van Biesen e colaboradores mostrou que, mesmo os pacientes com insuficiência renal crônica moderada, apresentam um risco maior de morte por doença cardiovascular (Van Biesen *et al.*, 2007).

### 1.5.2 A via L-arginina-óxido nítrico na insuficiência renal crônica

Apesar da alta incidência de eventos trombóticos existentes na IRC, freqüentemente os pacientes urêmicos apresentam tempo de sangramento prolongado (Noris & Remuzzi, 1999; Mendes Ribeiro & Brunini, 2004). Um mecanismo proposto para explicar essa alteração na hemostasia observada nos urêmicos poderia ser a produção aumentada de NO, tanto endotelial como plaquetária. Estudos prévios comprovam que plaquetas humanas de pacientes renais em hemodiálise têm uma ativação do transporte de L-arginina para o interior da célula via sistema  $\gamma^+L$ , e sintetizam mais NO que controles (Noris & Remuzzi, 1999; Brunini *et al.*, 2003), associado a uma redução da função plaquetária (Kaw & Malhotra, 2006, da Silva, 2005). Estas alterações no influxo da L-arginina não se restringem às plaquetas. Além disso, estudos realizados em nosso laboratório mostraram um aumento do transporte pelo sistema  $\gamma^+$  em eritrócitos de pacientes renais crônicos em hemodiálise e em tratamento conservador, tendo sido evidenciado resultado semelhante em linfócitos (Brunini *et al.*, 2005; Brunini *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006).

A ativação inflamatória existente na insuficiência renal e sua relação com a mortalidade e morbidade têm sido estudada por vários grupos de pesquisa. Diversos trabalhos demonstram uma elevação de marcadores inflamatórios sistêmicos como a proteína C reativa e citocinas como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 no plasma de pacientes desde as fases iniciais da IRC e estes últimos parecem ter um papel na patogênese desta síndrome (Psychari *et al.*, 2005; Brunini *et al.*, 2005, Wong *et al.*, 2007). Os mecanismos exatos que levam a um aumento na produção de citocinas ainda são desconhecidos. Estudos mostram que as citocinas são capazes de regular a via L-arginina-NO através de indução da iNOS e de transportadores de L-arginina na

vasculatura e miocárdio, aumentando dessa forma a produção de NO. De maneira oposta, certas citocinas podem diminuir a produção de NO agindo diretamente sobre eNOS ou aumentando a atividade da enzima arginase (Mendes Ribeiro *et al.*, 2004; Durante *et al.*, 2007).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O presente estudo visa investigar em detalhe a modulação da via L-arginina-NO-GMPc e do ciclo da uréia em hipertensão e em diferentes estágios da IRC, bem como avaliar marcadores de estresse oxidativo em células sanguíneas e sistemicamente desses pacientes.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade da NOS em eritrócitos de pacientes hipertensos.

Detectar a presença das isoformas da arginase em eritrócitos, bem como dosar sua atividade nessas células na HAS.

Investigar os efeitos da HAS na fragilidade osmótica eritrocitária.

Dosar através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico os níveis de peroxidação lipídica em eritrócitos, plaquetas e no plasma de pacientes hipertensos.

Avaliar a expressão das isoformas da NOS, da GC e da PDE5 em plaquetas de pacientes hipertensos e em controles.

Investigar o ciclo da uréia em plaquetas através da expressão das isoformas da arginase, bem como de sua atividade em plaquetas.

Avaliar a atividade e a expressão da NOS em plaquetas de pacientes portadores de IRC em tratamento conservador.

Comparar os valores da agregação plaquetária induzida por concentrações crescentes de colágeno e de ADP obtidos no plasma rico em plaquetas de pacientes portadores de IRC em tratamento conservador e de controles.

Dosar o conteúdo de GMPc intraplaquetário em pacientes com IRC em tratamento conservador e de controles.

Investigar o transporte de L-arginina, e a atividade da NOS em eritrócitos de pacientes com IRC em hemodiálise.

Avaliar a atividade e a expressão da arginase em eritrócitos de pacientes com IRC em hemodiálise.

Quantificar a fragilidade osmótica eritrocitária de pacientes com IRC em hemodiálise.

Dosar através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico os níveis de peroxidação lipídica em eritrócitos, plaquetas e no plasma de pacientes com IRC em hemodiálise.

Avaliar a expressão das isoformas da NOS, da GC e da PDE5 em plaquetas de pacientes com IRC em hemodiálise e em controles.

Avaliar a atividade e a expressão da arginase em plaquetas de pacientes com IRC em hemodiálise.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Seleção de Controles e Pacientes

Participaram do estudo, 18 pacientes classificados com hipertensão estágio 1, (tabela 1) como pressão arterial sistólica entre 140 e 159 mmHg ou diastólica entre 90 e 99 mmHg (JNC VII, 2003) ( $48 \pm 4$  anos) do ambulatório de Medicina Interna do Hospital Universitário Pedro Ernesto e 20 controles ( $51 \pm 3$  anos). Critérios de exclusão foram: cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, transfusão recente, infecção e uso de medicamentos anti-plaquetários (tabela 2).

**Tabela 2:** Características clínicas e laboratoriais dos pacientes hipertensos e controles.

Dados	Controles	Pacientes HAS
Número de pacientes	20	18
Idade (anos)	$51 \pm 3$	$48 \pm 4$
Sexo, M/F	9/11	3/8
IMC	$23 \pm 0,5$	$25 \pm 3$
Glicose	$93 \pm 3$	$100 \pm 3$
Uréia	$32 \pm 7$	$39 \pm 5$
Creatinina	$1,0 \pm 0,03$	$1,0 \pm 0,09$
Colesterol total (mg/dL)	$180 \pm 19$	$175 \pm 8$
LDL colesterol	$109 \pm 11$	$105 \pm 13$
HDL colesterol	$43 \pm 4$	$37 \pm 4$
Triglicerídeos	$139 \pm 8$	$140 \pm 11$

Para o estudo da IRC, foram selecionados 24 pacientes com insuficiência renal crônica moderada (tabela 3) sem a necessidade de realização de hemodiálise ou diálise peritoneal (taxa de filtração glomerular entre 30-59 ml/min/1,73m<sup>2</sup>)

oriundos do Hospital Universitário Antônio Pedro e 21 controles pareados por idade e sexo. Para o estudo com pacientes portadores de IRC em estágio terminal, foram selecionados 22 pacientes em hemodiálise há pelo menos 6 meses e 20 indivíduos saudáveis (tabela 4) pareados por idade provenientes da Clínica de hemodiálise DERT (Depuração Extra Renal e Transplante), tendo sido utilizados os mesmos critérios de exclusão adotados nos pacientes com hipertensão. O presente estudo teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (processo 450 e 451-CEP/HUPE) (Anexos 1 e 2), e foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes (Anexo 3).

**Tabela 3:** Características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento conservador e controles

<b>Dados</b>	<b>Controles</b>	<b>Pacientes IRC</b>
Número de pacientes	21	24
Idade (anos)	54 ± 7	55 ± 3,7
Sexo (masculino/feminino)	11/10	11/13
Índice de massa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	22 ± 0,6	24 ± 1,3
Uréia (mmol/L)	23 ± 1	80 ± 7*
Clearance (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	93 ± 1	27 ± 3*
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4,2 ± 0,1	4,7 ± 0,1*
Colesterol total (mg/dL)	168 ± 12	172 ± 9
Glicose (mmol/L)	78 ± 5	97 ± 6*
Hemoglobina (g/dL)	13 ± 0,4	11 ± 0,6*
Plaquetas (x 10 <sup>9</sup> / L)	241 ± 31	215 ± 16
Hipertensão	...	22

\*p<0,05 vs. controle

**Tabela 4:** Características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de insuficiência renal em hemodiálise e controles

<b>Dados</b>	<b>Controles</b>	<b>Pacientes IRC</b>
Número de pacientes	20	22
Idade (anos)	51 ± 3	52 ± 1,9
Sexo, M/F	9/11	10/12
Meses em diálise	-	71 ± 8
Sessão de diálise, min	-	240
Kt/ V uréia	-	1,39 ± 0,03
Hipertensão	-	18
IMC	23 ± 0,5	20 ± 0,5*
Albumina (g/dL)	4,4 ± 0,6	3,8 ± 0,2
Dose EPO, unids/semana	-	4000
Hemoglobina (g/dL)	14 ± 0,9	10,9 ± 0,3*
Colesterol total (mg/dL)	180 ± 19	172 ± 4,9

\* p<0,05 vs. controle

### 3.2 Análise clínica e laboratorial dos pacientes

Os dados clínicos referentes aos pacientes, necessários ao estudo, foram coletados utilizando-se o Protocolo do Laboratório de Transporte de Membrana elaborado previamente (Anexos 4 e 5). As avaliações bioquímica, hematológica e imunológica foram feitas no laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto ou na clínica DERT (Depuração Extra Renal e Transplante).

### 3.3 Transporte de L-arginina em eritrócitos

Nos experimentos de transporte de L-arginina em eritrócitos, o sangue é coletado em tubos contendo heparina. Após centrifugação (7000 rpm, durante 5

minutos), o plasma é isolado e os eritrócitos são lavados com solução salina. A seguir, as hemácias são incubadas por três horas a 37°C para eliminar a *trans*-estimulação. Subsequentemente, os eritrócitos são novamente lavados com solução salina por três vezes. A suspensão de eritrócitos é dividida em duas partes, adicionando-se em uma delas 0,2 mM de N-etil-maleimida (NEM), um inibidor irreversível do sistema  $\gamma^+$ . Incubam-se ambas as suspensões por 20 min a 37°C, seguidas de lavagem com solução salina. As células são resuspensas em solução salina. A seguir, L-arginina tritiada (5-500  $\mu$ M) é adicionada às alíquotas de suspensão, incubadas então por 5 minutos a 37°C. O transporte de L-arginina é interrompido através do resfriamento rápido e a seguir as células são lavadas com uma solução de  $MgCl_2$  seguido de centrifugação. Finalmente, os eritrócitos são lisados com Triton X-100 (0,1 %) e as proteínas precipitadas com ácido tricloroacético. Após centrifugação, o sobrenadante é transferido para tubos de cintilação e a radioatividade contada através de um aparelho de contagem de cintilação.

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:

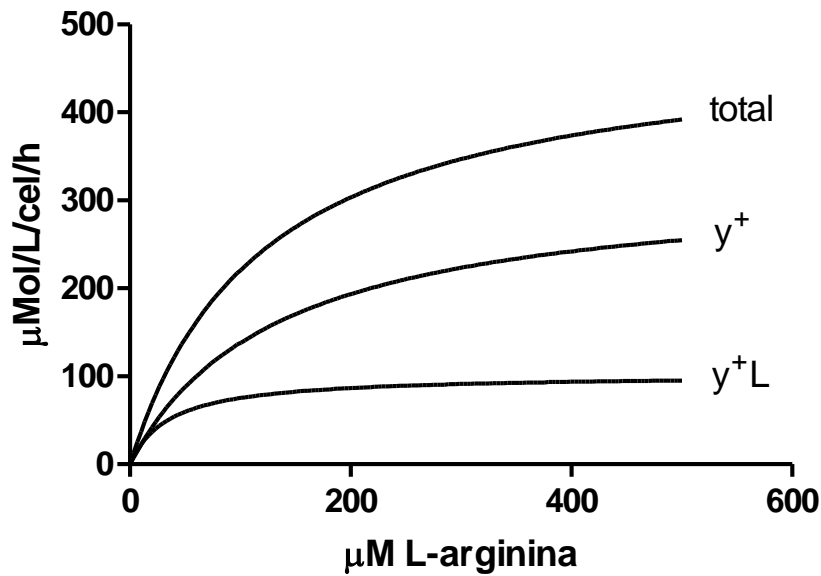
V= velocidade do fluxo

$V_{max}$ = 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  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $K_m$ , foi utilizado o programa comercial GraphPad Prism 5.0.

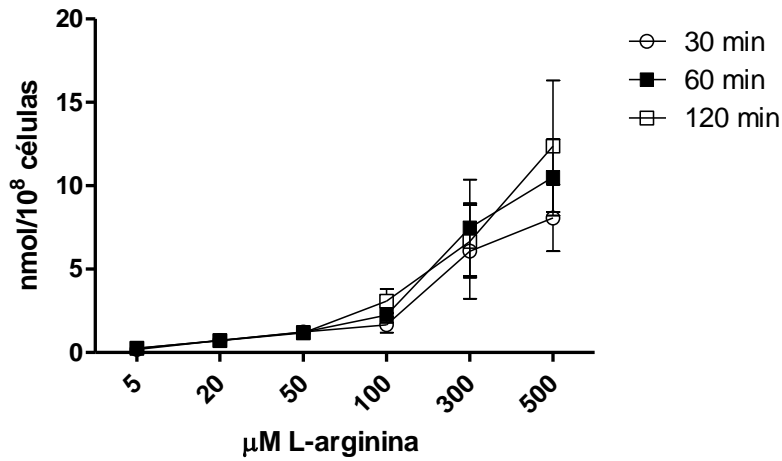


**Figura 6:** Exemplo ilustrativo das curvas de saturação dos sistemas de transporte de L-arginina.

### 3.4 Análise da atividade da NOS em eritrócitos

A atividade de NOS é acessada pela conversão de L-[<sup>3</sup>H]-arginina em L-[<sup>3</sup>H]-citrulina em um protocolo adaptado dos experimentos em plaquetas. A suspensão de eritrócitos será incubada na presença de L-[<sup>3</sup>H]-arginina. A reação é interrompida por rápida centrifugação seguida por lavagem com solução de MgCl<sub>2</sub>. As células são lisadas com Tryton e as proteínas precipitadas com ácido tricloroacético. As amostras são então centrifugadas e o sobrenadante é transferido para uma coluna contendo a resina Dowex. L-[<sup>3</sup>H]-citrulina é removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade contada. Primeiramente foram realizados experimentos em eritrócitos de pacientes saudáveis (n=3) para a determinação da concentração de L-arginina a ser utilizada e o tempo de incubação. Foram então testadas diferentes concentrações de L-arginina (5, 20, 50, 100, 300 e 500 μM) incubando-se as amostras durante 30, 60 e 120 minutos. Posteriormente,

para os experimentos com pacientes foi padronizada a dose de 100  $\mu\text{M}$  de L-arginina com incubação de 120 minutos.

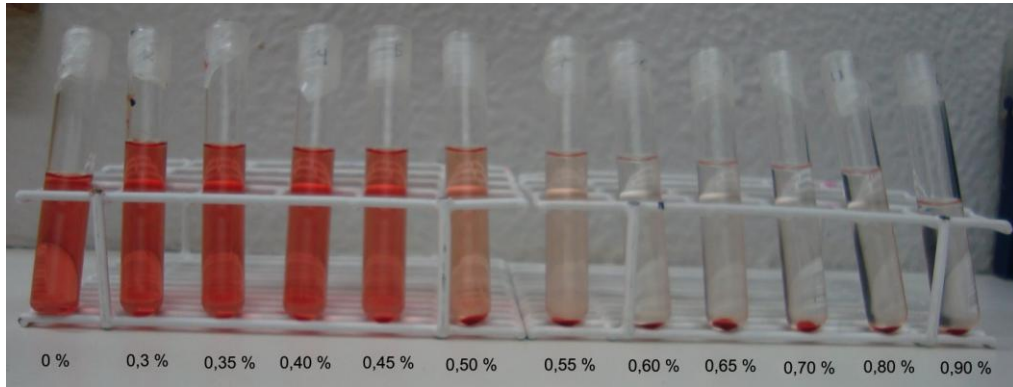


**Figura 7:** produção de L-citrulina em eritrócitos de pacientes saudáveis. Foram testadas diferentes concentrações de L-arginina e diferentes tempos de incubação.

### 3.5 Análise da fragilidade osmótica

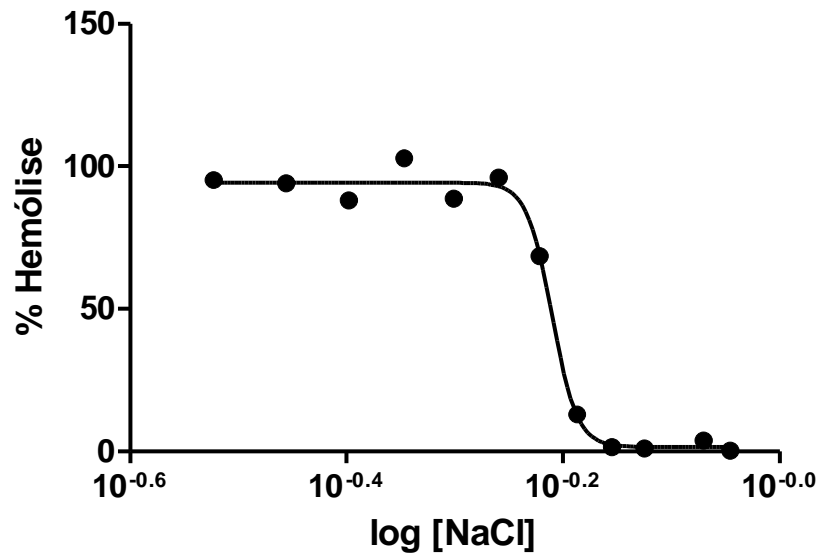
Para os experimentos de fragilidade osmótica o sangue foi coletado em tubos contendo heparina e as hemácias foram isoladas por centrifugação. As células foram então lavadas duas vezes com solução salina e uma alíquota de 12,5  $\mu\text{l}$  de papa de hemácias foi adicionada a tubos de ensaio contendo uma solução com diferentes concentrações de NaCl (0 a 0,9%) (figura 8).





**Figura 8:** Registro da hemólise provocada por diferentes concentrações de NaCl.

Os tubos foram então gentilmente homogeneizados e as amostras incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período os tubos foram então centrifugados por 5 minutos à 1500 rpm. Os supernadantes foram então isolados e transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura das densidades óticas (DO) em um leitor de microplacas a 540 nm. A DO do tubo contendo apenas água foi considerada como 100% de hemólise e a partir daí foram calculadas as porcentagens de hemólise das demais concentrações de NaCl. Após o cálculo das porcentagens de hemólise, foram plotadas curvas de fragilidade com os valores de hemólise e sua concentração de NaCl correspondente (figura 9) . Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 para o cálculo da concentração de NaCl responsável por 50% de hemólise (IC50) utilizando uma função do tipo 4-parâmetros.



**Figura 9:** Exemplo ilustrativo de uma curva de fragilidade osmótica de um paciente saudável.

### 3.6 Análise da atividade da NOS plaquetária

A atividade basal de NOS foi avaliada pela conversão de L-[<sup>3</sup>H]-arginina em L-[<sup>3</sup>H]-citrulina.

L-[<sup>3</sup>H]-arginina (1 μM) é adicionada à suspensão de plaquetas, que é incubada a 37°C por 45 minutos. A reação é interrompida por rápida centrifugação, 14000 rpm por 15 segundos, seguida por duas lavagens com solução de Krebs (descrever Krebs). As plaquetas são lisadas com Tryton (0,1%) e transferidas para uma coluna contendo a resina Dowex. L-[<sup>3</sup>H]-citrulina é removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade medida em um aparelho de cintilação.

### 3.7 Atividade da arginase em plaquetas e eritrócitos

A atividade da arginase foi avaliada em lisado de plaquetas e eritrócitos de pacientes e controles. As plaquetas e os eritrócitos foram isolados por centrifugação e submetidos a um tampão de lise contendo inibidores de proteases, seguido por um processo de ruptura das células por ultrassom. As amostras foram centrifugadas por 14000 rpm a 4°C por 15 minutos para a retirada de debris celulares e o sobrenadante foi armazenado para dosagem de proteína.

Uma alíquota do lisado de plaquetas foi incubada com uma solução de cofatores da arginase (Tris-HCl 9 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM) e [C<sup>14</sup>]-L-arginina 100µM por 2 horas a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de solução de uréia 100 mM e acetato de sódio 250 mM a 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma coluna contendo resina Dowex 50W-X8 para remover a não metabolizada e a [C<sup>14</sup>]-uréia foi quantificada pela leitura em um contador de cintilação.

### 3.8 Extração de proteínas e western blotting

Foi avaliada a expressão das isoformas endotelial e induzível da NOS, arginase I e II, fosfodiesterase 5 e subunidade β<sub>1</sub> da guanilato ciclase solúvel em plaquetas e arginase I e II em eritrócitos através de Western Blotting. As proteínas foram extraídas a partir do isolamento de plaquetas e eritrócitos de pacientes e controles por centrifugação. A dissolução dos pellets de plaquetas e eritrócitos foi realizada em tampão de extração de proteínas (Quadro 3) 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. O sobrenadante foi armazenado a -80°C até a sua utilização.

Os ensaios de Western Blotting foram realizados com 20 µg de proteína dos lisados de plaquetas e 40 µg do lisado de hemácias suspensos em tampão de

amostra (Quadro 4) 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 5). A transferência para as membranas de PVDF (Invitrogen - CA) foi feita em tampão de transferência (Quadro 6) com voltagem de 15V por 45 minutos.

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais para eNOS e iNOS (BD Biosciences – UK), arginase I e II, fosfodiesterase 5 e subunidade  $\beta_1$  da guanilato ciclase solúvel (Santa Cruz) na concentração de 1:1000. O procedimento empregado para detecção, por sua vez, foi o sistema baseado em quimioluminescência Westerbreeze (Invitrogen - CA). Foram utilizados como padrão de peso molecular o Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (GE Healthcare – EUA) e como controles positivos lisados de macrófagos e células endoteliais, rim e fígado (BD Biosciences Pharmingen). As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o programa Adobe Photoshop 7.0.

**Quadro 3:** Composição do tampão de extração de proteínas pH =7,5

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

**Quadro 4:** Composição do tampão de amostra pH= 6,8

Reagente	Concentração
<b>Tris</b>	200 mM
<b>SDS</b>	8%
<b>Glicerol</b>	40%
<b>B-mercaptoetanol</b>	8%
<b>Azul de bromofenol</b>	0,4%

**Quadro 5:** Composição do tampão de corrida

Reagente	Concentração
<b>Tris</b>	250 mM
<b>Glicina</b>	1,92 M
<b>SDS</b>	1%

**Quadro 6:** Composição do tampão de transferência.

Reagente	Concentração
<b>Glicina</b>	0,2 M
<b>Tris</b>	25 mM
<b>SDS</b>	0,10%
<b>Etanol</b>	18%

### 3.9 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada em soro, plaquetas e eritrócitos de pacientes e controles através da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras são misturadas com ácido tricloroacético a

10%, centrifugadas e o sobrenadante é incubado com ácido tiobarbitúrico a 0,67% por 30 minutos a 100°C. As TBARS são determinadas na absorbância de 532 nM e são expressas como equivalentes de malondialdeído (nmol/mg de proteína).

### **3.10 Agregação plaquetária**

No protocolo utilizado nesse estudo, inicialmente, o sangue coletado é anticoagulado com sódio trissódio a 3,8% e posteriormente centrifugado a 180g por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas (PPP) é obtido por centrifugação de 800g por 10 minutos. A concentração plaquetária do PRP é ajustada com o PPP para uma contagem constante de  $1,5 \times 10^8$ /mL. A agregação é induzida por colágeno (2µg/mL, 4µg/mL e 8µg/mL) e a resposta é monitorada por 5 minutos em um agregômetro de 4 canais (Chrono-Log). Os testes são feitos a 37°C com uma velocidade de rotação de 900 rpm. A agregação máxima é expressa em percentual.

### **3.11 Mensuração de GMP cíclico intracelular**

Inicialmente as plaquetas são pré-incubadas com 200 µM de IBMX (inibidor de fosfodiesterase) por 30 minutos. Em seguida, ácido perclórico é adicionado à suspensão de plaquetas, as células são lisadas em ultrassom e congeladas rapidamente em nitrogênio. Posteriormente, as células fragmentadas passam por uma centrifugação. Os sobrenadantes contendo GMPc são coletados e estocados a -80°C, até a leitura por um ensaio enzimático utilizando o método ELISA (Kit Cayman).

### 3.12 Dosagem de proteína

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

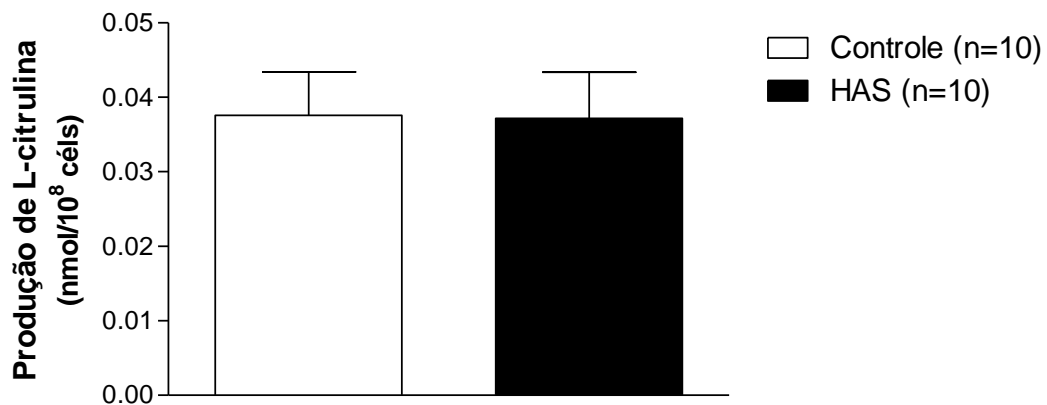
### 3.13 Análise estatística

Os dados serão apresentados como média  $\pm$  EP. A significância estatística será considerada quando  $p < 0.05$ . Foi utilizado o teste t de student para comparar médias de dois grupos quando a distribuição da amostra for normal. Caso contrário será aplicado o teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0.05$ . Os cálculos estatísticos e o preparo dos gráficos foram realizados através do programa de computador GraphPad Prism 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na atividade da NOS em eritrócitos

Não houve diferença significativa na atividade basal da NOS em eritrócitos, medida através da conversão da L-arginina em L-citrulina, em pacientes hipertensos ( $0,037 \pm 0,006$  nmol/ $10^8$  células, n=10) comparado com controles ( $0,037 \pm 0,005$  nmol/ $10^8$  células, n=10) (Figura 10).



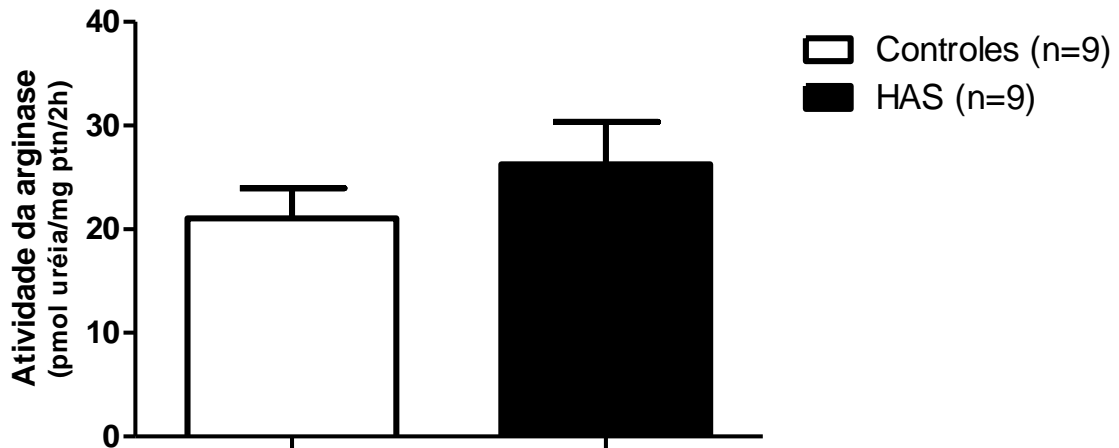
**Figura 10:** Produção basal de L<sup>[3H]</sup>-citrulina em eritrócitos de pacientes hipertensos e controles.

### 4.2 Efeitos da hipertensão arterial Sistêmica na atividade da arginase em eritrócitos

Na amostra estudada, não foi verificada uma redução na atividade da arginase, medida através da conversão da [C<sup>14</sup>]-L-arginina em [C<sup>14</sup>]-uréia (pmol



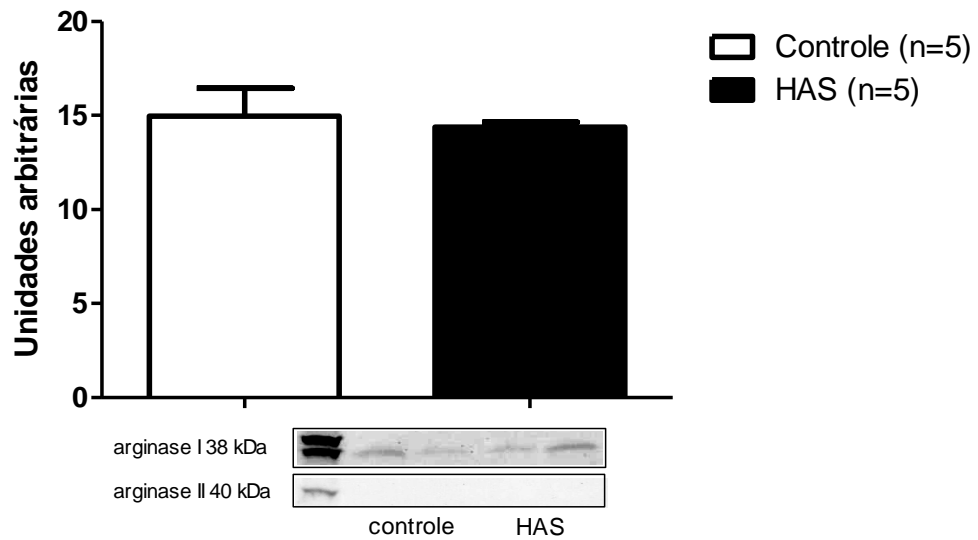
uréia/mg proteína/2h), em eritrócitos de pacientes hipertensos ( $26,23 \pm 4,1$ ) e controles ( $21,04 \pm 2,8$ ) (Figura 11).



**Figura 11:** Atividade da arginase em eritrócitos de pacientes hipertensos e controles.

#### 4.3 Expressão da arginase em eritrócitos na hipertensão arterial sistêmica

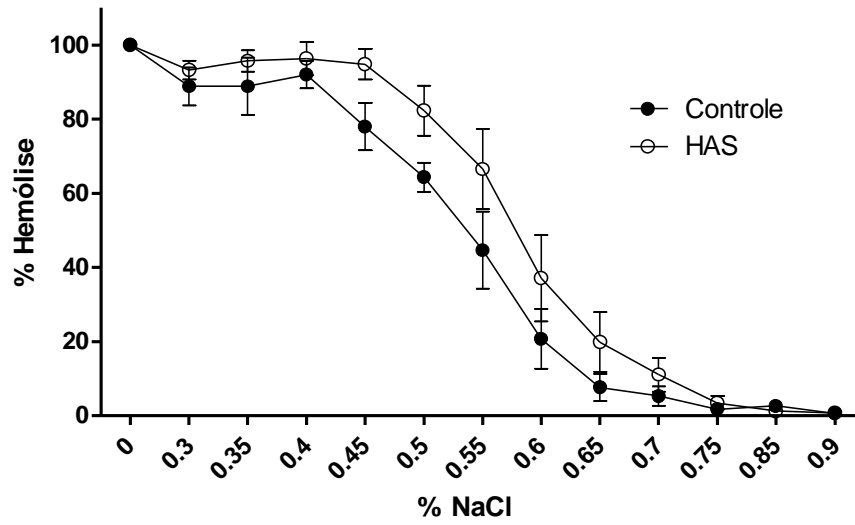
Foi detectada a presença da enzima arginase I em eritrócitos humanos. Todavia não houve diferença significativa no padrão de expressão dessa isoforma da enzima entre eritrócitos de controles e de pacientes hipertensos ( $14,9 \pm 1,4$  vs  $14,3 \pm 0,2$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ). Não foi detectada a arginase II em eritrócitos humanos (Figura 12).



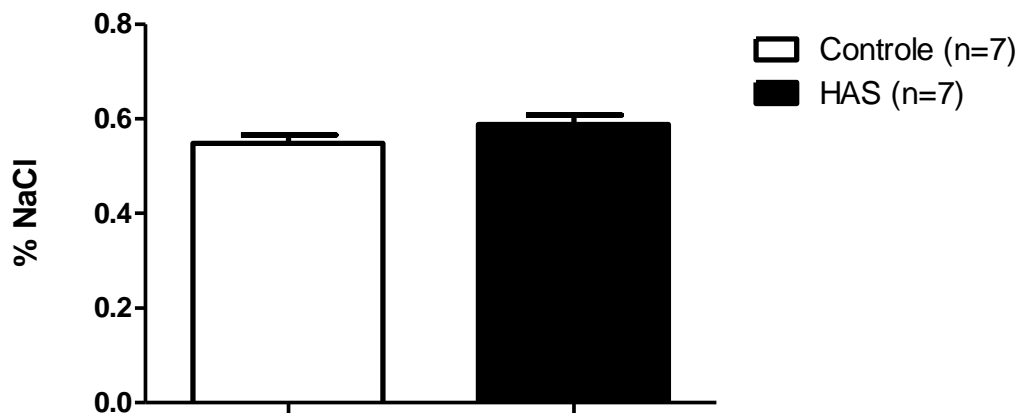
**Figura 12:** Expressão das isoformas de arginase I e II em eritrócitos de controles e pacientes hipertensos.

#### 4.4 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na fragilidade osmótica de eritrócitos

Foram realizadas curvas de fragilidade osmótica em hemácias de controles e de pacientes hipertensos. Embora as curvas (Figura 13) mostrem um ligeiro desvio para a direita, não houve diferença significativa em relação ao IC50 (%) entre pacientes hipertensos ( $0,58 \pm 0,01$ ) e controles ( $0,54 \pm 0,01$ ) (Figura 14).



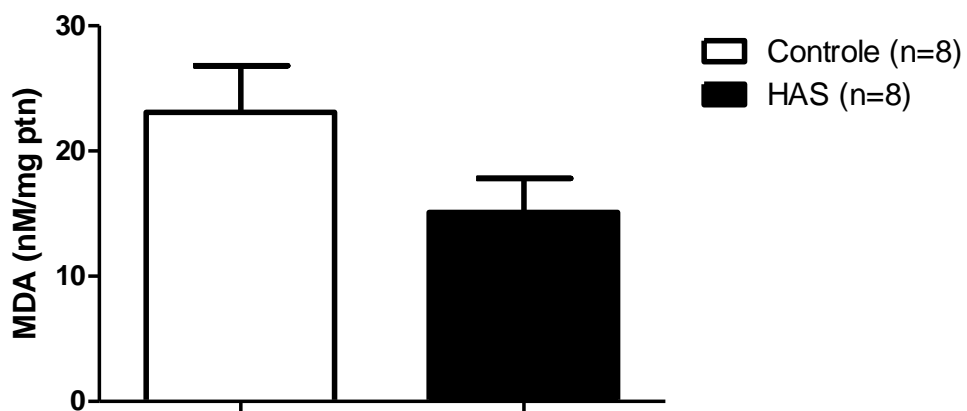
**Figura 13:** Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes e controles (n=7 em cada grupo).



**Figura 14:** IC50 da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes hipertensos e controles.

#### 4.5 Avaliação da peroxidação lipídica em eritrócitos

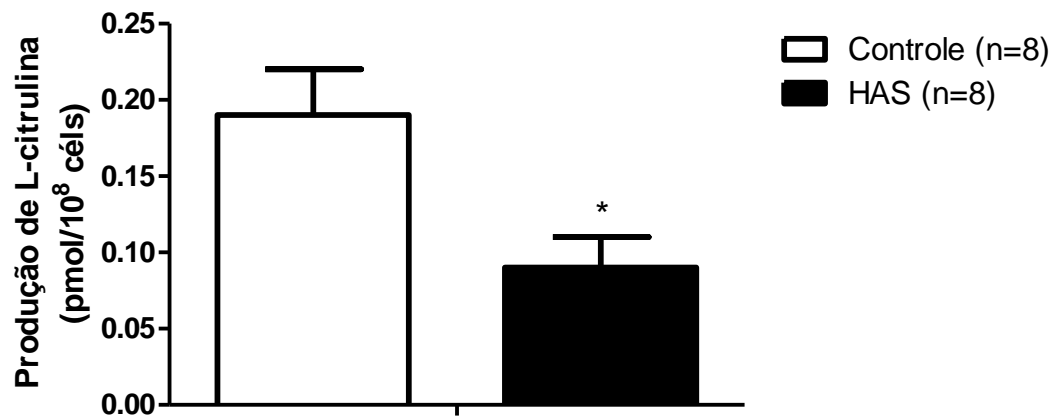
A avaliação da peroxidação lipídica (marcador de stress oxidativo) de eritrócitos através da dosagem de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (pmol/mg de proteína) não mostrou diferença significativa entre os pacientes hipertensos ( $15,08 \pm 2.7$ ) e controles ( $23,09 \pm 3.7$ ) (Figura 15).



**Figura 15:** Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em eritrócitos de pacientes e controles.

#### 4.6 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na atividade da NOS em plaquetas

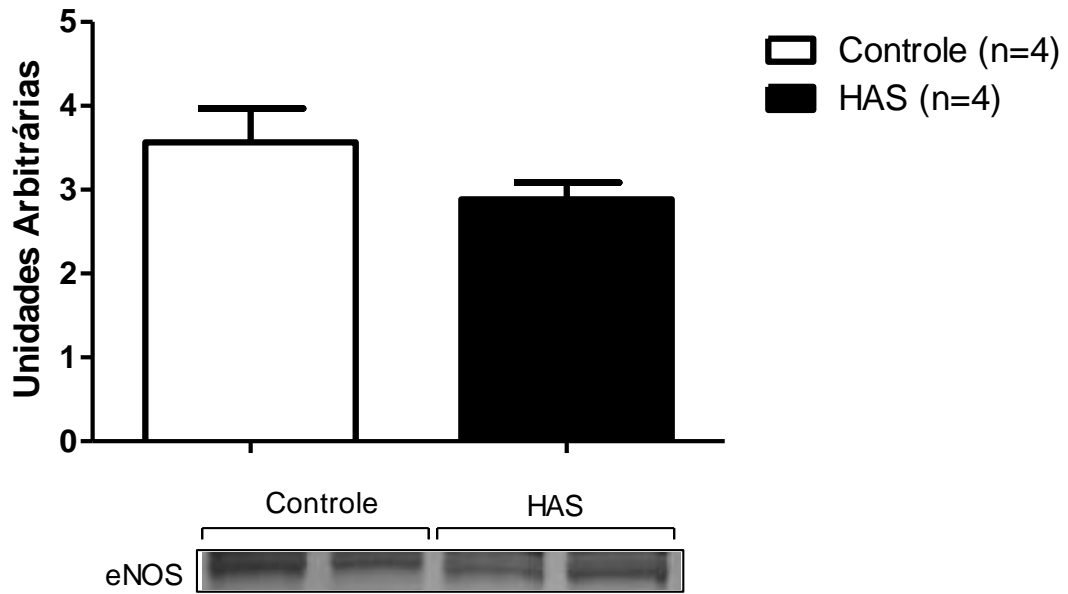
A atividade basal da NOS em plaquetas, medida através da conversão da L-arginina em L-citrulina, estava diminuída nos pacientes hipertensos ( $0,09 \pm 0,02$  pmol/ $10^8$  céls, n=8) comparado com controle ( $0,19 \pm 0,03$  pmol/ $10^8$  céls, n=8).



**Figura 16:** Atividade da NOS em plaquetas de pacientes hipertensos e controles (\*  $p < 0,05$ ).

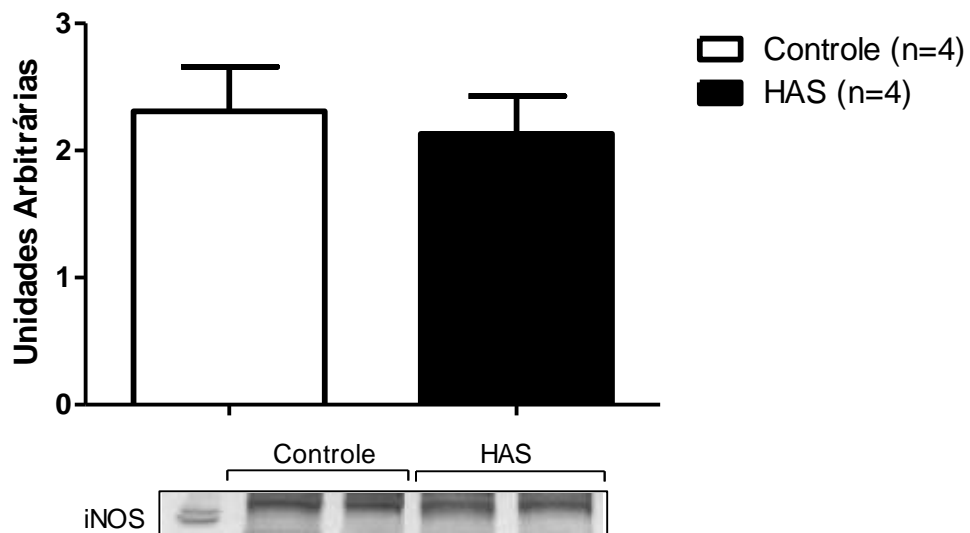
#### 4.7 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na expressão das isoformas da NOS em plaquetas

A avaliação da expressão da enzima NOS endotelial realizada por Western Blotting dada em unidades arbitrárias mostra que as plaquetas humanas expressam essa enzima de forma constitutiva, e sua expressão foi semelhante entre pacientes hipertensos ( $3,5 \pm 0,4$ ;  $n=4$ ) e controles ( $2,8 \pm 0,1$ ;  $n=4$ )



**Figura 17:** Expressão da NOS endotelial em plaquetas de pacientes hipertensos e controles.

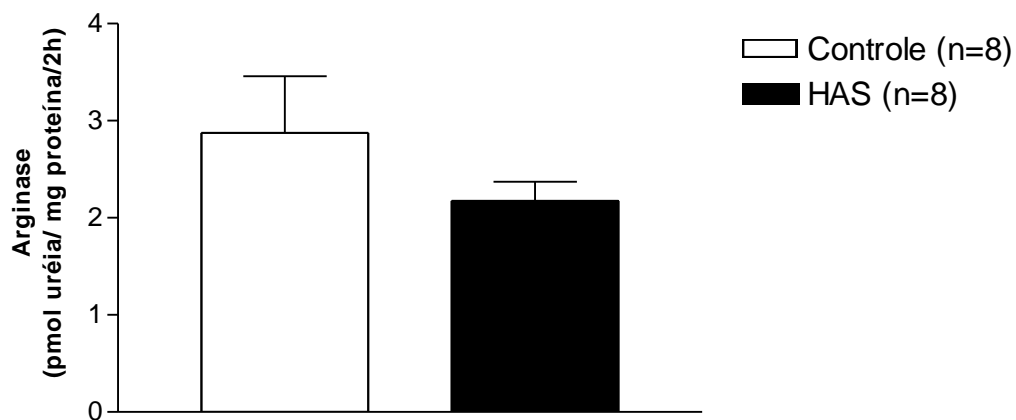
O Western Blotting de lisado de plaquetas mostrou que tanto pacientes hipertensos como controles expressam a enzima NOS induzível, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos ( $2,3 \pm 0,3$  vs  $2,1 \pm 0,2$ ).



**Figura 18:** Expressão da NOS induzível em plaquetas de pacientes hipertensos e controles.

#### 4.8 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na atividade da arginase em plaquetas

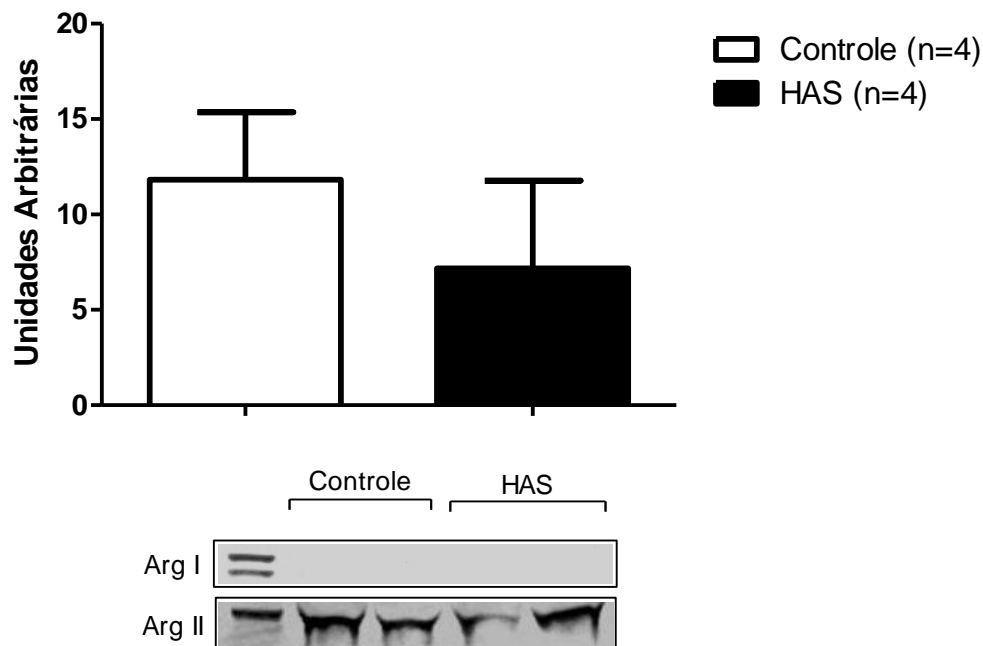
Não foi observada diferença significativa na atividade da arginase (pmol uréia/mg proteína/2h), avaliada através da conversão da [C<sup>14</sup>]L-arginina em [C<sup>14</sup>]-uréia, em plaquetas de pacientes com HAS ( $2,1 \pm 0,1$ ; n=8) e controles ( $2,8 \pm 0,5$ ; n=8) (Figura 19).



**Figura 19:** Atividade da arginase em plaquetas de pacientes hipertensos e controles

#### 4.9 Efeitos da hipertensão arterial sistêmica na expressão das isoformas da arginase em plaquetas

Não foi observada expressão da arginase I em plaquetas humanas (tanto em controles como na HAS). No entanto, foi observada a presença da isoforma da arginase II (unidades arbitrárias), muito embora não tenha sido detectada diferença estatística entre os grupos ( $11,8 \pm 3$  vs  $7,1 \pm 4$ ).

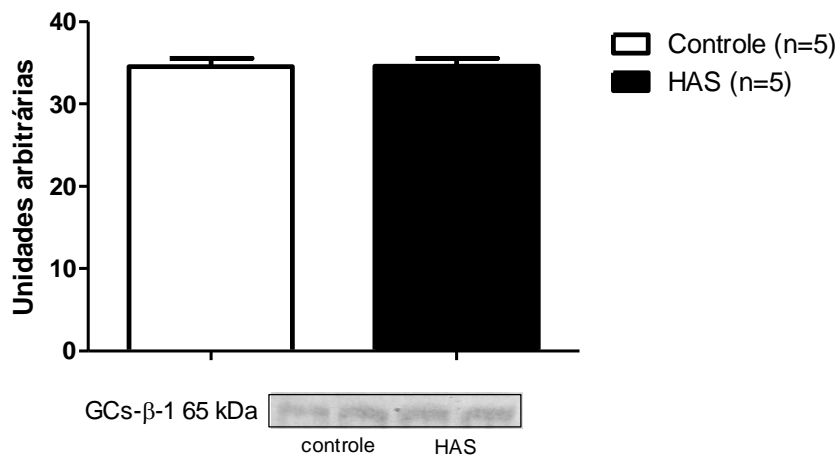


**Figura 20:** Expressão das isoformas da arginase I e II em plaquetas humanas. A primeira banda corresponde ao controle positivo (lisado de fígado na arginase I e lisado de rim na arginase II).

#### 4.10 Expressão da guanilato ciclase solúvel em plaquetas na hipertensão arterial sistêmica

Foi avaliada a expressão da subunidade  $\beta_1$  da enzima guanilato ciclase em plaquetas humanas. Não foi observada diferença significativa na expressão dessa enzima em plaquetas de controles ( $34,5 \pm 0,9$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ) e de pacientes hipertensos ( $34,6 \pm 0,9$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ) (Figura 21).

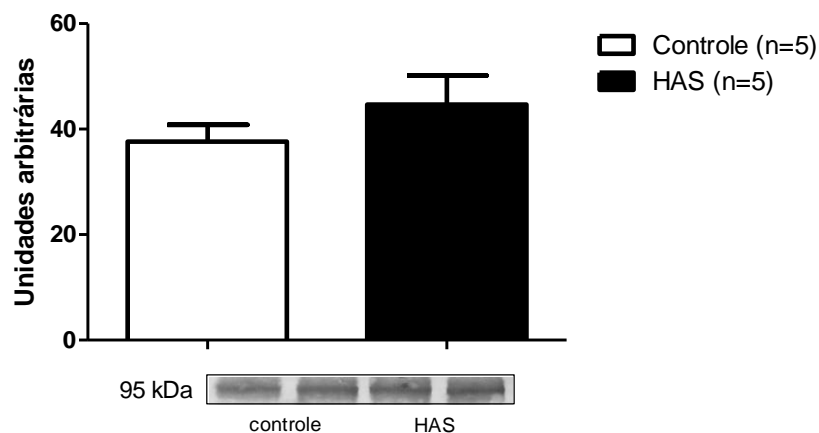




**Figura 21:** Expressão da GCs em plaquetas de controles e pacientes portadores de HAS.

#### 4.11 Expressão da fosfodiesterase 5 em plaquetas na hipertensão arterial sistêmica

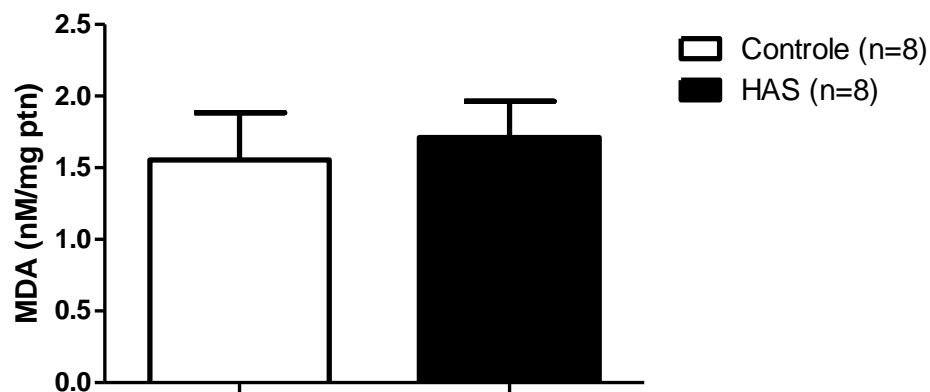
Não foi observada diferença significativa na expressão dessa enzima PDE5 em plaquetas de controles ( $37,6 \pm 3,1$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ) e de pacientes hipertensos ( $44,6 \pm 5,4$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ) (Figura 22).



**Figura 22:** Expressão da PDE5 em plaquetas de controles e pacientes portadores de HAS.

#### 4.12 Avaliação da peroxidação lipídica em plaquetas em pacientes hipertensos

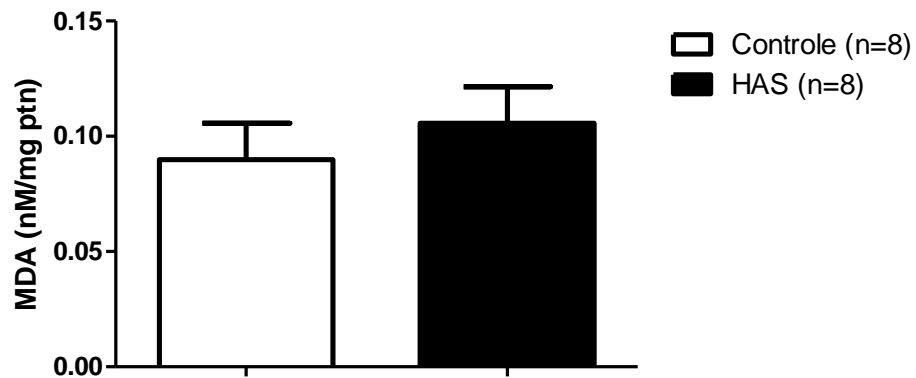
Na dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nM/mg proteína), não foi observado aumento desses compostos quando comparou-se plaquetas de pacientes hipertensos ( $1,7 \pm 0,2$ ) e controles ( $1,5 \pm 0,3$ ).



**Figura 23:** Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em plaquetas de pacientes e controles.

#### 4.13 Avaliação da peroxidação lipídica sistêmica em pacientes hipertensos

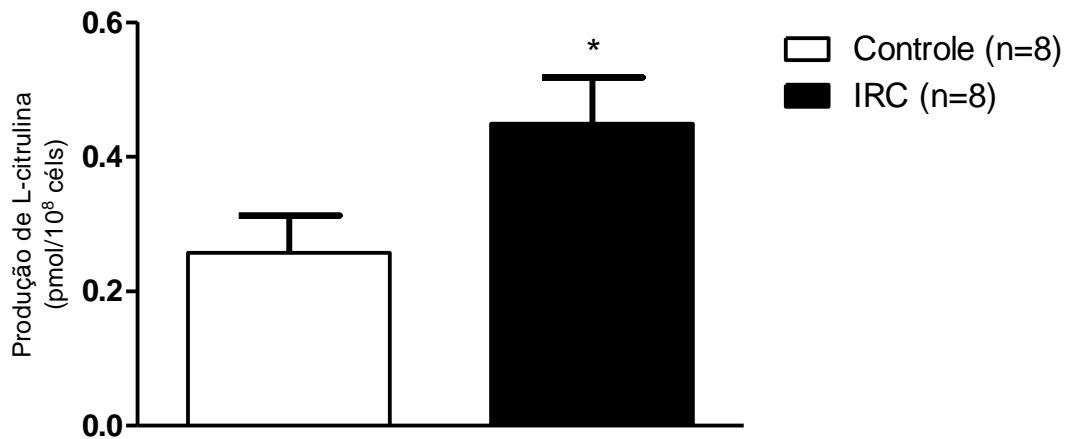
Quando comparados, o soro de controles não diferiu do soro de pacientes hipertensos em relação à peroxidação lipídica ( $0,08 \pm 0,01$  vs  $0,10 \pm 0,01$ ; nM/ mg proteína) (Figura 24).



**Figura 24:** Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no soro de pacientes e controles.

#### 4.14 Atividade da NOS em plaquetas de controles e pacientes renais em tratamento conservador

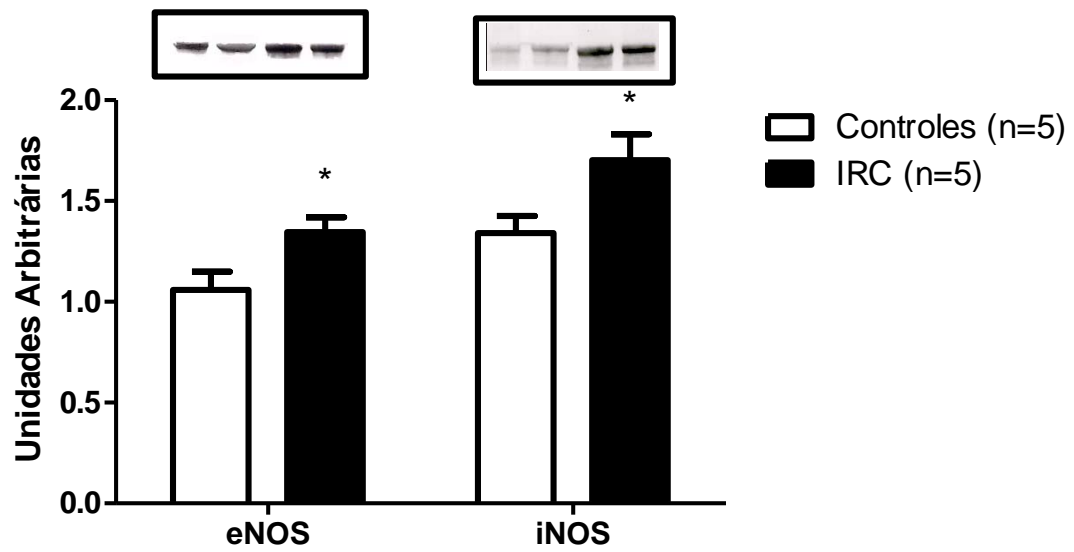
A atividade basal da NOS ( $\text{pmol}/10^8$  células) estava aumentada em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento conservador ( $0,25 \pm 0,05$ ;  $n=8$ ) quando comparadas com a atividade de plaquetas de pacientes saudáveis ( $0,44 \pm 0,06$ ;  $n=8$ ).



**Figura 25:** Atividade da NOS em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento conservador e controles saudáveis (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.15 Expressão das isoformas eNOS e iNOS em plaquetas de controles e pacientes renais em tratamento conservador

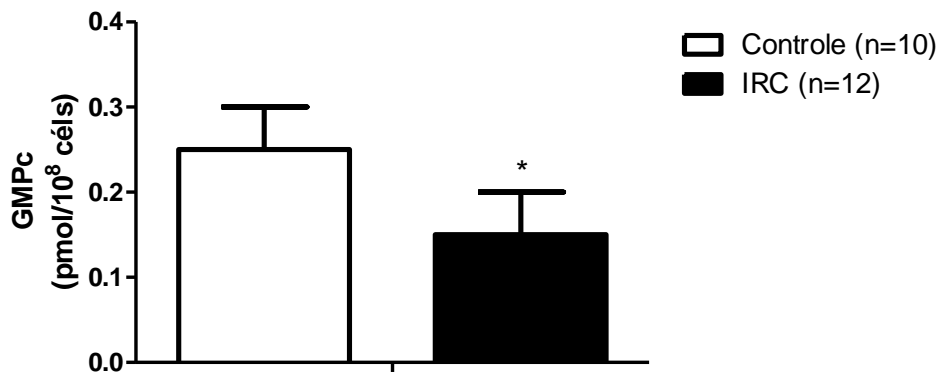
A expressão tanto da eNOS como da iNOS estava aumentada em plaquetas de pacientes com IRC em tratamento conservador.



**Figura 26:** Expressão das isoformas eNOS e iNOS em plaquetas de pacientes com IRC em tratamento conservador e controles (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.16 Concentração basal de GMPc em plaquetas de controles e pacientes renais em tratamento conservador

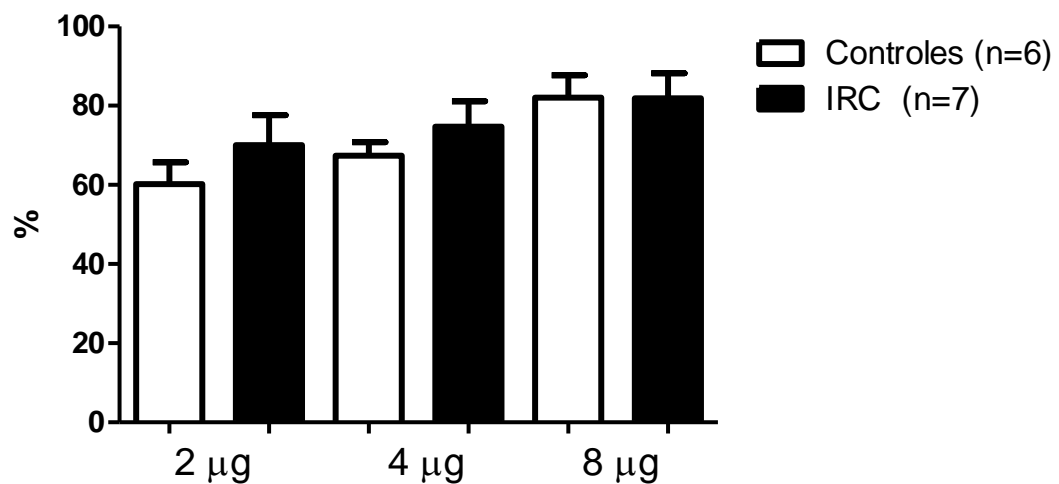
A concentração basal de GMPc em plaquetas ( $\text{pmol}/10^8$  céls), estava similar em pacientes com IRC ( $0,15 \pm 0,05$ ,  $n=12$ ), em relação aos controles ( $0,25 \pm 0,05$ ,  $n=10$ ).



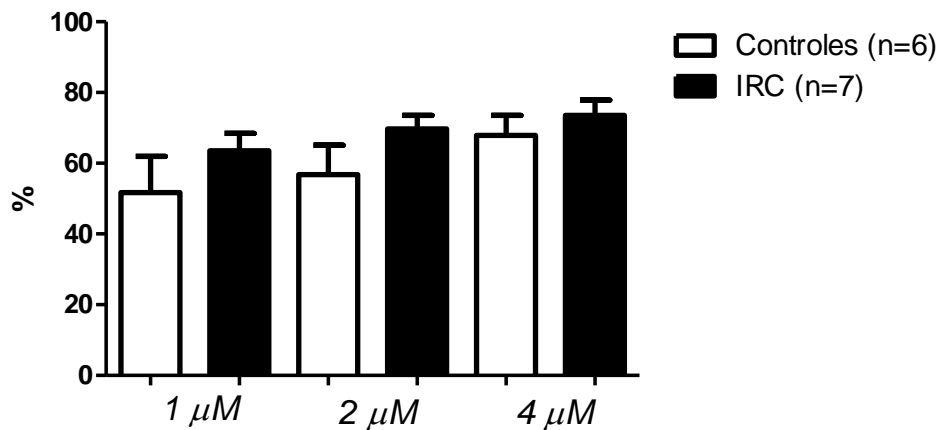
**Figura 27:** Concentrações intracelulares de GMPc de pacientes e controles (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.17 Avaliação da função plaquetária

Foram observados efeitos dose- resposta na estimulação de plaquetas de pacientes e controles tanto com colágeno (Figura 28), como com ADP (Figura 29), no entanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.



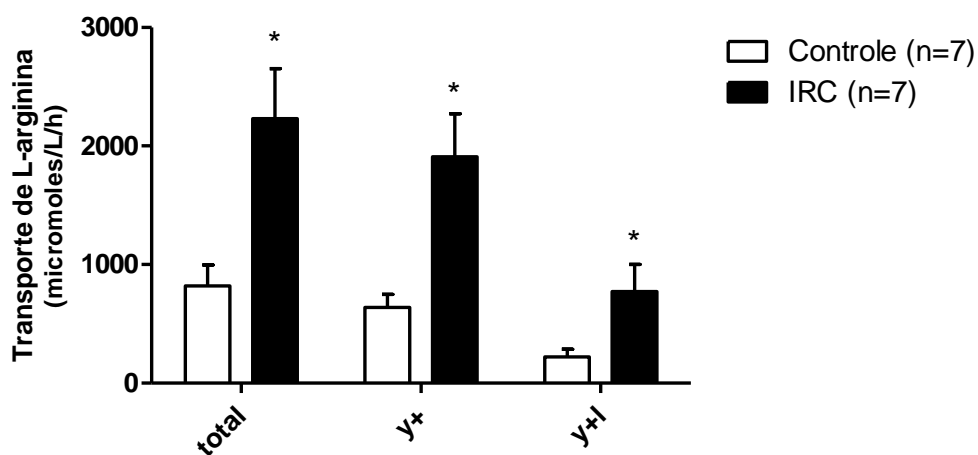
**Figura 28.** Agregação plaquetária induzida por concentrações crescentes de colágeno em plaquetas de controles e de pacientes com insuficiência renal crônica.



**Figura 29.** Agregação plaquetária induzida por concentrações crescentes de ADP em plaquetas de controles e de pacientes com insuficiência renal crônica.

#### 4.18 Transporte de L-arginina em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise

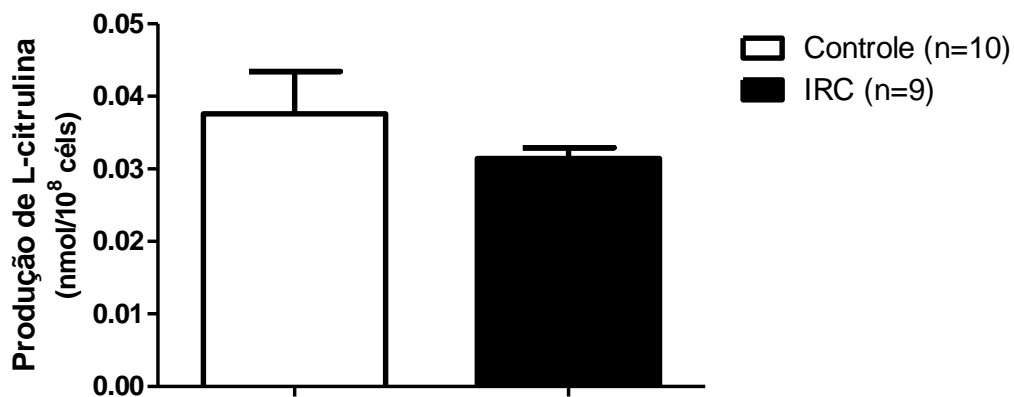
Foi observado um aumento do transporte (micromoles/L/h) total aparente de L-arginina nos eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodiálise (Figura 30)



**Figura 30:** Influxo de L-arginina total aparente, via sistema y<sup>+</sup> e y<sup>+</sup>L em eritrócitos.

#### 4.19 Atividade da NOS em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise

Não foi detectada diferença significativa na atividade da NOS (nmol/10<sup>8</sup> célula) em eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodiálise ( $0,031 \pm 0,001$ ; n=9) e controles saudáveis ( $0,037 \pm 0,005$ ; n=10).

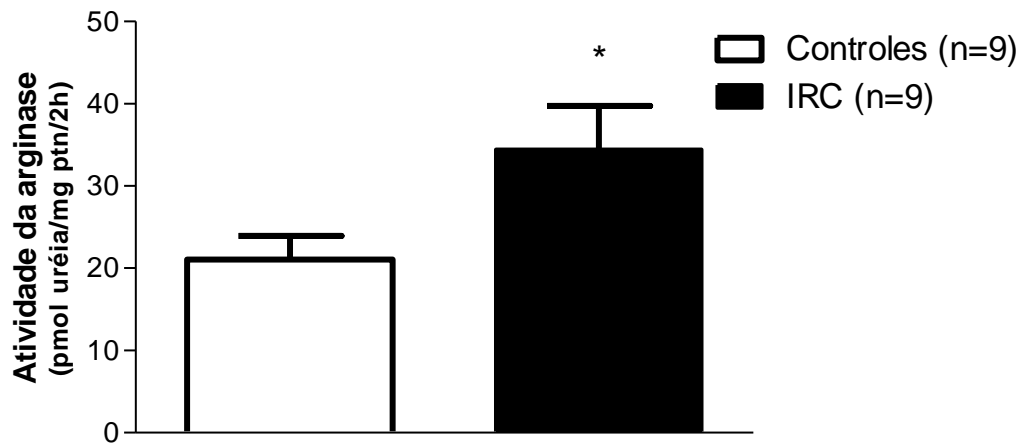


**Figura 31:** Atividade da NOS em plaquetas de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise.

#### 4.20 Atividade da arginase em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise

Foi demonstrada uma maior produção de uréia (pmol uréia/mg proteína/2h) nos eritrócitos de pacientes portadores de IRC em tratamento dialítico ( $34,4 \pm 5,3$ ; n=9) do que em eritrócitos de controles ( $21,0 \pm 2,8$ ; n=9).

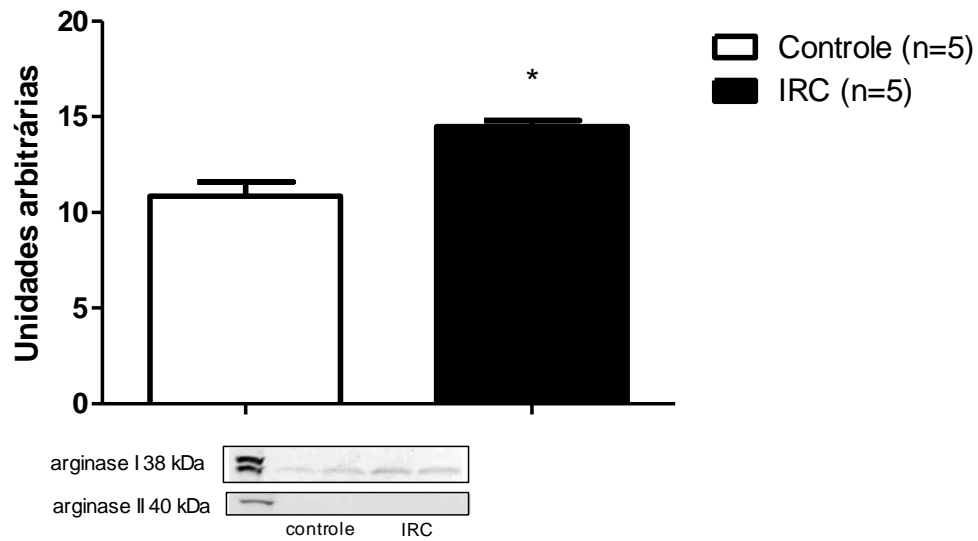




**Figura 32:** Atividade da arginase em eritrócito de pacientes com IRC em hemodiálise e controles (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.21 Expressão das isoformas da arginase em eritrócitos de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise e controles

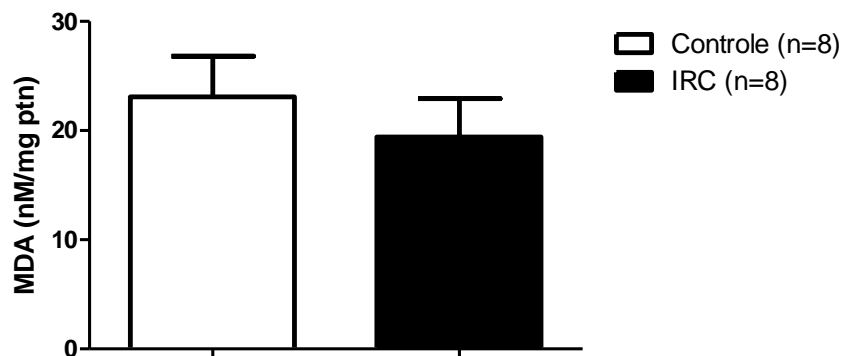
Foi detectada em hemácias humanas apenas a isoforma I da arginase, sendo que as hemácias de pacientes renais crônicos ( $14,4 \pm 0,3$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ) parecem expressar essa isoforma em maior quantidade do que as células de controles ( $10,8 \pm 0,7$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ).



**Figura 33:** expressão das isoformas I e II da arginase em eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodiálise e controles. As primeiras bandas representam controles positivos para arginase I (lisado de fígado de rato) e II (lisado de rim de rato) (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.22 Peroxidação lipídica em eritrócitos de pacientes controles e portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise

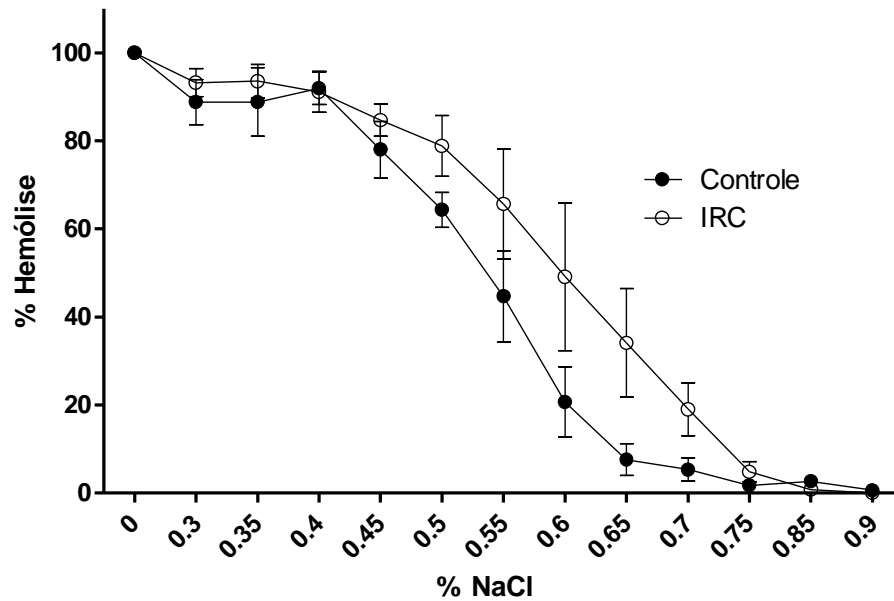
A avaliação da peroxidação lipídica (marcador de stress oxidativo) de eritrócitos através da dosagem de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (pmol/mg de proteína) não mostrou diferença significativa entre os pacientes com IRC ( $19,42 \pm 3,5$ ) e controles ( $23,09 \pm 3,7$ ) (Figura 34).



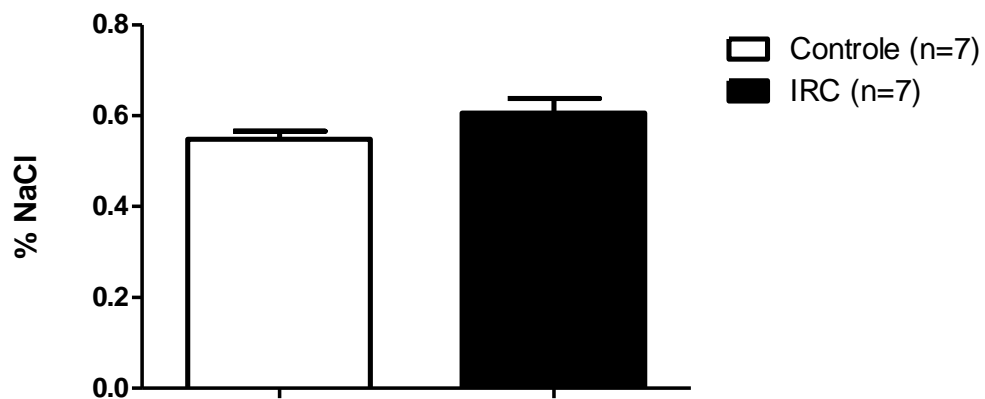
**Figura 34:** Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em eritrócitos de controles e pacientes portadores de IRC em hemodiálise.

#### 4.23 Efeitos da insuficiência renal crônica em hemodiálise na fragilidade osmótica de eritrócitos

Foram realizadas curvas de fragilidade osmótica em hemácias de controles e de pacientes portadores de IRC em hemodiálise. Embora as curvas (Figura 35) mostrem um ligeiro desvio para a direita, não houve diferença significativa em relação ao IC50 (%) entre pacientes com IRC ( $0,60 \pm 0,03$ ) e controles ( $0,54 \pm 0,01$ ) (Figura 36).



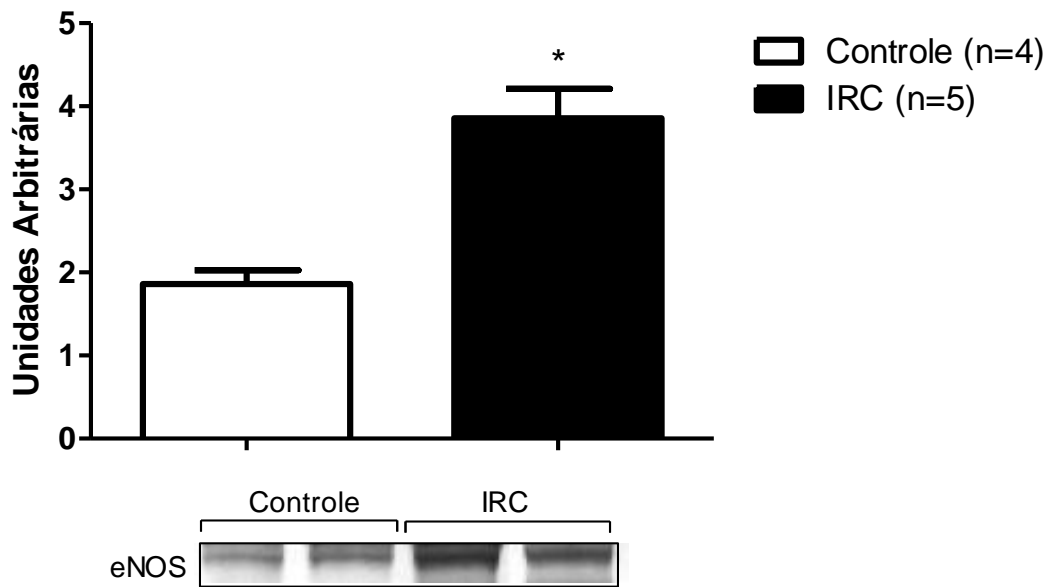
**Figura 35:** Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes e controles.



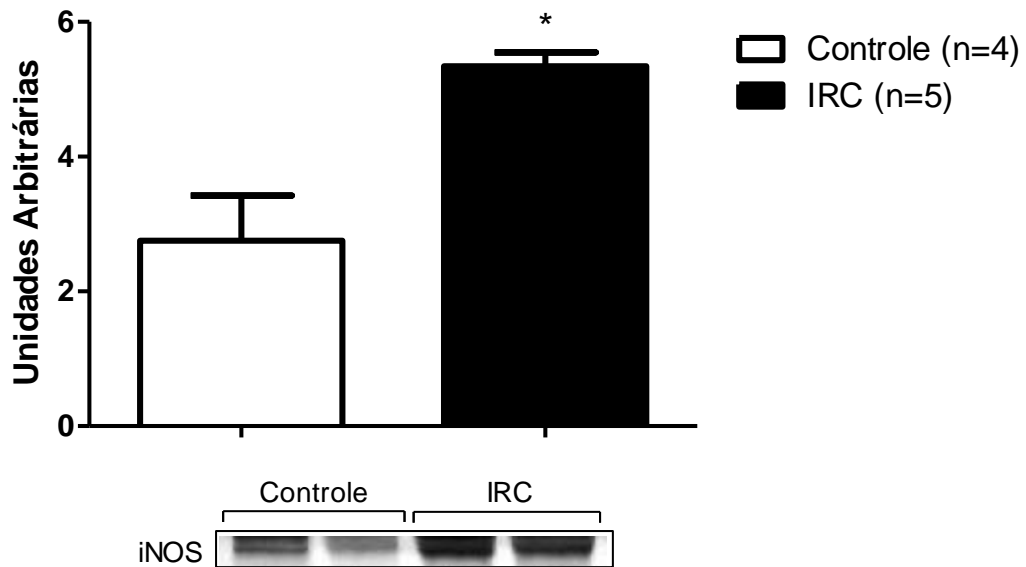
**Figura 36:** IC50 da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodialise e controles.

#### 4.24 Expressão das isoformas eNOS e iNOS em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise

A expressão (unidades arbitrárias) tanto da eNOS ( $1,8 \pm 0,1$  vs  $3,8 \pm 0,3$ ) como da iNOS ( $2,7 \pm 0,6$  vs  $5,3 \pm 0,2$ ) estava aumentada em plaquetas de pacientes com IRC em hemodiálise.



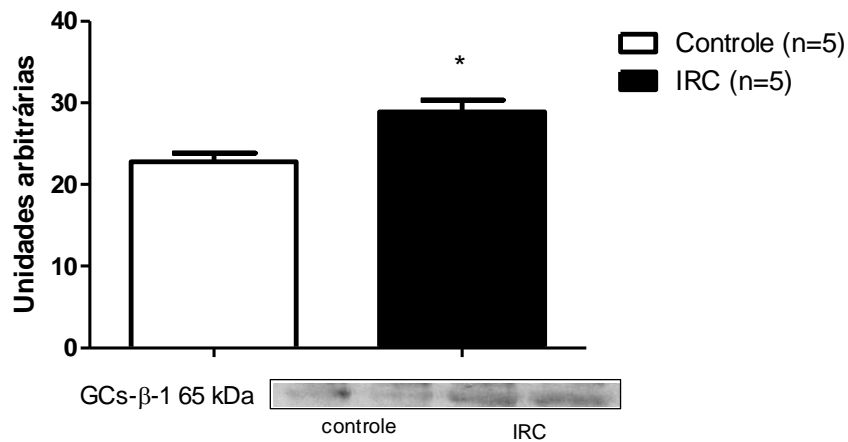
**Figura 37:** Expressão da NOS endotelial em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise (\*  $p < 0,05$ ).



**Figura 38:** Expressão da NOS induzível em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.25 Expressão da guanilato ciclase solúvel em plaquetas de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise

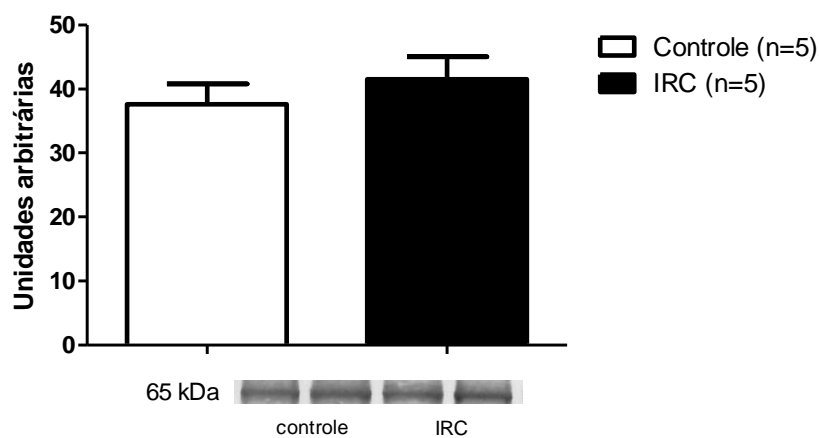
Foi detectada uma maior expressão da subunidade  $\beta_1$  da enzima guanilato ciclase nas plaquetas de pacientes portadores de IRC em hemodiálise ( $28,8 \pm 1,4$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ) do que nas células de controles ( $22,8 \pm 1,0$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ).



**Figura 39:** Expressão da GCs em plaquetas de controles e pacientes portadores IRC em hemodiálise (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.26 Expressão da fosfodiesterase 5 em plaquetas de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise

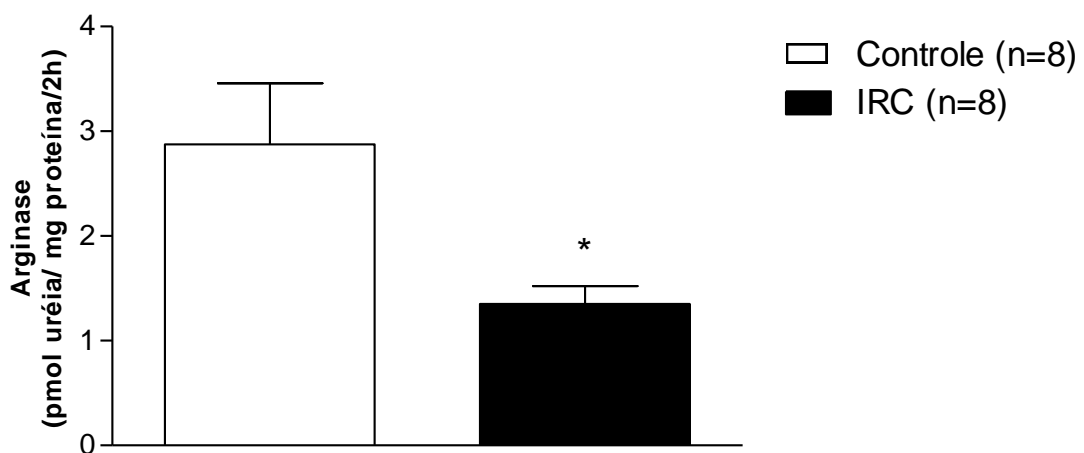
Não houve diferença significativa no padrão de expressão da fosfodiesterase 5 em plaquetas de pacientes com IRC em hemodiálise ( $41,5 \pm 3,4$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ) e de controles ( $37,5 \pm 3,1$  unidades arbitrárias;  $n=5$ ).



**Figura 40:** Expressão da PDE5 em plaquetas de pacientes portadores de IRC em hemodiálise e controles.

#### 4.27 Atividade da arginase em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise

Foi demonstrada uma redução da atividade basal da arginase (pmol uréia/mg proteína/2h) em plaquetas de pacientes urêmicos ( $1,3 \pm 0,9$ ;  $n = 8$ ) quando comparado com pacientes controles ( $2,8 \pm 0,5$ ;  $n = 8$ ) (Figura 41).

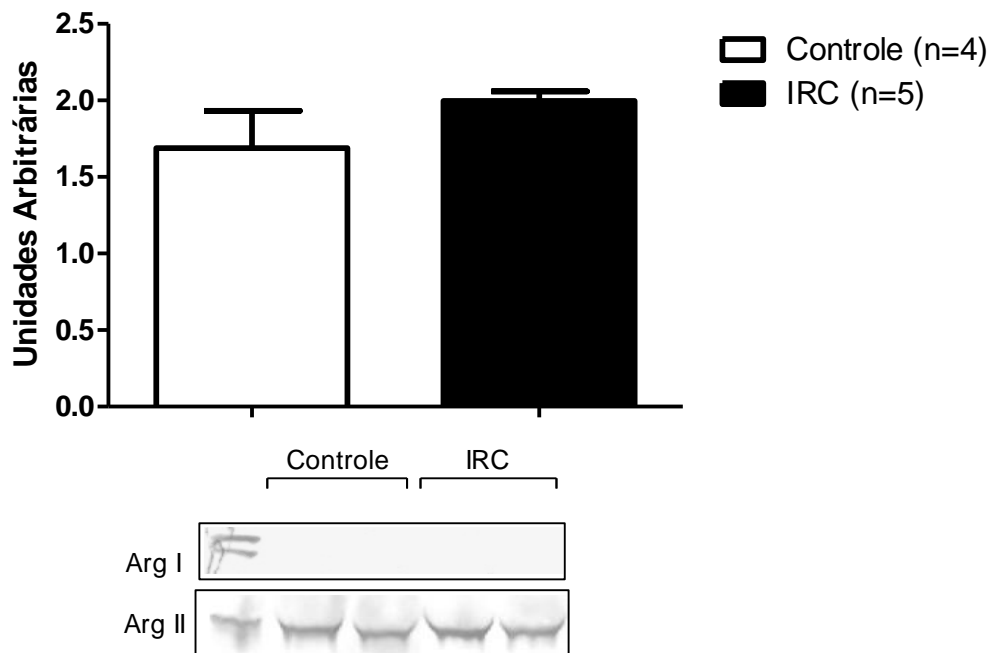


**Figura 41:** Atividade da arginase em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica e controles (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.28 Expressão das isoformas da arginase em plaquetas de controles e pacientes renais crônicos em hemodiálise

De forma similar aos pacientes hipertensos, não foi observada a presença da arginase I em plaquetas humanas, enquanto que a arginase II foi detectada, não havendo diferença significativa em de seu padrão de expressão entre os grupos estudados.

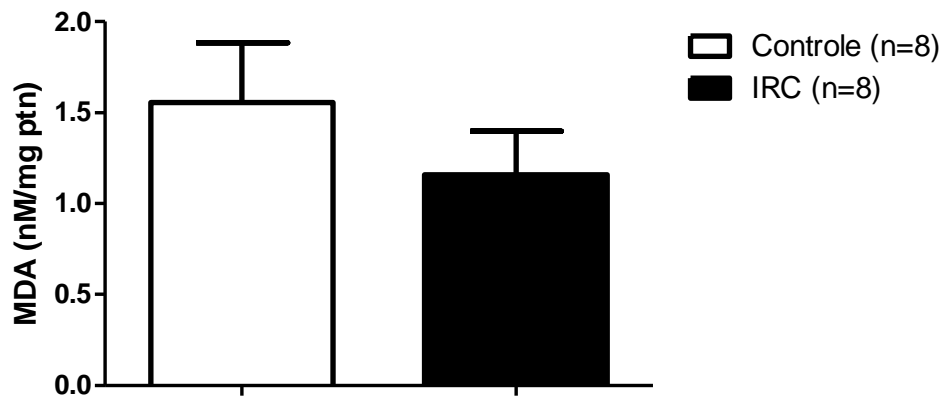




**Figura 42:** Expressão das isoformas da arginase I e II em plaquetas de pacientes portadores de insuficiência renal crônica e controles.

#### 4.29 Peroxidação lipídica em plaquetas de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise

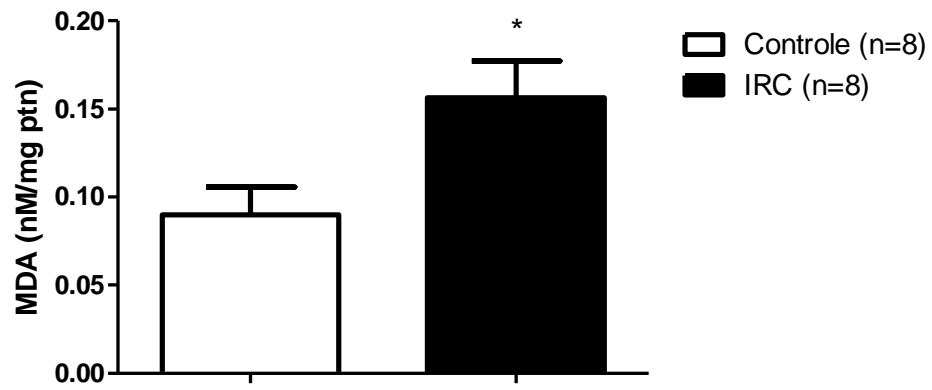
Na dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nM/mg proteína), não foi observado aumento desses compostos quando comparou-se plaquetas de pacientes portadores de IRC em hemodiálise ( $1,1 \pm 0,2$ ) e controles ( $1,5 \pm 0,3$ ) (Figura 43).



**Figura 43:** Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em plaquetas de pacientes e controles.

#### 4.30 Peroxidação lipídica no plasma de controles e pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise

Foi detectada uma maior concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no soro de pacientes portadores de IRC em hemodiálise ( $0,08 \pm 0,01$  vs  $0,15 \pm 0,02$ ; nM/ mg proteína) (Figura 44).



**Figura 44:** Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma de pacientes e controles

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo são abordadas duas patologias caracterizadas por alta prevalência e grande impacto sócio-econômico: HAS e IRC. Sabe-se que a doença cardiovascular é a principal responsável pela mortalidade em pacientes renais crônicos em hemodiálise (Marin *et al.*, 2006) e que a HAS é um fator de risco clássico para aterotrombose, estando fortemente associada a eventos coronarianos e cerebrovasculares (Staessen *et al.*, 2005). Dessa forma, o estudo da fisiopatologia dessas doenças é de grande importância para que novas terapêuticas possam ser empregadas a fim de reduzir morbidade e mortalidade, investigando a interface entre as alterações celulares e moleculares com as manifestações clínicas.

### 5.1 Hipertensão arterial sistêmica

Apesar de estudos prévios realizados em nosso laboratório terem evidenciado uma redução no transporte de L-arginina em RBC (de Meirelles *et al.*, 2007; Moss *et al.*, 2004) de pacientes hipertensos, no presente estudo, não foram detectadas alterações significativas na atividade da NOS em eritrócitos de pacientes portadores de HAS. Apesar de controversa, cada vez mais tem sido dada importância para a via L-arginina-NO em eritrócitos. Mais do que um modelo para o estudo dessa via, o NO produzido pelos eritrócitos parece ter uma atividade no controle do fluxo sanguíneo, da função plaquetária (Kleinbongard *et al.*, 2006) e no controle da deformabilidade dos próprios eritrócitos (Uyuklu *et al.*, 2009). Curiosamente, apesar de haver um menor aporte de L-arginina para o interior do eritrócito (Moss *et al.*, 2004), a produção de NO nessas células, em HAS parece estar mantida. Uma teoria que poderia explicar esse achado seria a presença de uma menor atividade da enzima arginase, o que aumentaria a biodisponibilidade da L-arginina para a NOS. Todavia, no presente estudo, também não foram observadas alterações na atividade e na

expressão dessa enzima em eritrócitos de pacientes com HAS. Existem poucos estudos detalhados sobre a modulação da via L-arginina-NO e do ciclo da uréia em eritrócitos, entretanto, a administração de L-arginina exógena parece aumentar a síntese de NO por essas células, bem como alterar sua capacidade de deformação (Kleinbongard, 2007). Apesar de o paradoxo da L-arginina ser descrito em muitos tipos celulares, não está claro se esse fenômeno ocorre em eritrócitos, de forma que, na HAS, é possível que as reservas intracelulares de L-arginina sejam suficientes para manter a síntese de NO e a atividade da arginase normais em eritrócitos.

O western blotting de lisados de hemácias revelou que essas células expressam apenas a isoforma I da arginase, confirmando os dados da literatura (Kim et al., 2002). Além disso, não houve diferença no padrão de expressão da arginase I entre controles e indivíduos hipertensos. Estudos em modelos animais de HAS mostram um aumento da atividade da arginase e que a administração de inibidores dessa enzima promove uma melhora da função vascular (Johnson et al., 2005; Bagnost et al., 2010) nesses animais. Recentemente foi realizado um estudo sobre a atividade e a expressão da arginase em ratos espontaneamente hipertensos que detectou uma maior atividade dessa enzima nas células do coração e do pulmão desses animais, não havendo diferença no rim, fígado ou no cérebro. (Bagnost et al., 2010).

Diversos estudos apontam para a presença de um estado pró-oxidante em HAS (Rodrigo et al., 2007), com aumento da produção de ROS e/ou redução dos composto anti-oxidantes (Rodrigo et al., 2007). Curiosamente, no presente estudo, não foram detectadas diferenças significativas em relação à peroxidação lipídica sistêmica e eritrocitária nos pacientes hipertensos. Vale ressaltar que foram incluídos nesse estudo pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica em estágio I e, dessa forma, é possível que com o avançar da doença essas alterações tornem-se mais marcantes. Além disso, é necessário que haja uma investigação mais detalhada das vias oxidantes e antioxidantes no eritrócito para que haja uma confirmação da presença do estado oxidativo na hipertensão arterial, uma vez que a peroxidação lipídica é um marcador isolado da interação de lipídios com ROS.

A membrana plasmática dos eritrócitos é composta por uma dupla camada lipídica e por diversas proteínas que funcionam como receptores ou como canais de transporte iônico ou de partículas de baixo peso molecular. Quando submetidos a

concentrações suficientemente hipotônicas, os eritrócitos absorvem água até que ocorra o equilíbrio osmótico ou a ruptura da membrana (Didelon et al., 2000). Qualquer composto ou condição patológica que modifique a fluidez da membrana altera sua capacidade de resistir às mudanças na osmolaridade do meio. Um dos testes para a avaliação da resistência da membrana é o teste da fragilidade osmótica (Didelon et al., 2000). Estudos mostram que a presença de estresse oxidativo faz com que a membrana de eritrócitos se torne mais rígida fazendo com que a célula fique menos resistente e tenha uma maior fragilidade osmótica (Brzeszczynska et al., 2008). No presente estudo, embora não tenha sido observada uma diferença significativa no IC50 (concentração de NaCl na qual ocorre 50% de hemólise) da fragilidade osmótica eritrocitária de pacientes hipertensos, pode-se notar que houve um desvio da curva de fragilidade para a direita, mostrando que há uma maior hemólise nas células de pacientes hipertensos. Um recente estudo revelou que RBCs de pacientes hipertensos apresentam menor fluidez em sua membrana plasmática e que isso se devia, em grande parte, pela presença de estresse oxidativo (Tsuda, 2010). Além disso, foi demonstrado que o NO é capaz de aumentar a fluidez das membranas (Brzeszczynska et al., 2008) e, em um contexto de baixa disponibilidade de NO, como ocorre com a hipertensão, é possível que haja um agravamento fragilidade da membrana plasmática dos eritrócitos.

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram uma diminuição no influxo de L-arginina em plaquetas de pacientes hipertensos, associado com um aumento da agregação plaquetária induzida pelo colágeno (Moss et al, 2004). No presente estudo, foi detectada uma redução significativa da atividade da NOS em plaquetas sem haver, no entanto, alteração na expressão da enzima. É possível que a redução do aporte de substrato para a NOS seja um fator limitante para a atividade da enzima na HAS. Além disso, existem relatos de uma menor disponibilidade de cofatores da NOS em hipertensão, o que, além de diminuir a atividade da NOS, poderia levar a um desacoplamento da mesma, levando a uma redução da síntese de NO com formação de ânion superóxido pela mesma (Vergani et al., 2000; Chen et al., 2008). Outro possível mecanismo para explicar essa redução na síntese de NO em plaquetas na HAS é a presença aumentada de ADMA, um análogo da L-arginina que compete por seu sítio de ligação na enzima, promovendo inibição da mesma (Sonmez et al., 2010).

Destaca-se neste trabalho, a identificação de ambas as isoformas de NOS, endotelial e induzível em plaquetas. A caracterização das isoformas de NOS encontradas em plaquetas teve início nos anos 90 a partir de um relato que descrevia a via L-arginina-NO em plaqueta (Radomski *et al*, 1990). Desde então, diversos estudos têm mostrado, direta ou indiretamente, a presença de isoformas da NOS em plaquetas (Sase & Michel, 1995). Apesar da maioria dos relatos apontarem para a presença apenas da eNOS em plaquetas (Sase & Michel, 1995), Mehta e colaboradores descreveram pela primeira vez a presença das isoformas eNOS e iNOS em plaquetas humanas (Mehta *et al*, 1995). Mais recentemente, um estudo realizado em plaquetas humanas para avaliar a produção de NO na doença de Alzheimer, confirmou os achados de Mehta e demonstrou que a isoforma induzível está presente de forma constitutiva em plaquetas humanas (Vignini *et al*, 2006). De forma similar ao estudo anteriormente citado, os dados presentes neste estudo indicam a presença de forma constitutiva tanto da eNOS como da iNOS em lisado de plaquetas humanas. Todavia, apesar de ter sido observada uma diminuição da atividade da NOS, não foram observadas diferença na expressão tanto da eNOS como da iNOS, o que ressalta a importância da biodisponibilidade da L-arginina e/ou de cofatores na modulação da atividade da enzima.

A enzima GC é uma proteína heterodimérica que converte GTP em GMPc em resposta ao estímulo pelo NO, sendo descrita muitas vezes na literatura como o “receptor” do NO (Derbyshire *et al.*, 2009). Um recente estudo demonstrou que a ausência da enzima GC em plaquetas leva a uma perda do efeito inibidor do NO tanto na adesão como na agregação plaquetária, demonstrando a importância dessa enzima em plaquetas (Dangel *et al.*, 2010). Um estudo em um modelo animal de HAS mostrou uma redução da expressão da GC solúvel e dos níveis de GMPc em artérias desses animais (Ndisang & Wang, 2003). Apesar disso, não existem estudos sobre a expressão da GC solúvel em plaquetas de pacientes com HAS. O presente trabalho não observou diferença significativa na expressão na subunidade  $\beta_1$  da GC solúvel em plaquetas de pacientes hipertensos. Todavia, esse resultado não exclui a possibilidade de haver uma alteração na atividade da enzima, uma vez que foi previamente demonstrado uma redução no conteúdo de GMPc em plaquetas de pacientes hipertensos (Moss *et al.* 2004)

Plaquetas humanas parecem expressar PDE3 e PDE5, sendo esta última expressa em grandes quantidades (Ito *et al.*, 1996). A fosfodiesterase hidrolisa

GMPc, reduzindo sua disponibilidade no interior da plaqueta. Estudos farmacológicos mostram que inibidores da PDE5 promovem inibição da agregação plaquetária (Ito et al., 1996; Wilson et al., 2008). Não existem estudos sobre a expressão e a atividade da PDE5 em hipertensão arterial essencial, no entanto alguns inibidores dessa enzima têm sido testados como tendo efeito vasodilatador (Patterson et al., 2006). O presente estudo confirmou a presença da PDE5 em plaquetas humanas, todavia não foi observada diferença significativa no seu padrão de expressão. Não foi avaliada a atividade dessa enzima na HAS, mas sabe-se que ela é regulada em parte por seu substrato, o GMPc, cujas quantidades encontram-se diminuídas na HAS (Moss et al., 2004).

Muito embora existam dados de que a atividade da arginase esteja aumentada na hipertensão essencial (Demougeot *et al.*, 2007), não foram detectadas diferenças significativas na atividade e na expressão da arginase em eritrócitos e em plaquetas. Todavia, pôde-se observar que plaquetas humanas expressam apenas a isoforma II da arginase, não tendo sido detectada a isoforma I, confirmando dados recentes da literatura que mostram a presença de RNA mensageiro da arginase II em plaquetas (Raghavachari *et al.*, 2007). A arginase compete com a NOS pela L-arginina e, estudos em modelos animais de hipertensão mostram que o tratamento dos animais com inibidores da arginase reduz a pressão arterial, aumenta a produção de NO e melhora a reatividade vascular (Bagnost *et al.*, 2008). Mais estudos são necessários para elucidar o real papel da arginase na via L-arginina – NO em plaquetas e eritrócitos na hipertensão arterial.

## 5.2 Insuficiência renal crônica

Apesar da elevada prevalência de eventos aterotrombóticos, há uma tendência de prolongamento do tempo de sangramento em pacientes urêmicos (Noris & Remuzzi, 1999; Mendes Ribeiro & Brunini, 2004, Kaw & Malhotra, 2006). Este quadro paradoxal em IRC parece ser resultado de um desequilíbrio entre fatores pró e antiagregantes plaquetários (Mendes Ribeiro & Brunini, 2004; Rios et al., 2010), sendo que o NO teria um papel fundamental no controle da hemostasia em uremia (Mendes Ribeiro & Brunini, 2004).



Conforme mencionado anteriormente, tem sido dado grande destaque para a presença da enzima NOS e capacidade da geração de NO por eritrócitos, bem como aos efeitos do NO sobre as próprias hemácias. Foi comprovado que as hemácias possuem NOS funcionando e que a inibição da atividade da mesma leva a uma alteração da fluidez da membrana plasmática eritrocitária e reduz a deformabilidade dessas células (Kleinbongard et al., 2006).

Foi demonstrado previamente que pacientes portadores de IRC em hemodiálise apresentam um aumento no influxo de L-arginina em eritrócitos (Reis et al., 2006) e que haveria um aumento da síntese de NO nessa doença (Noris & Remuzzi, 1999; Mendes Ribeiro & Brunini, 2004). Os resultados obtidos nessa tese mostram que apesar de haver um aumento do transporte de L-arginina em eritrócitos de pacientes com IRC em hemodiálise, não há alteração na atividade da NOS nessas células, mostrando que, na IRC em hemodiálise o aumento do aporte de L-arginina não se manifesta como um aumento de NO em eritrócitos. Todavia, há um aumento tanto da expressão da arginase I como de sua atividade e, nesse contexto, o aumento do influxo da L-arginina em eritrócitos pode estar desviado para a formação de uréia e L-ornitina. Recentemente, foi demonstrado que, em células endoteliais, a estimulação da proteína quinase C alfa levava a um aumento do transporte de L-arginina via sistema  $\gamma^+$ , com maior expressão dos transportadores tipo CAT2 associado a uma maior expressão e atividade da arginase (Visigalli et al., 2010), o que poderia ser uma possível explicação para os achados obtidos em eritrócitos na IRC em hemodiálise. No entanto é necessário um maior estudo sobre a regulação dessa via em hemácias.

Apesar de haver uma ativação da via L-arginina-NO na IRC em hemodiálise, essa doença cursa com elevação de marcadores sistêmicos de estresse oxidativo (REF) o que foi confirmado no presente estudo, com o aumento significativo da peroxidação lipídica nesses pacientes. Sabe-se que tanto o NO como ROS levam a uma alteração da composição e da fluidez da membrana plasmática de eritrócitos. Vários estudos mostram um aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes com IRC desde os estágios iniciais da doença (Goi et al., 2009). No presente estudo não foram detectadas diferenças significativas em relação ao IC50 da fragilidade osmótica eritrocitária. Todavia, pode-se notar um desvio para a direita na curva da fragilidade osmótica, mostrando que essas células são mais sensíveis à alteração nas concentrações extracelulares de sódio. Tal fato pode ser explicado,

entre outros fatores pela maior produção de ROS nesses pacientes, o que pode promover uma redução da meia-vida desses eritrócitos (Wu et al., 1998).

Diversos estudos apontam para a presença de uma disfunção plaquetária na IRC (Kaw & Malhotra, 2006; Thijs *et al.*, 2008). Um estudo prévio realizado pelo nosso laboratório corroboram os dados existentes na literatura, que indicam uma redução da função plaquetária de pacientes urêmicos (da Silva *et al.*, 2005; Neiva *et al.*, 2002). Para explicar essas alterações, vários trabalhos experimentais demonstram a presença de alterações intrínsecas das plaquetas, como um defeito na via de sinalização do cálcio (Zhou & Vaziri, 2002), redução na expressão de glicoproteínas em plaquetas urêmicas (Moal *et al.*, 2003) e defeitos na via do ácido araquidônico (Vecino, *et al.*, 2002). No entanto, o NO parece ter um papel fundamental no controle da homeostasia plaquetária na uremia (Noris & Remuzzi, 1999).

Trabalhos experimentais realizados em nosso laboratório observaram que, em uremia, há uma ativação da via L-arginina-NO, com aumento do influxo de L-arginina via sistema  $\gamma^+L$ , da atividade da NOS e do conteúdo de GMPc em plaquetas (da Silva *et al.*, 2005). Este aumento na síntese de NO pode ser um mecanismo importante associado à redução da agregação plaquetária desses pacientes.

Associado a essa ativação da via L-arginina-NO presente em uremia, foi demonstrado, pela primeira vez, que a avaliação da expressão das isoformas da NOS em plaquetas realizadas no presente estudo exibiu uma maior expressão de eNOS e iNOS nas plaquetas de pacientes renais crônicos em hemodiálise, sendo com que o aumento da síntese de NO nesta doença esteja relacionado não apenas a um aumento da atividade da enzima dado por uma maior disponibilidade de seu substrato, o aminoácido L-arginina, bem como por uma maior expressão das isoformas da NOS. Não existem trabalhos da literatura sobre a expressão plaquetária das NOS em IRC, no entanto, são demonstradas alterações dessas enzimas em diversos tecidos nesta patologia (Combet *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2002). Esse aumento da síntese de NO em plaquetas pode desencadear também um aumento da expressão da enzima GC, considerada o “receptor” do NO, conforme demonstrado o resultados obtidos nesse estudo. Essa maior expressão da GC pode explicar os níveis aumentados de GMPc obtidos em estudos prévios (da Silva et al., 2005) e a conseqüente inibição plaquetária existente na IRC em estágios terminais. Apesar de não ter sido detectada diferença na expressão da enzima

PDE5 em plaquetas, não se pode descartar uma alteração da atividade dessa enzima, de forma que é necessário um maior aprofundamento na compreensão dos efeitos dessa enzima na atividade das plaquetas de pacientes urêmicos.

Existem alterações da expressão e da atividade da arginase com o processo aterosclerótico e com a disfunção endotelial (Yang & Ming, 2006). A relação da arginase com a uremia é muito pouco abordada na literatura, sendo que um estudo realizado em modelo animal de uremia não demonstrou diferença na atividade e na expressão de ambas as isoformas de arginase no tecido renal e no fígado (Moradi *et al.*, 2006). De forma adicional, a inibição da arginase em um modelo animal de IRC parece reduzir a progressão da insuficiência renal (Sabbatini *et al.*, 2003). De forma interessante, os resultados do presente estudo apontam para uma redução da atividade da arginase em plaquetas de pacientes urêmicos em hemodiálise, não havendo diferenças em seu padrão e expressão. Este achado pode ser devido a um desvio da L-arginina para a via da NOS, cuja atividade está aumentada em plaquetas na uremia (da Silva *et al.*, 2005), como também por uma inibição pela NOHA, um intermediário da via da síntese do NO, cujos níveis se elevam com o estímulo da atividade da NOS (Topal *et al.*, 2006). Portanto, é necessário um maior aprofundamento no estudo da regulação da arginase na IRC bem como de sua interação com a via L-arginina-NO.

Com relação à IRC em estágios moderados, resultados prévios obtidos pelo nosso grupo demonstraram que, em plaquetas de pacientes com IRC em tratamento conservador há uma diminuição do influxo de L-arginina via sistema  $\gamma^+L$ , comparado aos controles. Entretanto, de forma intrigante, foi observado aumento da atividade da NOS. Os presentes resultados mostram que há, nesses pacientes, um aumento da expressão das isoformas iNOS e eNOS nos pacientes renais em relação aos controles, que poderia explicar, em parte, a hiperatividade da enzima NOS observada nas plaquetas desses indivíduos. Esse aumento da atividade da NOS parece ser um mecanismo compensatório que serve para manter a produção intraplaquetária de NO na IRC, conforme evidenciado pelos níveis normais de GMPc intraplaquetário e de agregação plaquetária induzida tanto por colágeno como por ADP.

Na hipertensão arterial, foi demonstrada diminuição do influxo de L-arginina em plaquetas via sistema  $\gamma^+L$  e da atividade da NOS (Moss *et al.*, 2004). Considerando o estágio da doença renal e que a maioria dos pacientes com IRC em

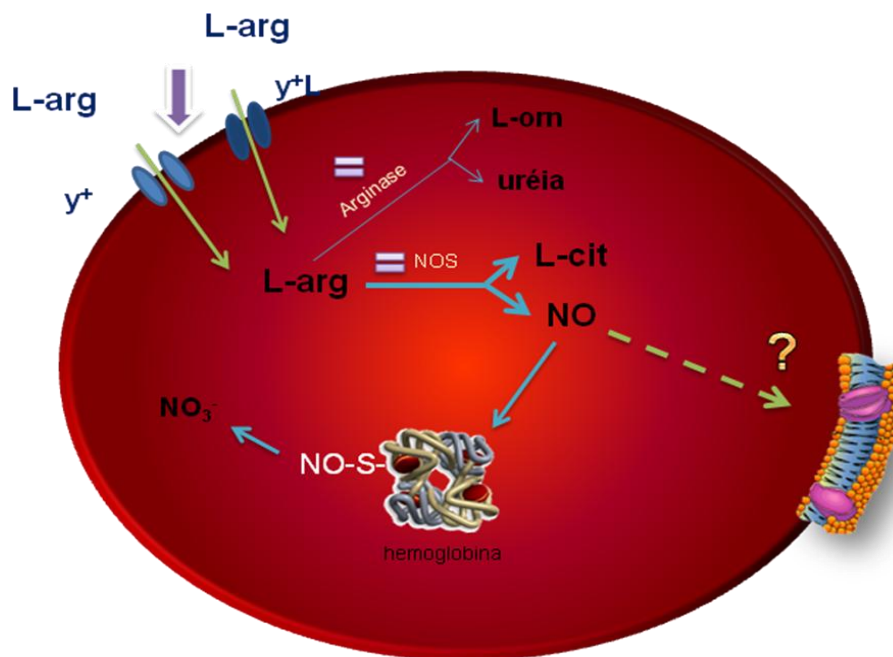
tratamento conservador incluídos no presente estudo são hipertensos (90%), é possível que este transportador continue modulado pela hipertensão e que a estimulação do mesmo na IRC esteja associada ao processo dialítico. Além disso, há a possibilidade de as alterações promovidas pela progressão da doença renal na via L-arginina-NO serem observadas primariamente em nível de atividade enzimática (NOS).

Apesar do transporte de L-arginina estar reduzido, existe uma maior expressão tanto da iNOS como da eNOS em plaquetas, levando a um aumento da atividade destas enzimas. Dessa forma, é possível que a redução do transporte de L-arginina para o interior da plaqueta leve a um mecanismo compensatório de ativação das NOS, que mantém a disponibilidade do NO intraplaquetária.

Em resumo, os resultados aqui apresentados demonstram que a via L-arginina-NO-GMPc em plaquetas humanas está alterada na doença renal crônica independentemente do tratamento dialítico e na hipertensão arterial essencial. Em um contexto de atividade anormal dessa via em patologias como a IRC e a HAS, um completo entendimento da sua modulação é necessário, uma vez que pode conduzir a novas ferramentas terapêuticas

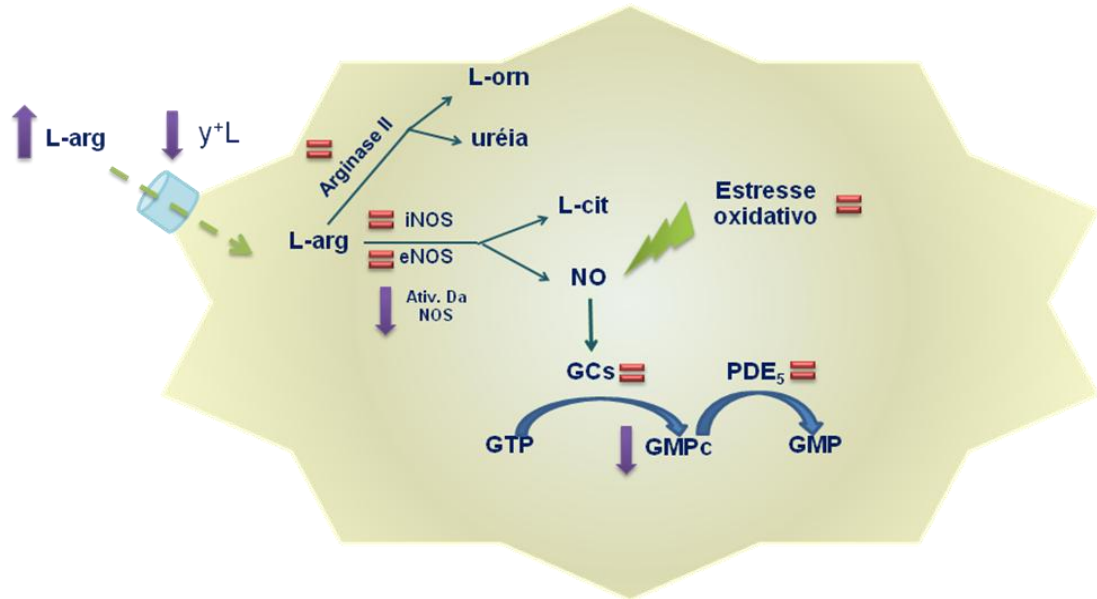
## 6 CONCLUSÕES

De acordo com o presente estudo pôde-se verificar que em eritrócitos, na HAS não há alteração na síntese de NO, todavia ocorre uma ativação do ciclo da uréia, que pode ser dada pelo aumento do influxo de L-arginina eritrocitário previamente demonstrado. O presente estudo não demonstrou diferença significativa na peroxidação lipídica sistêmica, em plaquetas ou eritrócitos na HAS. Os dados obtidos nessa tese, bem como dados previamente publicados são resumidos na (figura 45).



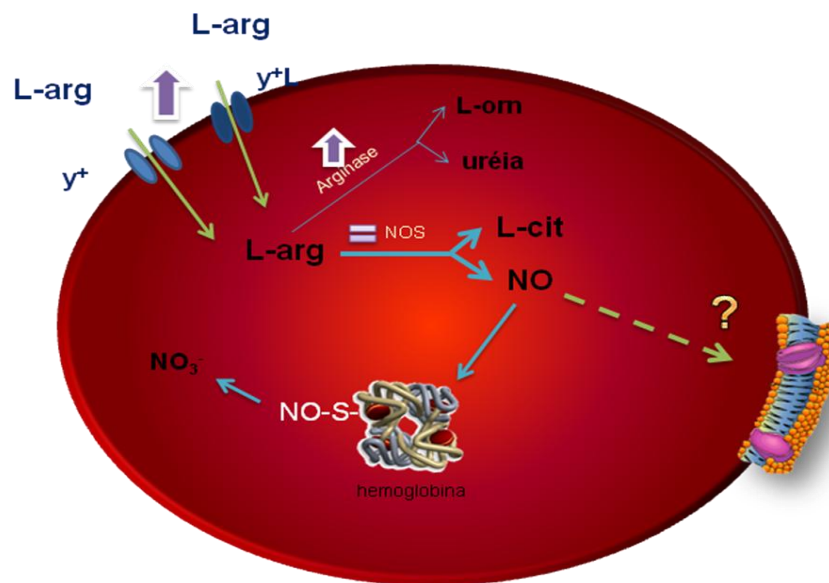
**Figura 45:** resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em eritrócitos de pacientes portadores de HAS. ↓ Redução significativa em relação aos controles; = sem alteração significativa em relação aos controles.

Em plaquetas, no entanto, houve uma redução da atividade da NOS, que não foi acompanhada por alteração da expressão das isoformas da NOS, da arginase, da PDE5 ou da GC solúvel. Dessa forma, conforme demonstrado previamente, é possível que a menor produção de NO em plaquetas de pacientes hipertensos seja devida a um menor aporte de L-arginina para o interior da célula (Figura 46).



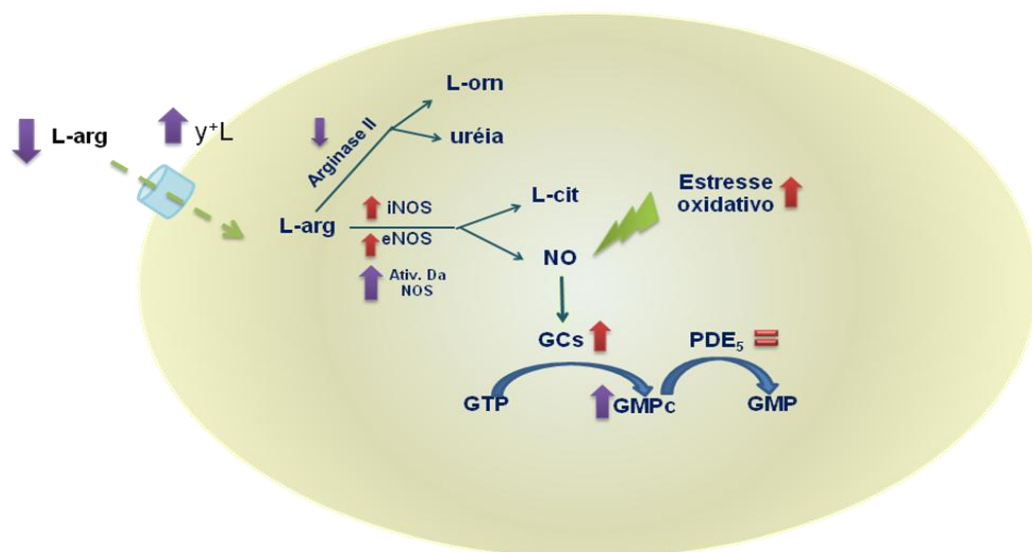
**Figura 46:** resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em plaquetas de pacientes portadores de HAS. ↓ redução significativa em relação aos controles; ↑ aumento significativo em relação aos controles; = sem alteração significativa em relação aos controles.

Os eritrócitos de pacientes renais crônicos em hemodiálise mostraram um maior influxo de L-arginina associado a um aumento da expressão e da atividade da arginase, não havendo diferença na atividade da NOS (figura 47). Além disso, apesar e não ter sido mostrado alteração nos marcadores de peroxidação lipídica em eritrócitos e plaquetas, os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico estavam elevadas no soro de pacientes com IRC em hemodiálise.



**Figura 47:** resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em eritrócitos de pacientes portadores de IRC em hemodiálise. ↑ aumento significativo em relação aos controles; = sem alteração significativa em relação aos controles.

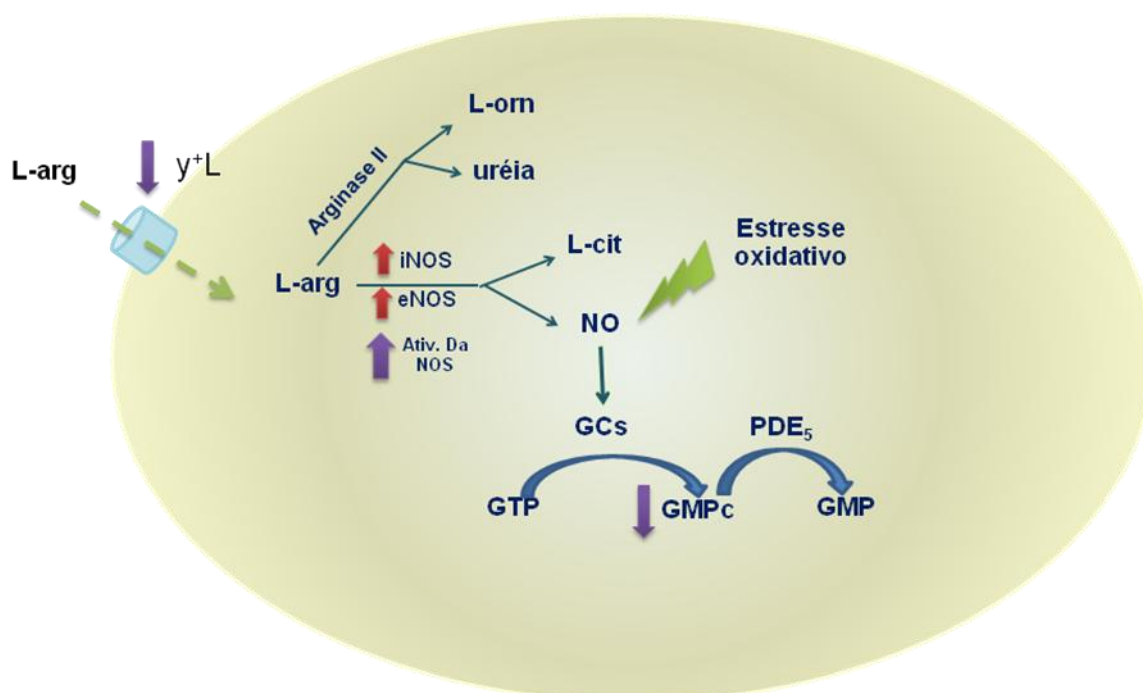
Por outro lado, as plaquetas dos mesmos pacientes apresentaram uma maior expressão da eNOS, da iNOS e da guanilato ciclase solúvel, acompanhada de uma redução da atividade da arginase (figura 48), o que pode justificar a disfunção plaquetária que existe nesses pacientes.



**Figura 48:** resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em plaquetas de pacientes portadores de IRC em hemodiálise. ↓ redução significativa

em relação aos controles; ↑ aumento significativo em relação aos controles; = sem alteração significativa em relação aos controles.

Plaquetas de pacientes portadores de IRC em tratamento conservador mostraram um aumento da atividade da NOS associado com maior expressão tanto da iNOS como da eNOS. Curiosamente foram detectados menores concentrações de GMPc, não havendo no entanto, diferença nos padrões de agregação plaquetária induzida por colágeno ou ADP (figura 49).



**Figura 49:** resumo dos achados da via L-arginina-NO e ciclo da uréia em plaquetas de pacientes portadores de IRC em tratamento conservador. ↓ redução significativa em relação aos controles; ↑ aumento significativo em relação aos controles; = sem alteração significativa em relação aos controles.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen BW, Demchenko IT, Piantadosi CA. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. *J Appl Physiol*. 2009;106(2):662-7.

Alves de Sá Siqueira M, Martins MA, Rodrigues Pereira N, Moss MB, Santos SF, Mann GE et al. Modulation of the cationic amino acid transport system y+L by surface potential, ouabain and thrombin in human platelets: effects of uremia. *Nephron Exp Nephrol*. 2007;107(4):132-8.

Annik M, Zilmer AM, Fellstrom B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease. *Kidney Int. Suppl*. 2003; 84:S50-S53.

Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M ET al. Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2004; 37: 515-523.

Bagnost T, Berthelot A, Bouhaddi M, Laurant P, André C, Guillaume Y et al. Treatment with the arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 2008;26(6):1110-8.

Bagnost T, Ma L, da Silva RF, Rezakhaniha R, Houdayer C, Stergiopoulos N et al. Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. *Cardiovasc Res*. 2010 (in press).

Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology and therapeutic implications. *J Parent Ent Nut* 1985; 10: 227-38.

Beaumier L, Castillo L, Yu YM, Ajami AM, Young VR. Arginine: new and exciting developments for an "old" amino acid. *Biomed Environ Sci*. 1996;9(2-3):296-315.

Biel, M., X. Zong, A. Ludwig, A. Sautter, and F. Hofmann. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;135:151-171.

Boger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vasc Med*. 2005;10:S19-25.

Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Mann GE. Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J. Physiol*. 1996; 490:229-241.

Boos CJ, Lip GY. Is hypertension an inflammatory process? *Current Pharmaceutical Design* 2006;12(13):1623-1635.

Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H1577-H1584.

Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2001;8(12):1143-56.

Brunini TM, da Silva CD, Siqueira MA, Moss MB, Santos SF, Mendes-Ribeiro AC. Uremia, atherothrombosis and malnutrition: the role of L-arginine-nitric oxide pathway. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2006;6:133-40.

Brunini TM, Roberts NB, Yaqoob MM, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Activation of L-arginine transport in undialysed chronic renal failure and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(1-2):114-8.

Brunini TM, Roberts NB, Yaqoob MM, Reis PF, Ellory JC, Mann GE et al. Activation of L-arginine transport in peripheral blood mononuclear cells in chronic renal failure. *Pflugers Arch.* 2002;445(1):147-151.

Brunini TM, Yaqoob MM, Novaes Malagris LE, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Increased nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport via system  $\gamma(+)$ L. *Pflugers Arch.* 2003;445:547-50.

Brunini TMC, Moss MB, Siqueira MAS, Meirelles L, Rozentul A, Mann GE et al. Inhibition of L-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and N-monomethyl-L-arginine: effects of arterial hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(10):738-40.

Brunini TMC, Resende AC, Moss MB, Soares de Moura R, Mendes Ribeiro AC. L-arginine-availability as a pathological mechanism in essential hypertension, chronic renal and HF. *Vascular Disease Prevention* 2005; 2: 37-51.

Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J et al; Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* 2005;23:233-46.

Brzeszczynska J, Gwozdziński K. Nitric oxide induced oxidative changes in erythrocyte membrane components. *Cell Biol Int.* 2008;32(1):114-20.

Brzeszczynska J, Luciak M, Gwozdziński K. Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress. *Free Radic Res.* 2008;42(1):40-8.

Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schimitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high output-NO production. *American Journal of Physiology* 1996;271:H1988-H1998.

Campese VM, Tawadrous T, Bigazzi R, Bianchi S, Mann AS, Oparil S et al. Salt intake and plasma atrial natriuretic peptide and nitric oxide in hypertension. *Hypertension* 1996; 28: 335-340.

Campean V, Neureiter D, Varga I, Runk F, Reiman A, Garlich C, Achenbach S et al. Atherosclerosis and vascular calcification in chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res.* 2005;28:280-9.

Cardillo C, Panza JA. Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension. *Vasc Med* 1998; 3:138-144.

Cary SPL, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends in Biochemical Sciences* 2006; 31: 231-239.

Ceylan E, Aksoy N, Gencer M, Vural H, Keles H, Selek S. Evaluation of oxidative-antioxidative status and the L-arginine-nitric oxide pathway in asthmatic patients. *Respir Med.* 2005; 99: 871-876.

Chen CA, Druhan LJ, Varadharaj S, Chen YR, Zweier JL. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem.* 2008;283(40):27038-47.

Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *Journal of Cardiovascular Pharmacol.* 1996; 27:154-158.

Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;72:2106-10.

Chicoine LG, Paffet ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004; 287:L60-L68.

Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 1992;176:599-604.

Christensen HN, Cullen AM. Synthesis of metabolism-resistant substrates for the transport system for cationic amino acids; their stimulation of the release of insulin and glucagon, and of the urinary loss of amino acids related to cystinuria. *Biochim Biophys Acta.* 1973;298(4):932-950.

Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Föstermann U. Substrate supply for nitric oxide in macrophages and endothelial cells, role of cationic amino acid transporters. *Mol. Pharmacol.* 2000; 57:68-74.

Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr.* 2004;134(10):2752S-2759S.

Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1994; 330: 1036-1040.

Coman D, Yapfite-Lee J, Boneh A. New indications and controversies in arginine therapy. *Clin Nutr.* 2008;27(4):489-96.

Combet S, Ferrier ML, Van Landschoot M, Stoenoiu M, Moulin P, Miyata T et al. Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression, and structural modifications in the peritoneum. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(10):2146-57.

Cottone S, Mule G, Nardi E, Vadala A, Guarneri M, Briolotta C et al. Relation of C-reactive protein to oxidative stress and to endothelial activation in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2006;19(3):313-8.

Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(1):55-61.

Cylwik, D, Mogielnicki A, Buczek, W. L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacol Rep* 2005;57:14-22.

da Costa BP, Steibel JP, Antonello IC, Guimarães JA, Poli de Figueiredo CE. L-Arginine erythrocyte transport in normal pregnant and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(2):468-71.

Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, Friebe A. NO-sensitive guanylyl cyclase is the only NO receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost.* 2010 (no prelo).

da Silva CD, Brunini TM, Reis PF, Moss MB, Santos SF, Roberts NB et al. Effects of nutritional status on the L-arginine-nitric oxide pathway in platelets from hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2005;68:2173-9.

de la Pena NC, Sosa-Melgarejo JA, Ramos RR, Mendez JD. Inhibition of platelet aggregation by putrescine, spermidine and spermine in hypercholesterolemic rabbits. *Arch Med Res.* 2000;31:546-550.

de Meirelles LR, Mendes-Ribeiro AC, Mendes MA, da Silva MN, Ellory JC, Mann GE et al. Chronic exercise reduces platelet activation in hypertension: upregulation of the L-arginine-nitric oxide pathway. *Scand J Med Sci Sports.* 2009;19(1):67-74.

de Meirelles LR, Mendes-Ribeiro AC, Santoro MM, Mendes MA, da Silva MN, Mann GE et al. Inhibitory effects of endogenous L-arginine analogues on nitric oxide synthesis in platelets: role in platelet hyperaggregability in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(12):1267-71.

Demougeot C, Prigent-Tessier A, Bagnost T, Andre C, Guillaume Y, Bouhaddi M et al. Time course of vascular arginase expression and activity in spontaneously hypertensive rats *Life Sci*. 2007;80(12):1128-34.

Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2005;23:971-8.

Derbyshire, ER; Gunn, A; Ibrahim, M; Spiro, TG.; Britt, RD; Marletta, MA. Characterization of Two Different Five-Coordinate Soluble Guanylate Cyclase Ferrous-Nitrosyl Complexes. *Biochemistry*. 2008;47:3892-9.

Derbyshire ER, Fernhoff NB, Deng S, Marletta MA. Nucleotide regulation of soluble guanylate cyclase substrate specificity. *Biochemistry*. 2009;48(31):7519-24.

Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A et al. Balance between IL-1, TNF- $\alpha$  and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. *J. Immunol* 1995; 54: 882-892.

Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiol Rev*. 1998;78:487-545.

Didelon J, Blondel WC, Mazon P, Muller S, Gigout T, Gentils M et al. Validation of a test of the red cell membrane osmotic resistance. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2000;23(1):31-42.

Dizikes GJ, Grody WW, Kern RM, Cederbaum SD, Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of non-homology between the two human arginase genes. *Biochem Biophys Res Commun*.1986;141:53-59.

Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1999; 31: 51-60.

Dubei RK, Boegehold MA, Gillespie DG, Rosseli M. Increased nitric oxide activity in early renovascular hypertension. *Am J Physiology* 1996; 39:R118-R124.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2006;46:235-276.

Durak I, Ozturk HS, Elgun S, Cimen MY, Yalcin S. Erythrocyte nitric oxide metabolism in patients with chronic renal failure. *Clin. Nephrol*, 2001;55:460-464.

Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(9):906-11.

El Nahas AM, Bello A.K. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 2005;365:331-340.

El Nahas AM, Winearls CG. Chronic renal failure and its treatment. In: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrel DA, editores. *Oxford Textbook of Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 1996. p. 3294-3306.

Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 2002;277:38079–38086.

Featherston WR, Rogers QR, Freeland RA. Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. *Am J Physiol* 1973;224:127-129.

Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular research*. 1999;43:532-41.

Fort J. Chronic renal failure: a cardiovascular risk factor. *Kidney Int Suppl.* 2005;(99):S25-9.

Francis, S.H., I.V. Turko, and J.D. Corbin. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;65:1–52.

Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL et al. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res.* 1999;84:1416–1421.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.

Gabbasov Z, Parfyonova Ye, Popov E, Gavrilov I, Anuchin V, Dubov P et al. Association of platelet function in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy, transient myocardial ischemia, and coronary artery disease. *Platelets* 1998;9:191-195.

Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria, *FEBS Lett.* 1997; 418: 291–296.

Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res.* 2007;101(7):654-62.

Gladwin MT, Lancaster JR Jr, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med.* 2003;9:496-500.

Goch A, Banach M, Mikhailidis DP, Rysz J, Goch JH. Endothelial dysfunction in patients with noncomplicated and complicated hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2009;31(1):20-30.

Goi G, Massaccesi L, Baquero Herrera CJ, Musetti C, Ciurlino D, Cusi D ET al. Oxidative stress in elderly chronic renal failure patients: effects of renal replacement therapies on cell membrane fluidity. *J Nephrol.* 2009;22(5):630-6.

Gross R, Roye M, Manteghetti M, Broca C, Hillaire-Buys D, Masiello P et al. Mechanisms involved in the effect of nitric oxide synthase inhibition on L-arginine-induced insulin secretion. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120:495-501.

Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Cardiovascular disease in the dialysis population: prognostic significance of arterial disorders. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006;15:105-10.

Guzon OJ, Dellsperger KC. Cardiovascular issues in dialysis patients: challenges and newer insights. *Adv Perit Dial.* 2006;22:111-5.

Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets.* 2008;19(6):395-404.

Hermann M, Flammer A, Lüscher TF. Nitric Oxide in hypertension. *J. Clin. Hypertens.* 2006;8(4):17-29.

Hofmann, F., A. Ammendola, and J. Schlossmann. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 2000;113:1671–1676.

Holm T, Aukrust P, Aagaard AK. Hypertension in relation to nitric oxide, asymmetric dimethylarginine and inflammation: different patterns in heart transplant recipients and individuals with essential hypertension. *Transplantation.* 2002;74(10):1395-1400.

Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(1-2):1-8.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:9265-9269.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 1987;6:866–79.

Ignarro LJ. Nitric oxide as an unique signaling molecule in the vascular system: a hystorical overview. *J. Physiol. Pharmacol.* 2002; 53:503-14.

Ishikawa T, Harada T, Koi H, Kubota T, Azuma H, Aso T. Identification of arginase in human placental villi. *Placenta* 2007;28(2-3):133-138.

Ito M, Nishikawa M, Fujioka M, Miyahara M, Isaka N, Shiku H ET al. Characterization of the isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in human platelets and the effects of E4021. *Cell Signal.* 1996;8(8):575-81.

Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature.* 1996;380(6571):221-6.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection,

Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003 May 21;289(19):2560-72.

Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(4):R1057-62.

Juilfs, D.M., S. Soderling, F. Burns, and J.A. Beavo. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;135:67–104.

Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, Van Bibber MM, Choi SY de et al. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:14126–14131.

Kang ES, Ford K, Grokulsky G, et al. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med*. 2000;135:444-451.

Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cycl Nucl Prot Phosphoryl Res*. 1977;3: 23–5.

Kaw D, Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2006;19:317-22.

Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:273–289.

Kim PS, Iyer RK, Lu KV, Yu H, Karimi A, Kern RM et al. Expression of the liver form of arginase in erythrocytes. *Mol Genet Metab*. 2002;76(2):100-10.

Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 2006;107(7):2943-51.

Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M. New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. *Thromb Haemost*. 2007;98(5):970-4.

Konstantinova E, Ivanova L, Tolstaya T, Mironova E. Rheological properties of blood and parameters of platelets aggregation in arterial hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;35:135-138.

Kopple JD. Distúrbios renais e nutrição. Em: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC (eds.) *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. São Paulo: Editora Manole, 2003;1543-1578.



Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11):1988-96.

Lacza Z, Pankotai E, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front Biosci.* 2009;14:4436-43.

Lerzynski G, Suschek CV, Kolb-Bachofen V. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle. *Nitric Oxide* 2005;14:300-308.

Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2001;8:383-392.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R: Prospective studies collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. 2002;360:1903-1913.

Lewis GD, Witzke C, Colon-Hernandez P, Guerrero JL, Bloch KD, Semigran MJ. Sildenafil improves coronary artery patency in a canine model of platelet-mediated cyclic coronary occlusion after thrombolysis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1471–1477.

Lincoln J, Hoyle CHV, Burnstock, G. Nitric oxide in health and disease. UK: Cambridge University Press, 1997; 12-25.

Lorgeril M. Dietary arginine and the prevention of cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 1997;37:560-3.

Löwenberg EC, Meijers JC, Levi M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med.* 2010;68(6):242-51.

MacAllister RJ, Vallance P. Endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis: how important are they? *Exp Nephrol.* 1998;6(3):195-9.

Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003; 83:183-252.

Marin R, Goicoechea MA, Gorostidi M, Cases A, Diez J, Escolar G et al; Experts Committee of the Spanish Society of Nephrology. Guidelines of the Spanish Society of Nephrology: the kidney and cardiovascular disease. *Nefrologia.* 2006;26(1):31-44.

Marjanovic JA, Stojanovic A, Brovkovich VM, Skidgel RA, Du X. Signaling-mediated functional activation of inducible nitric-oxide synthase and its role in stimulating platelet activation. *J Biol Chem.* 2008;283(43):28827-34.

Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(4):313-9.

McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric oxide synthase may explain the "Arginine Paradox". *J. Biol. Chem.* 1997;272:31213-31216.

Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med.* 1995 Mar;125(3):370-7.

Mendes Ribeiro AC, Brunini TMC, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res.* 2001;49(4):697-712.

Mendes Ribeiro AC, Brunini TMC, Yaqoob M, Aronson JK, Mann GE, Ellory JC. Identification of system y<sup>+</sup>L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. *Pflugers Arch* 1999;438(4):573-5.

Mendes Ribeiro AC, Hanssen H, Kiessling K, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. *Clin Sci (Lond).* 1997;93(1):57-64.

Mendes-Ribeiro AC, Brunini, TM. L-arginine transport in disease. *Curr Med Chem Cardiovasc* 2004;2(2):123-131.

Mendez JD, Zarzoza E. Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;43:311-318.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):807-16.

Moal V, Brunet P, Dou L, Morange S, Sampol J, Berland Y. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(9):1834-41.

Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res.* 2004;95:560-7.

Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role on vascular biology. *Br J pharmacol.* 2006;(176Pt 1):213-254.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: Physiology and pathophysiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1997;811:60-67.

Moradi H, Kwok V, Vaziri ND. Effect of chronic renal failure on arginase and argininosuccinate synthetase expression. *Am J Nephrol.* 2006;26(3):310-8.

Morris Jr SM. Enzymes of arginine metabolism. *Journal of Nutrition* 2004;134:2743S-2747S.

Morris Jr SM. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 1992;12:81-101.

Morris Jr, SM. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nut* 2006;2:508S-512S.

Moss MB, Brunini TM, Soares De Moura R, Novaes Malagris LE, Roberts NB, Ellory JC et al. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. *Clin Sci.* 2004;107(4):391-397.

Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2008;40(3):180-96.

Müllershausen F, Russwurm M, Koesling D, Friebe A. In vivo reconstitution of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2004;15(9):4023-30.

Neiva TJ, Benedetti AL, Tanaka SM, Santos JI, D'Amico EA. Determination of serum aluminum, platelet aggregation and lipid peroxidation in hemodialyzed patients. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(3):345-50.

Ndisang JF, Wang R. Age-related alterations in soluble guanylyl cyclase and cGMP pathway in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2003;21(6):1117-24.

Nelin LD, Chicoine LG, Reber KM, English BK, Young TL, Liu Y. Cytokine-induced endothelial arginase expression is dependent on epidermal growth factor receptor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2005;33(4):394–401.

Noris M, Remuzzi G. Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies? *Blood* 1999;94(8):2569-2574.

Nurmohamed SA, Nube MJ. Reverse epidemiology: paradoxical observations in haemodialysis patients. *Neth J Med.* 2005;63:376-81.

Oliveira MB, Romao JE Jr, Zatz R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. *Kidney Int Suppl.* 2005;(97):S82-S86.

Ozüyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med.* 2008;14(7):314-22.

Packham MA, Mustard JF. Platelet aggregation and adenosine diphosphate/adenosine triphosphate receptors: a historical perspective. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(2):129-38.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-666.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-6.

Panza JÁ, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*, 1990; 323: 22-27.

Patterson D, McInnes GT, Webster J, Mitchell MM, Macdonald TM. Influence of a single dose of 20 mg tadalafil, a phosphodiesterase 5 inhibitor, on ambulatory blood pressure in subjects with hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;62(3):280-7.

Passos VMA, Assis TD, Barreto SM. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2006; 15(1):35-45.

Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*. 1998;97(3):263-7.

Perosa M, Genzini T. Pancreas-kidney transplantation in Brazil: current difficulties and perspectives. *Transplant Proc*. 1999;31:3005-3006.

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A et AL. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104:191-6.

Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Galiano Leone G, Bruni R et al. Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension. *Int J Cardiol*. 2009 Jan 23.

Peters AC, Netea MG, Janssen MC, Kullberg BJM, Van der Meer JW, Thien T. Pro-inflammatory cytokines in patient with essential hypertension. *Eur. J. Clin. Invest*. 2001;31:31-36.

Psychari SN, Sinos L, Iatrou C, Liakos G, Apostolou TS. Relations of inflammatory markers to lipid levels and autonomic tone in patients with moderate and severe chronic kidney disease and in patients under maintenance hemodialysis. *Clin Nephrol*. 2005;64(6):419-27.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(13):5193-7.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol*. 1987;92:639-646.

Raghavachari N, Xu X, Harris A, Villagra J, Logun C, Barb J et al. Amplified expression profiling of platelet transcriptome reveals changes in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease. *Circulation*. 2007;115(12):1551-62.

Rajapakse NW, Mattson DL. Role of L-arginine in nitric oxide production in health and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(3):249-55.

Reis PF, da Silva CD, Brunini TM, Moss MB, Siqueira MA et al. Plasma amino acid profile and L-arginine uptake in red blood cells from malnourished uremic patients. *J Ren Nutr*. 2006;16:325-31.

Remková A, Remko M. The role of renin - angiotensin system in prothrombotic state in essential hypertension. *Physiol Res*. 2010;59(1):13-23.

Reyes AA, Karl I, Klahr S. Role of L-arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol* 1994;267:331-346.

Ribeiro AB, Kohlmann Jr O, Tavares A. Definição, classificação e etiopatogenia da hipertensão arterial. In: Amodeo C, Lima EG, Vazquez EC, editores. *Hipertensão arterial*. São Paulo: Ed. Sarvier; 1997. p. 23-29.

Rios DR, Carvalho MG, Lwaleed BA, Simões e Silva AC, Borges KB, Dusse LM. Hemostatic changes in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis. *Clin Chim Acta*. 2010;411(3-4):135-9.

Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Guichard C, Bächler JP. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens Res*. 2007;30(12):1159-67.

Rodrigues Pereira N, Moss MB, Assumpção CR, Cardoso CB, Mann GE, Brunini TM et al. Oxidative stress, L-arginine-nitric oxide and arginase pathways in platelets from adolescents with anorexia nervosa. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(3):164-8.

Rodriguez S, Raul F, Richert L, Berthelot A. Increased arginase activity in aorta of mineralocorticoid-salthypertensive rats. *Cli. Exp. Hypertens* 2000; 22: 75-85.

Rodríguez-Crespo I, Gerber NC, Ortiz de Montellano PR. Endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem*. 1996; 271:11462-11467.

Romão Junior, JE. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J. Bras. Nefrol*. 2004;3:1-3.

Sabbatini M, Pisani A, Uccello F, Fuiano G, Alfieri R, Cesaro A et al. Arginase inhibition slows the progression of renal failure in rats with renal ablation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(4):F680-F687.

Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci*. 1995;57(22):2049-55.

Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ et al. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation*. 2004;110:3680-3686.

Schubert P, Devine DV. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang*. 2010 (no prelo).

Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(6):1115-26.

Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase caveolae and the development of atherosclerosis. *J. Physiol*. 2003;547:21-33.

Snyder S, Pendergraph B. Detection and evaluation of chronic kidney disease. *Am Fam Physician*. 2005;72:1723-32.

Sonmez A, Celebi G, Erdem G, Tapan S, Genc H, Tasci I et al. Plasma apelin and ADMA Levels in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2010;32(3):179-83.

Staessen JA, Li Y, Thijs L, Wang JG. Blood pressure reduction and cardiovascular prevention: an update including the 2003-2004 secondary prevention trials. *Hypertens Res*. 2005;28(5):385-407.

Stein WD. Carrier-mediated transport systems. In: Stein WD, editor. *Channels, carriers and pumps*. Londres: Academic Press London; 1996. p. 127-73.

Steuhr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1997; 37:339-59.

Suhr F, Porten S, Hertrich T, Brixius K, Schmidt A, Platen P, et al. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. *Nitric Oxide*. 2009;20(2):95-103.

Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine–nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996; 94: 1298–303.

Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem*. 1998;273:11044–11048.

Thijs A, Nanayakkara PW, Ter Wee PM, Huijgens PC, van Guldener C, Stehouwer CD. Mild-to-moderate renal impairment is associated with platelet activation: a cross-sectional study. *Clin Nephrol*. 2008;70(4):325-31.

Topal G, Brunet A, Walch L, Boucher JL, David-Dufilho M. Mitochondrial arginase II modulates nitric-oxide synthesis through nonfreely exchangeable L-arginine pools in human endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;318(3)1368-1374.

Tsuda K, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y. Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275:946-954.

Tsuda K. Oxidative stress and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: an electron spin resonance investigation. *Int Heart J.* 2010;51(2):121-4.

Turnbull F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet.* 2003;362(9395):1527-35.

Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide. *Nitric Oxide.* 2009;21(1):20-6.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Rev Bras Hip .* 2010;17(1):1-60.

Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1757:166-172.

Vallance P. Nitric Oxide: therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol* 2002;17:1-10.

Van Biesen W, de Bacquer D, Verbeke F, Delanghe J, Lameire N, Vanholder R. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. *Eur Heart J.* 2007;28(4):478-83.

Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM. Inhibition of transport system b<sub>0</sub>,+ in blastocysts by inorganic and organic cations yields insight into the structure of its amino acid receptor site. *Biochim Biophys Acta* 1990;1025: 215-224.

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension.* 2002;39(1):135-41.

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31(6):1248-1254.

Vecino AM, Teruel JL, Navarro JL, Cesar JM. Phospholipase A2 activity in platelets of patients with uremia. *Platelets.* 2002;13(7):415-8.

Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, et al. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation.* 2000;101:1261–1266.

Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Archives* 2004;447:532-42.

Vignini A, Nanetti L, Moroni C, Tanase L, Bartolini M, Luzzi S, et al. Modifications of platelet from Alzheimer disease patients: A possible relation between membrane properties and NO metabolites. *Neurobiol Aging.* 2007;28(7):987-94.

- Villanueva VR, Giret M. Human platelet arginase. *Mol. Cell. Chem.* 1980;33:97-100.
- Visigalli R, Barilli A, Parolari A, Sala R, Rotoli BM, Bussolati O, et al. Regulation of arginine transport and metabolism by protein kinase Calpha in endothelial cells: stimulation of CAT2 transporters and arginase activity. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(2):260-70.
- Vyssoulis GP, Tousoulis D, Antoniadis C, Dimitrakopoulos S, Zervoudaki A, Stefanadis C. Alpha-1 microglobulin as a new inflammatory marker in newly diagnosed hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2007;20(9):1016-21.
- Wilkens KG. Cuidado nutricional na doença renal. In: Krause MV, Mahan LK, editores. *Alimentos Nutrição e Dietoterapia.* São Paulo: Roca; 1998. p. 787-806.
- Wilson LS, Elbatarny HS, Crawley SW, Bennett BM, Maurice DH. Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(36):13650-5.
- Wong CK, Szeto CC, Chan MH, Leung CB, Li PK, Lam CW. Elevation of pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein and cardiac troponin T in chronic renal failure patients on dialysis. *Immunol Invest.* 2007;36:47-57.
- Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998; 336:1-17.
- Wu SG, Jeng FR, Wei SY, Su CZ, Chung TC, Chang WJ, et al. Red blood cell osmotic fragility in chronically hemodialyzed patients. *Nephron.* 1998;78(1):28-32.
- Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SAA, Janocha AJ, Gioggans T, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J.* 2004;18:1746-1748.
- Yang Z, Ming XF. Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8(1):54-9.
- Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, D'intini V, Ratanarat R, De Cal M, et al. Uremic toxins: a new focus on an old subject. *Semin Dial.* 2005;18(3):203-11.
- Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuna MA, Diez J. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem.* 2000;56:57-64.
- Zandi-Nejad K, Brenner BM. Strategies to retard the progression of chronic kidney disease. *Med Clin North Am.* 2005; 89: 489-509.
- Zhou XJ, Vaziri ND. Defective calcium signalling in uraemic platelets and its amelioration with long-term erythropoietin therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(6):992-7.



**ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética 1**

ANEXO 1



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

---

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2001

Do: Comitê de Ética em Pesquisa  
Prof.: Wille Oigman  
Para: Dr<sup>a</sup>. Patrícia Fonseca dos Reis  
Orient. Antônio Cláudio M. Ribeiro

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (451-CEP/HUPE)" ALTERAÇÕES DA VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E SUA CORRELAÇÃO O ESTADO NUTRICIONAL " dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 251 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O Comitê de Ética solicita a V. S<sup>a</sup>., periodicamente envie para este Comitê cópias dos Termos de consentimentos de seu projeto e que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

**ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética 2**

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

---

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2001

Do: Comitê de Ética em Pesquisa  
Prof.: Wille Oigman  
Para: Dr. Lucia E. Novaes Malagris  
Orient. Antônio Cláudio M. Ribeiro

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (450-CEP/HUPE)" A VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO E O CONTROLE DOP ESTRESS EM PACIENTES COM HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA " dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 251 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O Comitê de Ética solicita a V. Sa., periodicamente envie para este Comitê cópias dos Termos de consentimentos de seu projeto e que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Wille Oigman', is written over the typed name and title.

Prof. Wille Oigman  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

**ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido**

Título da pesquisa: **A via L-arginina-óxido nítrico em hipertensão arterial sistêmica e insuficiência renal crônica**

Pesquisadores participantes: **Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro e Mestranda Monique Bandeira Moss**

**Telefone para contato: (21)25876141 ou (21)81574255**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Hospital Universitário Pedro Ernesto

Clínica DERT – Depuração Extra Renal e Transplante Ltda.

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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito ou responsável

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Testemunha

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Testemunha

**ANEXO D - Protocolo de transporte de membrana 1**

DATA DA COLETA: \_\_\_\_\_ PRONTUARIO: \_\_\_\_\_

1- Nome: \_\_\_\_\_

2- Idade: \_\_\_\_\_ 3 – Sexo: ( ) F ( ) M

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

5-Etiologia: \_\_\_\_\_

6-Doenças associadas:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

7- Avaliação Nutricional:

Peso pós-dialise =                  Altura =                  IMC =                  Albumina =

Diagnóstico Nutricional = \_\_\_\_\_

8- Medicamentos :

( ) corticóide      ( ) B- bloqueador      ( ) ACCa      ( ) Inibidor da ECA

( ) diurético      ( ) anti-arritmico      ( ) aspirina      ( ) eritropoetina

( ) Cálcio      ( ) outros: \_\_\_\_\_

9- Pressão arterial pós-diálise: \_\_\_\_\_

10- Kt / V uréia: \_\_\_\_\_

11- Tempo de diálise: \_\_\_\_\_

12- Duração da diálise: \_\_\_\_\_

13- Exames Laboratoriais Pós-diálise:

Hematócrito		Leucócitos	
Hemoglobina		Neu	
Creatinina		Linf	
Uréia		Eos	
K		Baso	
Na		Bastões	
Ca		Mono	
P		Plaquetas	
Mg		Glicose	
TG		Acido Ur	
Col. Total		Ptn total	
Albumina		Proteína C	
Fibrinogênio			

**ANEXO E - Protocolo de transporte de membrana 2****DATA DA COLETA:** \_\_\_\_\_ **MATRÍCULA:** \_\_\_\_\_1- **Nome:** \_\_\_\_\_2 – **Idade:** \_\_\_\_\_3 – **Sexo:** ( ) F ( ) M4 – **Raça:** ( ) Branca ( ) Negra ( ) Mestiça5- **Etiologia:** \_\_\_\_\_6- \_\_\_\_\_ **Doenças**  
associadas: \_\_\_\_\_7- **Fatores de Risco Cardiovascular:**( ) **História Familiar** Quem? \_\_\_\_\_( ) **Tabagismo** Nº \_\_\_\_\_ Tempo \_\_\_\_\_ Quando Parou? \_\_\_\_\_( ) **Etilismo** Qual? \_\_\_\_\_ Quantidade? \_\_\_\_\_( ) **Sedentarismo**( ) **Dislipidemia**( ) **Obesidade** Grau? \_\_\_\_\_( ) **Menopausa** Quando? \_\_\_\_\_ Faz reposição? \_\_\_\_\_8 – **Avaliação Nutricional:**

Peso =                      Altura =                      IMC =

Circunf. Quadril =              Circunf. Cintura =              Relação Cint-Quadril=

Diagnóstico Nutricional = \_\_\_\_\_

9 – Medicamentos :

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

- ( ) corticóide              ( ) beta- bloqueador              ( ) metildopa              ( ) inibidor da ECA  
 ( ) diurético              ( ) anti-arrítmico              ( ) antagonistas AT2  
 ( ) bloq cálcio              ( ) reposição hormonal              ( ) AINE  
 ( ) outros: \_\_\_\_\_

10 – Exames Laboratoriais

Data: \_\_\_\_\_

Hematócrito		Leucócitos	
Hemoglobina		Neu	
Creatinina		Linf	
Uréia		Eos	
K		Baso	
Na		Bastões	
Ca <sup>++</sup>		Mono	

Col. Total		Plaquetas	
Col. LDL		Glicose	
Col. HDL		Ácido Úrico	
TG		Ptn total	
Proteína C		Fibrinogênio	



**ANEXO F - Trabalhos publicados e submetidos no período de 2007 a 2010**

1. PEREIRA, N. R., BRUNINI, T. M. C., ASSUMPCAO, C. R., MOSS, M. B., CARDOSO, C., MANN, G e, RIBEIRO, A. C. M. Oxidative stress, L-arginine-nitric oxide and arginase pathways in platelets from adolescents with anorexia nervosa. *Blood Cells, Molecules & Diseases.* , v.44, p.164 - 168, 2010.
2. MOSS, M. B., BRUNINI, T. M. C., MANN, G e, SIQUEIRA, M. A. S., RIBEIRO, A. C. M. Platelet aggregation in arterial hypertension. Is there a nitric oxide-urea connection?. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology.* , v.37, p.167 - 172, 2010.
3. COSTA, C. A., AMARAL, T. A. S., CARVALHO, L. C. R. M., OGNIBENE, D. T., DA SILVA, A. F. E., MOSS, M. B., VALENÇA, S. S., DE MOURA, R. S., RESENDE, A. C. Antioxidant Treatment With Tempol and Apocynin Prevents Endothelial Dysfunction and Development of Renovascular Hypertension. *American Journal of Hypertension.* , v.22, p.1242 - 1249, 2009.
4. MALLAGRIS, L. E. N., BRUNINI, T. M. C., MOSS, M. B., SPOSITO, B., SILVA, P. J. A., RIBEIRO, A. C. M. Evidências biológicas do treino de controle do stress em pacientes com hipertensão. *Psicologia. Reflexão e Crítica.* , v.22, p.60 - 68, 2009.
5. RIBEIRO, A. C. M., MATSUURA, C., MEIRELLES, L. R., MOSS, M. B., MANN, G e, BRUNINI, T. M. C. The role of exercise on L-arginine-nitric oxide pathway in chronic heart failure. *The Open Biochemistry Journal.* , v.3, p.66 - 76, 2009.
6. RIBEIRO, A. C. M., ELLORY, J C, MOSS, M. B., MORAES, T., SIQUEIRA, M., MANN, G e, BRUNINI, T. M. C. Dengue fever activates the L-arginine-Nitric Oxide pathway: an explanation for reduced aggregation of human platelets. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology.* , v.35, p.1143 - 1146, 2008.
7. SIQUEIRA, M. A. S., MOSS, M. B., RIBEIRO, A. C. M., PEREIRA, N. R., MARTINS, M. A., MANN, G. e BRUNINI, T. M. C. Modulation of the aminoacid transport system  $\gamma$ +L by surface potential, ouabain and thrombin in human platelets: effects of uremia. *Nephron. Experimental Nephrology.* , v.107, p.e132 - e138, 2007.
8. BRUNINI, T. M. C., SANTOS, S. F. F., SIQUEIRA, M. A. S., MOSS, M. B., LUGON, J. R., RIBEIRO, A. C. M. Nitric oxide, malnutrition and chronic renal failure. *Current Medicinal Chemistry. Cardiovascular & Hematological Agents.* , v.5, p.155 - 161, 2007.
9. OGNIBENE D, MOSS, M. B., BRUNINI, T. M. C., SIQUEIRA, M. A., MATSUURA, C., DE MOURA, R. S., RIBEIRO, A. C. M., RESENDE, A. C. Characterization of L-arginine-NO-cGMP pathway in spontaneously hypertensive rat platelets: the effects of pregnancy. *Hypertension Research.* , 2010 (aceito para publicação).

10. SIQUEIRA, M.A.S., MOSS, M.B., BRUNINI, T.M.C., PEREIRA, N.R., MARTINS, M.A., SANTOS, S.F., LUGON J., Mendes-Ribeiro, A.C. Expression and activity of nitric oxide synthases in platelets from severe chronic renal failure patients (Submetido ao periodico Platelets).

**ANEXO G** - Apresentações em congressos e publicados em anais de eventos no período de 2007 a 2010

1. MOSS, M. B., BRUNINI, T. M. C., MANN, G e, RIBEIRO, A. C. M. Effects of essential hypertension on platelet function, nitric oxide synthase and arginase in platelets. In: 60th Annual Meeting British Microcirculation Society, 2010, Exeter. Proceedings of the 60th Annual Meeting British Microcirculation Society. , 2010. p.74 – 74 (este trabalho ganhou o prêmio de melhor poster do congresso)
2. MOSS, M. B., BRUNINI, T. M. C., BICHARRA, J., MOSS V.B., MURY, W. V., SIQUEIRA, M. A. S., SANTOS, S F F, RIBEIRO, A. C. M. Diminuição da atividade da arginase associada à hiperexpressão da óxido nítrico sintase em plaquetas na uremia In: XXIV Reunião Anual da FESBE, 2009, Águas de Lindóia. Anais da XXIV Reunião Anual da FESBE. , 2009. p.27008 - 27008
3. MOSS, M. B., MOSS V.B., SIQUEIRA, M. A. S., MURY, W. V., DOS SANTOS, C.G, MANN, G e, BRUNINI, T. M. C., RIBEIRO, A. C. M. Effects of systemic arterial hypertension on nitric oxide synthase activity and expression, arginase activity and lipid peroxidation in human platelets In: Physiological Society Meeting, 2009, Dublin. Proceedings of Physiological Society. , 2009. v.15. p.149 - 150
4. PEREIRA, N. R., BRUNINI, T. M. C., MANN, G e, MOSS, M. B., ASSUMPCAO, C. R., RIBEIRO, A. C. M. Nitric oxide production and bioavailability in red blood cells from patients with anorexia nervosa In: Physiological Society Meeting, 2009, Dublin. Proceedings of Physiological Society. , 2009. v.15. p.153 - 153
5. FONTOURA P.C.S, BRUNINI, T. M. C., PINTO V.L., MATSUURA, C., MOSS, M. B., SILVA, O., ELIE, C., RIBEIRO, A. M. C. Platelet L-arginine-nitric oxide pathway in bipolar disorder In: Physiological Society Meeting, 2009, Dublin. Proceedings of Physiological Society. , 2009. v.15. p.134 - 134
6. MATSUURA, C., BRUNINI, T. M. C., ZEITOUNE, R., MOSS, M. B., CARVALHO, J.J., GARCIA, A.B., RIBEIRO, A. C. M. Upregulation of platelet L-arginine-nitric oxide pathway may contribute to the hypotensive effect of exercise training In: Physiological Society Meeting, 2009, Dublin. Proceedings of Physiological Society. , 2009. v.15. p.153 - 153
7. FONTOURA P.C.S, MOSS, M. B., MATSUURA, C., RIBEIRO, A. C. M., BRUNINI, T. M. C. A expressão e atividade da iNOS e eNOS, atividade da arginase e estresse oxidativo em células sanguíneas de pacientes hipertensos In: 17ª Semana de Iniciação Científica UERJ, 2008, Rio de Janeiro. Anais 17ª Semana de Iniciação Científica UERJ. , 2008.
8. SIQUEIRA, M., MOSS, M. B., SANTOS, S F F, BRUNINI, T. M. C., PEREIRA N.R., RIBEIRO, A. C. M. Disfunção plaquetária na insuficiência renal moderada:

papel da via L-arginina-óxido nítrico In: 2º Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia e XXII Congresso Português de Nefrologia, 2008. Proceedings do 2º Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia e XXII Congresso Português de Nefrologia. , 2008. p.xx-xx - xx-xx

9. SIQUEIRA, M., MARTINS, M.A., MOSS, M. B., BRUNINI, T. M. C., LUGON, J R, PEREIRA, N.R., RIBEIRO, A. C. M. Hiperatividade e expressão aumentada da óxido nítrico sintase plaquetária na insuficiência renal em tratamento conservador In: XXIV Congresso de Nefrologia e 14º Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia, 2008, Curitiba. J Bras de Nefrologia. , 2008. v.30. p.35 - 35

10. OKINGA A., BRUNINI, T. M. C., MOSS, M. B., RESENDE, A. C., MANN, G e, RIBEIRO, A. C. M. Intraplatelet L-arginine-nitric oxide and vascular reactivity in an animal model of postnatal stress In: Physiological Society Meeting, 2008, Londres. Proc Physiol Soc., 2008. v.13. p.PC-3 - PC-3

11. MOSS V.B., BRUNINI, T.M.C., MOSS, M. B., MARTINS, M.A., SIQUEIRA, M., PEREIRA, N.R., RIBEIRO, A. C. M. O efeito da insuficiência renal em estágios moderados na via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas e sua relação com a função plaquetária In: 17ª Semana de Iniciação Científica UERJ, 2008, Rio de Janeiro. Anais da 17ª Semana de Iniciação Científica UERJ. , 2008. p.31 - 31

12. MORAES, T., BRUNINI, T. M C., MOSS, M. B., SIQUEIRA, M., RIBEIRO, A. C. M. O papel da via L-arginina-óxido nítrico em plaquetas de pacientes com Dengue Hemorrágica In: XXII Reunião Anual da FESBE, 2007, Águas de Lindóia. Anais da XXII Reunião Anual da FESBE. , 2007. v.26.004.

13. SANTOS, S F F, BRUNINI, T. M. C., MOSS, M. B., SIQUEIRA, M., SILVA, C. V. D., RIBEIRO, Antônio Cláudio Mendes  
Platelet Inactivation in Chronic Renal Failure: Role of L-Arginine-NO Pathway and Urea Cycle In: ASN 40th Annual Renal Week Meeting, 2007, São Francisco. Proceedings do ASN 40th Annual Renal Week Meeting. , 2007. p.PO388 -

14. RIBEIRO, A. C. M. , SIQUEIRA, M., MOSS, M. B., PANARO R., BROEDES D.S., PINTO V.L., BRUNINI, T. M. C. The role of the L-Arginine-nitric oxide pathway in platelets from patients with dengue fever In: Young Physiologist Symposium, Joint Meeting of Physiological Society and Brazilian Society of Physiology, 2006, Ribeirão Preto. Proceedings do Young Physiologist Symposium, Joint Meeting of Physiological Society and Brazilian Society of Physiology., 2007. p.25P -

# 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](#)