



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Daniele Carvalho Abrantes

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

Rio de Janeiro

2014

Daniele Carvalho Abrantes

Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes-Ribeiro
Coorientadora: Prof^a. Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini

Rio de Janeiro

2014

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

A161 Abrantes, Daniele Carvalho.
Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise / Daniele Carvalho Abrantes. – 2014.
69 f.

Orientador: Antônio Cláudio Mendes-Ribeiro.
Coorientadora: Tatiana Marlowe Cunha Brunini.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Insuficiência renal crônica – Teses. 2. Óxido nítrico – Teses. 3. Neutrófilos – Teses. 4. Plaquetas (Sangue) - Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. 6. Arginina – Teses. I. Ribeiro, Antônio Cláudio Mendes. II. Brunini, Tatiana Marlowe Cunha. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 577.112.385

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

Assinatura

Data

Daniele Carvalho Abrantes

Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes-Ribeiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes -UERJ

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini (Coorientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes -UERJ

Prof^a. Dra. Monique Bandeira Moss
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Sérgio Fernando Ferreira dos Santos
Faculdade de Ciências Médicas -UERJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jarbas e Heloísa, duas pessoas que tenho orgulho e apreço por todo incentivo e dedicação que tiveram por mim. E ao meu marido, Vinícius, que me faz feliz e me surpreende a cada dia com o seu jeito carinhoso e amoroso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me guiado e iluminado durante essa etapa da minha vida.

Ao meu marido, Vinícius, que me deu forças e me compreendeu principalmente nos momentos mais difíceis desta caminhada. Você é o meu ponto de equilíbrio, TE AMO.

Aos meus pais, Jarbas e Heloísa, que mesmo à distância sempre se preocuparam e me deram apoio e carinho quando precisei. Sou muito grata pelos ensinamentos e valores que vocês me proporcionaram durante toda a vida.

Ao meu irmão, Rafael, um menino exemplar e muito brincalhão, me divirto quando estou ao seu lado. Sinto muitas saudades do tempo em que brincávamos juntos.

Aos meus avós, tios e tias que sempre se preocupam comigo e sempre me incentivam nas escolhas que faço.

Aos meus sogros, Teka e Valberto, que me adotaram como uma filha.

Ao meu afilhado, Benício, que mesmo tão distante me proporciona momentos de alegria e entusiasmo com as poucas palavras que me diz: “Vai dar tudo certo madinha”.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Cláudio Mendes Ribeiro, por ter me acolhido com muito carinho no Laboratório de Transporte de Membrana (LTM) e me incentivado na pesquisa.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Tatiana M. C. Brunini, pelo carinho e confiança que sempre depositou em mim, desde o nosso primeiro encontro nos corredores do IBRAG. Professora, você foi muito importante durante essa caminhada, acrescentando conhecimento e novas experiências.

À Prof. Dra. Cristiane Matsuura, que com sua serenidade sempre me acalmou nos momentos de estresse, tirando dúvidas e ajudando sempre que preciso.

À Monique Oliveira, uma amiga e companheira de todas as horas. Uma pessoa muito focada em tudo que faz. Muito obrigada pelo apoio profissional e emocional que me proporcionou nestes anos.

À Wandinha, que sempre esteve do meu lado nos momentos bons e ruins e sempre me deu forças e me alegrou com seu jeito extrovertido de ser.

A Marcelinha e Mari pelos conselhos e a experiência que me passaram. Vocês sempre estiveram prontas para me ajudar nos momentos difíceis. Muito obrigada!

Ao Daniel, meu parceiro do mestrado, um amigo muito esforçado e dedicado sempre pronto para ajudar em qualquer dificuldade.

Aos amigos Marcos e Márcia, Iara, Ive, Monique Moss e Claudinha pelos momentos bons e divertidos que passamos juntos, e pela preocupação que sempre tiveram comigo.

Aos alunos de iniciação científica, Carol Corrêa, Nathalia Pinto, Carol Chamma, Natália Brigido e Eduardo.

Às meninas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Mediciniais, Cris Aguiar, Grazi, Vivi e Iza. Sempre muito solícitas às minhas dúvidas e dificuldades.

Os meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa trajetória. Sem o apoio e a amizade de todos vocês não seria possível a realização desta etapa tão importante na minha vida profissional

Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao fim e ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa.

Mahatma Gandhi

RESUMO

ABRANTES, Daniele Carvalho. *Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise*. 2014. 69f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A insuficiência renal crônica (IRC) é uma síndrome clínica de elevada prevalência no Brasil, que pode ser definida por perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina), e que está associada a um elevado risco de morbidade e mortalidade cardiovascular devido aos eventos aterotrombóticos. O óxido nítrico (NO), uma pequena molécula gasosa, é produzido através da conversão do aminoácido catiônico L-arginina em L-citrulina e NO em uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas NO-sintases (NOS), e modula o relaxamento do músculo liso vascular, sistema imune e a função plaquetária. O objetivo desta dissertação foi avaliar a via L-arginina-NO em neutrófilos, e investigar a função plaquetária e o estresse oxidativo em pacientes com IRC em hemodiálise. O transporte de L-arginina, a atividade e a expressão das isoformas da NOS (iNOS e eNOS), níveis de L-arginina em neutrófilos, o estado oxidativo sistêmico - carbonilação de proteínas e peroxidação lipídica; atividade da glutathione peroxidase (GPx) e da catalase - o efeito dos neutrófilos na função plaquetária, bem como o "burst" oxidativo em neutrófilos foram avaliados nos dois grupos. Quinze pacientes com IRC em hemodiálise e quinze indivíduos saudáveis pareados por idade foram incluídos no estudo. Nossos resultados mostraram uma redução da atividade da NOS em neutrófilos nos pacientes com IRC em hemodiálise, quando comparados aos controles. Isto ocorreu na presença de concentrações normais do substrato L-arginina e de seu transporte, e da expressão inalterada das isoformas eNOS e iNOS. A agregação plaquetária foi reduzida após a incubação com neutrófilos por 5 e 30 minutos tanto no grupo de pacientes como em controles, não havendo diferenças entre os grupos. Os marcadores de estresse oxidativo, avaliados através da quantificação da oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, e pela atividade das enzimas antioxidantes catalase e GPx, não foram modificadas no soro de pacientes com IRC em hemodiálise. Outra análise avaliou a produção do ânion superóxido, uma espécie reativa de oxigênio, em neutrófilos estimulados, mas não apresentaram diferenças em neutrófilos de pacientes com IRC em hemodiálise. O estudo demonstrou uma produção reduzida de NO em neutrófilos de pacientes com IRC em hemodiálise, e a importância dos neutrófilos na homeostasia vascular. Portanto, este pode ser um elo entre esta síndrome e a doença cardiovascular.

Palavras-chave: Óxido nítrico. Neutrófilos. Estresse oxidativo. Plaquetas.

Insuficiência renal crônica

ABSTRACT

ABRANTES, Daniele Carvalho. *Molecular and cellular mechanisms involved in the modulation of the L-arginine-nitric oxide in patients with chronic renal failure on hemodialysis*. 2014. 69f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014

Chronic renal failure (CRF) is a clinical syndrome with high prevalence in Brazil, which can be defined by a progressive and irreversible decline in renal function (glomerular, tubular and endocrine). It is associated with a high risk of cardiovascular morbidity and mortality due to atherothrombotic events. Nitric oxide (NO), a small gaseous molecule, is produced through the conversion of the cationic amino acid L-arginine to L-citrulline and NO in a reaction catalyzed by a family of enzymes called NO synthases (NOS) and modulates the relaxation of vascular smooth muscle, immune system and the platelet function. The objective of this dissertation was to evaluate L-arginine-NO pathway, as well as to investigate platelet function and oxidative stress in patients with CRF on hemodialysis (HD). L-arginine transport, the activity and expression of NOS isoforms (eNOS and iNOS) and L-arginine levels in neutrophils, systemic oxidative status (Protein oxidation and lipid peroxidation; glutathione peroxidase-GPx, and catalase activities), the effects of neutrophils in platelet function and oxidative burst were measured in patients with CRF on HD. Fifteen patients with CRF on maintenance HD and fifteen healthy controls matched by age were included in this study. Our results showed reduced NOS activity in neutrophils from CRF patients on HD compared to controls. This happened in the presence of normal concentration of L-arginine and its transport, and unaltered expression of endothelial and inducible NOS. Platelet aggregation was diminished after incubation for 5 and 30 minutes with neutrophils from patients with CRF and controls without difference between the groups. Systemic oxidative stress markers evaluated by protein oxidation and lipid peroxidation; anti-oxidant enzymes GPx, and catalase activities were not modified in serum by CRF. Another analysis evaluated the production of superoxide in neutrophils stimulated, and there was no difference in neutrophils by CRF. Our results demonstrated reduced NO production in neutrophils from CRF patients on hemodialysis, independent of L-arginine bioavailability, and the importance of neutrophils in platelet function. Therefore, there may be a link between this syndrome and cardiovascular disease.

Keywords: Nitric Oxide. Neutrophils. Oxidative stress. Platelets. Chronic renal failure

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Estágio e classificação da doença renal.....	18
Figura 1 -	A síntese da L-arginina em seres humanos.....	25
Figura 2 -	Esquema das espécies reativas e oxigênio e sistema de defesa antioxidante enzimático.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Cinética temporal do influxo de L-arginina.....	33
Gráfico 2 –	Influxo total de L-arginina em neutrófilos.....	42
Gráfico 3 –	Influxo de L-arginina via sistema γ^+ em neutrófilos	42
Gráfico 4 –	Influxo de L-arginina via sistema γ^+L em neutrófilos.....	43
Gráfico 5 –	Produção basal de L[3H]- citrulina em neutrófilos.....	43
Gráfico 6 –	Efeito dos neutrófilos na agregação plaquetária induzida por ADP.....	44
Gráfico 7 –	Ilustrativo do percentual de agregação plaquetária.....	44
Gráfico 8 –	Expressão da enzima iNOS em neutrófilos.....	46
Gráfico 9 –	Expressão da enzima eNOS em neutrófilos.....	47
Gráfico 10 –	Atividade da enzima catalase em soro.....	47
Gráfico 11 –	Atividade da enzima glutathiona peroxidase em soro.....	48
Gráfico 12 –	Carbonilação de proteínas em soro.....	48
Gráfico 13 –	Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em soro.....	49
Gráfico 14 –	Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais características das três isoformas da NOS.....	23
Tabela 2 -	Características demográficas, etiológicas e nutricionais.....	40
Tabela 3 -	Dados laboratoriais.....	41
Tabela 4 -	Perfil de aminoácidos nos neutrófilos.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	Dimetil-L-arginina-assimétrica
ADP	Adenosina difosfato
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CAT	Catalase
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes Mellitus
DNPH	2,4 Dinitrofenilhidrazina
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EP	Erro padrão
TFG	Taxa de filtração glomerular
GP	Glicoproteína
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSSH	Glutaciona reduzida
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCl	Ácido clorídrico
HD	Hemodiálise
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IMC	Índice de massa corporal
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRC	Insuficiência renal crônica
K _m	Constante de afinidade
Kt/ V ureia	Medida da qualidade de diálise
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

L-NMMA	N-monometil-L-arginina
MLV	Músculo liso vascular
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH [·]	Radical hidroxila
ONOO [·]	Peroxinitrito
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PMA	Phorbol-12-myriaste-13 acetato
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
QL	Quimioluminescência
SDS	Sódio dodecil sulfato
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Insuficiência renal crônica	18
1.1.1	<u>Definição, etiologia e classificação</u>	18
1.1.2	<u>Insuficiência renal e doenças cardiovasculares</u>	20
1.1.3	<u>Insuficiência renal, NO e alterações do sistema imune e plaquetas</u>	20
1.2	A via L-arginina-NO-GMPc	22
1.2.1	<u>Histórico, síntese do NO e principais funções</u>	22
1.2.2	<u>L-arginina: síntese, metabolismo e transportadores</u>	24
1.2.3	<u>Via L-arginina-NO-GMPc em neutrófilos e plaquetas</u>	26
1.3	Estresse oxidativo	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivos gerais	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Seleção dos indivíduos	30
3.2	Isolamento de neutrófilos	30
3.3	Isolamento de plaquetas	31
3.4	Avaliação laboratorial	31
3.5	Transporte de L-arginina em neutrófilos	32
3.5.1	<u>Cálculo do influxo</u>	32
3.6	Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase em neutrófilos	34
3.7	Neutrófilos e agregação plaquetária	34
3.8	Dosagem de aminoácidos em neutrófilos	35
3.9	Dosagem de proteínas em neutrófilos	35
3.10	Extração de proteínas e western blotting em neutrófilos	35
3.11	Avaliação do estresse oxidativo em soro	36
3.11.1	<u>Atividade da catalase</u>	36
3.11.2	<u>Atividade da glutathione peroxidase</u>	37
3.11.3	<u>Carbonilação de proteínas</u>	37

3.11.4	<u>Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)</u>	37
3.12	Análise do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos	38
3.13	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Características demográficas (idade e sexo), etiológicas e dados laboratoriais e clínicos	40
4.2	Transporte de L-arginina em neutrófilos	42
4.3	Atividade da NOS em neutrófilos	43
4.4	Efeitos dos neutrófilos na agregação plaquetária	44
4.5	Dosagem de aminoácidos em neutrófilos	45
4.6	Western Blotting em neutrófilos	46
4.7	Atividade da catalase em soro	47
4.8	Atividade da glutathiona peroxidase em soro	48
4.9	Carbonilação de proteínas em soro	48
4.10	Avaliação da peroxidação lipídica em soro	49
4.11	Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos	49
5	DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	APENDICE - Questionário	67
	ANEXO A – Comitê de ética em Pesquisa HUPE/UERJ	68
	ANEXO B - Termo de Consetimento Livre e Esclarecido	69

INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica (IRC) ocorre devido a uma perda progressiva e irreversível da função renal (1). Nos estágios avançados de IRC, os pacientes desenvolvem uma síndrome denominada uremia, na qual praticamente todos tecidos e órgãos são afetados e se torna necessária uma terapia renal de substituição, diálise ou transplante renal (2).

A síndrome urêmica caracteriza-se pelo acúmulo de metabólitos, que em condições normais seriam excretados pelos rins. Quando estes compostos interferem nas funções biológicas ou bioquímicas, são denominados de toxinas urêmicas (3).

Na IRC, existe uma disfunção endotelial, aterosclerose acelerada e uma elevada incidência de complicações tromboembólicas (4). Neste contexto, as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de mortalidade nos pacientes com IRC, que apresentam índices anuais 10 a 20 vezes superiores à população em geral (5). No entanto, tem sido demonstrado que os fatores de riscos cardiovasculares tradicionais, como hipertensão arterial e dislipidemia, explicam apenas parcialmente a elevada incidência da doença cardiovascular nesses pacientes. Vem surgindo uma crescente busca de fatores de risco não tradicionais como, por exemplo, ativação inflamatória, os análogos da L-arginina (ex. dimetilarginina assimétrica - ADMA) (6) e o estresse oxidativo (7).

A disfunção do sistema imune nestes pacientes é um processo multifatorial e complexo. Paradoxalmente, existe um estado de ativação celular e uma acentuada imunodeficiência (8). Um dos fatores associados a essa disfunção é o elevado nível sérico de mediadores inflamatórios nos pacientes em estágio avançado de IRC. A piora da função renal e o aparecimento da uremia estão associados a um aumento significativo dos níveis de citocinas como IL-6, TNF-alfa e INF- γ (9).

Os neutrófilos são células efetoras na resposta imune inata à lesão ou à infecção. Além da participação na função imune, os neutrófilos podem exercer uma função antitrombótica pela inibição da ativação plaquetária (10), e também estão envolvidos na formação da placa aterosclerótica (11).

O óxido nítrico (NO) é um gás inorgânico de meia vida curta produzido no endotélio vascular, nas plaquetas, nos neutrófilos e em várias outras células através

das enzimas NO sintases (NOS), tendo como precursor o aminoácido catiônico L-arginina (12). Alguns estudos mostraram que o NO pode exercer um efeito sobre os neutrófilos, estimulando o aumento da secreção de citocinas, incluindo TNF- α e IL-8 (13).

Além disso, o NO apresenta uma função reguladora da agregação plaquetária, induzindo a desagregação das plaquetas agregadas e inibindo a adesão plaquetária (14). Uma hipótese da interação plaqueta-neutrófilo é de que o NO derivado dos neutrófilos possa inibir diretamente a ativação plaquetária por aumentar a quantidade de GMPc intraplaquetário (10).

É importante considerar que a biodisponibilidade de NO não depende somente da sua síntese como também da degradação, mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o ânion superóxido (O_2^-) (15). A síntese de NO, em várias doenças e diferentes tipos celulares, depende do influxo da L-arginina extracelular. Essa dependência, que ocorre mesmo quando o nível intracelular de L-arginina disponível está em excesso, é denominado “paradoxo da L-arginina” (16). O transporte de aminoácidos catiônicos como a L-arginina pode ocorrer por quatro sistemas de transportes em mamíferos. Nos leucócitos, o transporte é feito pelos transportadores y^+ e y^+L (17). O sistema de transporte y^+ é seletivo para aminoácidos catiônicos e Na^+ - independente. Já o sistema de transporte y^+L transporta aminoácidos básicos sem Na^+ , e aminoácidos neutros só na presença de Na^+ (18).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Insuficiência renal crônica

1.1.1 Definição, etiologia e classificação

A doença renal crônica (DRC) apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Atualmente, tem sido considerada um importante problema de saúde pública, pois a incidência e prevalência da doença tem aumentado a cada ano no Brasil e em todo o mundo (19).

A DRC se baseia em alterações na taxa de filtração glomerular e/ou presença de lesões parenquimatosas mantidas por pelo menos três meses, que pode levar a uma perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina) (20).

Nas fases mais avançadas da doença, os rins não conseguem manter a normalidade do meio interno, resultando em perda da função renal e no desenvolvimento de insuficiência renal crônica (IRC). Nas fases terminais, os pacientes desenvolvem uma síndrome denominada uremia, onde praticamente todos tecidos e órgãos são afetados e se torna necessária uma terapia renal de substituição, diálise ou transplante renal (21).

A DRC é dividida em seis estágios funcionais de acordo com o grau de função renal do paciente (Quadro 1).

Quadro 1 - Estágios e classificação da doença renal crônica

Estágio	Filtração Glomerular (ml/min)	Grau de Insuficiência Renal
0	>90	Grupos de risco para DRC, ausência de lesão renal
1	>90	Lesão renal com função renal normal

2	60-89	IR leve ou funcional
3	30-59	IR moderada ou laboratorial
4	15-29	IR severa ou clínica
5	<15	IR terminal ou dialítica

IR, insuficiência renal; DRC, doença renal crônica

Legenda: De acordo com Romão Junior, 2004 (21).

As maiores causas de DRC são hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes mellitus* (DM), glomerulonefrites, pielonefrite e doença renovascular (22). Os indivíduos portadores de HAS, de DM, ou história familiar de doença renal crônica têm maior probabilidade de desenvolverem IRC. Conforme dados do último censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia realizado em 2012, o número de pacientes em diálise por ano é de 97.586, sendo que 33,8% apresentam HAS e 28,5%, DM como diagnóstico de base (23).

A IRC promove o comprometimento do sistema fisiológico com profundas consequências médicas e sociais, caracterizadas por um comprometimento na qualidade de vida, na produtividade e na sobrevivência (24).

A uremia, uma condição fisiológica característica na IRC, ocorre pelo acúmulo de metabólitos, que em situações normais seriam excretados pelos rins. Vários estudos mostram a concentrações elevadas de toxinas urêmicas, como p-cresol, ureia nitrogenada, ácido úrico e poliaminas (25). Esses compostos, quando não eliminados, comprometem a função muscular, aceleram a doença vascular, promovem a disfunção plaquetária, desregulam o sistema endócrino, o sistema imunológico e vários outros (26).

1.1.2 Insuficiência renal e doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são as causas mais comuns de mortalidade em pacientes com IRC (27). Uma meta-análise realizada por pesquisadores nos EUA, com mais de 1 milhão de participantes em 2010, mostrou que pacientes a partir do estágio 3 da DRC (TFG < 60 mL/min) estão associados a este fato (28).

Nesse contexto, a aterosclerose e a hipertensão estão envolvidas na maioria das DCV (29). O processo acelerado de aterogênese pode ser desencadeado pelo acúmulo de toxinas urêmicas na IRC (30). Estudos demonstraram que a uremia pode provocar diversas alterações endócrinas, como alteração nos mecanismos de *feedback*, produção, transporte, metabolismo e eliminação de hormônios. Essas alterações podem estar associadas a uma disfunção endotelial, aumentando o risco cardiovascular (31).

Avramovski *et al.* avaliaram a progressão da rigidez da artéria carótida e femoral de 80 pacientes em hemodiálise, os quais apresentaram redução da elasticidade, que é considerada um componente importante de risco cardiovascular (32).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica nas paredes das artérias que envolve o sistema imune inato e o adaptativo. A placa aterosclerótica é formada pela ativação e acúmulo de células do sistema imune. Os neutrófilos, que representam 50 a 60% das células do sistema imune inato, têm um papel fundamental na formação da placa (33, 34).

Além dos fatores de riscos tradicionais, pesquisas vêm dando importância aos fatores de risco não-tradicionais para eventos cardiovasculares nos pacientes com IRC, incluindo desnutrição, estresse oxidativo e a inflamação (9, 35-37).

1.1.3 Insuficiência renal, NO e alterações do sistema imune e plaquetário

A infecção, desencadeada por repetidos eventos inflamatórios, é uma importante causa de mortalidade em pacientes com IRC. Estudos epidemiológicos

indicam que as causas infecciosas são secundárias à DCV e causam a morte de 12-22% dos pacientes (38).

A inflamação e a deficiência imune ocorrem devido a ativação e disfunção do sistema imune inato, o qual é composto pelos monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos entre outras. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos e apresenta um papel essencial na inflamação (39).

Em estudos prévios, os pacientes com IRC em hemodiálise apresentaram uma expressão aumentada de receptores celulares, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da degranulação das células fagocíticas. Estas disfunções contribuem para a diminuição da capacidade fagocítica da célula e um aumento da apoptose de neutrófilos. Além disso, as pesquisas mostram que a hemodiálise pode intensificar essas disfunções em caso de bioincompatibilidade da membrana do dialisador, anemia e sobrecarga de ferro (40-43).

O papel do óxido nítrico (NO) associado a respostas inflamatórias é bem conhecido. Um estudo demonstrou que em concentrações elevadas de GMPc, um mensageiro secundário do NO, houve o aumento da produção de TNF- α em neutrófilos (44, 45). No entanto, Meennakshi *et al.* observaram um aumento de NO no soro de pacientes em hemodiálise, que foi atribuído a uma possível estimulação da via L-arginina-NO e a uma ativação do sistema imune pelas membranas de diálise, as quais induziriam a iNOS para gerar NO (46).

Uma outra alteração envolvendo a produção aumentada de NO na IRC são os eventos trombóticos frequentes, associados paradoxalmente ao tempo de sangramento prolongado (47). Previamente, nosso grupo demonstrou que plaquetas humanas de pacientes renais em hemodiálise desnutridos apresentaram uma inibição do transporte de L-arginina para o interior da célula via sistema γ^+L , e sintetizam mais NO e um aumento de agregação plaquetária comparado aos controles (35).

Portanto, estudos têm considerado importante avaliar a interação entre plaquetas e neutrófilos, mostrando serem essenciais nos processos patológicos como a inflamação e a aterogênese (48, 49). Nesse contexto, sabe-se que os neutrófilos também estão relacionados à homeostase e que o NO sintetizado e liberado por estas células atuam nos eventos trombóticos inibindo a agregação plaquetária (10, 50-52).

Até o presente momento, a via L-arginina – óxido nítrico em neutrófilos de pacientes com IRC em hemodiálise não foi investigada, podendo esclarecer questões sobre a IRC associada aos fatores de riscos tradicionais e os não-tradicionais.

1.2 A via L-arginina-NO-GMPc

1.2.1 Histórico, síntese do NO e principais funções

O final da década de 80 e início da década de 90 ficou marcado pela descoberta de uma molécula conhecida hoje como óxido nítrico (NO). O interesse destes estudos teve início quando Furchgott e Zawadzki observaram que alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, dependiam inteiramente do endotélio intacto para que houvesse o relaxamento vascular. A partir daí surgiu o termo fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF), que foi estudado por alguns anos até provarem que a composição e ações do EDRF eram idênticas ao NO (53-55).

O NO é um gás encontrado no ar atmosférico, em pequenas quantidades, e altamente tóxico devido a presença de um radical livre que o torna uma molécula muito reativa. A meia-vida do NO é muito curta, aproximadamente 10 seg, devido à sua rápida oxidação em nitrito e nitrato (56).

Fisiologicamente, o NO é produzido por várias células, como, por exemplo, as plaquetas, eritrócitos, células endoteliais e leucócitos. A sua síntese ocorre através de hemoproteínas da família do citocromo P-450 *like*, denominadas NO sintase (NOS). Existem três tipos de enzimas: isoforma I ou nNOS, isoforma II ou iNOS e isoforma III ou eNOS. Dentre as três isoformas, nNOS e eNOS são constitutivas, dependentes de cálcio (Ca^{2+}) e calmodulina, uma proteína associada ao cálcio (57). Por outro lado, a iNOS é uma enzima induzível, independente de Ca^{2+} e calmodulina, ou seja, ela é induzida nos macrófagos, neutrófilo e outras células por lipolissacarídeos bacterianos (LPS) ou citocinas (Tabela 1). As NOS são dependentes de O_2 , NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade (58-60).

Tabela 1 - Principais características das três isoformas da NOS

Características	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 MLV
Níveis de produção	pmol	nmol	pmol
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

MLV= músculo liso vascular

Legenda: Adaptado de Lincoln et al., 1997.

As funções do NO são variadas, abrangendo diversas vias de modulação. Um aspecto importante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica em concentrações elevadas. O NO desempenha ações antibactericidas, apresenta função vasodilatadora e atua na inibição da agregação plaquetária (61, 62).

As plaquetas expressam dois tipos diferentes dessa enzima, uma constitutiva e outra induzível, eNOS e iNOS, respectivamente (63). Os neutrófilos expressam os três tipos desta enzima, porém a mais estudada é a iNOS, que aumenta

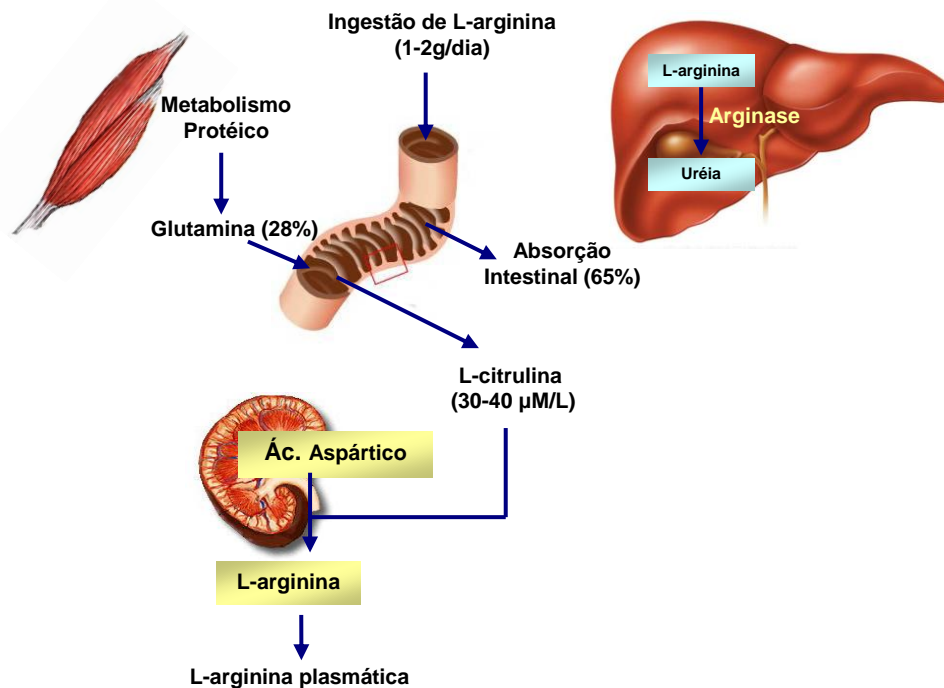
consistentemente a sua quantidade com a maturação da célula (64).

1.2.2 L-arginina: síntese, metabolismo e transportadores

A L-arginina é um aminoácido semiessencial aos mamíferos adultos, uma vez que eles são capazes de sintetizá-la, mas que torna-se essencial em fase de crescimento e em condições catabólicas. É um produto da detoxificação da amônia, participa do ciclo da ureia, é precursora de proteínas e está envolvida na formação de várias enzimas. Uma das principais funções, a qual iremos nos aprofundar neste estudo, é ser substrato para a produção de NO (65).

As fontes de L-arginina utilizadas pelo organismo são tanto exógenas como endógenas. As fontes exógenas advêm de dietas como: soja, amêndoa, noz brasileira, castanha, pitu, carne e linguado (66). A maior parte da síntese endógena ocorre nos rins e no fígado. Deste modo, o fígado utiliza grande parte da L-arginina produzida por ele no ciclo da ureia, e o rim, junto com a ingestão diária (1-2 g/dia), é responsável por manter os níveis plasmáticos de L-arginina (80-100 μM) (67) (Figura 1).

Figura 1 - A síntese da L-arginina em seres humanos



Legenda: Adaptado de Reyes *et al.* 1994

A L-arginina extracelular parece ser essencial para a produção de NO. Vários estudos demonstraram que o transporte de L-arginina é limitante para a geração de NO por células endoteliais, plaquetas e macrófagos ativados, embora a concentração intracelular (0,1-2 mM) permaneça superior às constantes de afinidade (K_m) para as diferentes isoformas de NOS que variam entre 1 e 32 μ M (68-71).

Além disso, existem evidências de que mesmo com uma concentração intracelular de L-arginina cem vezes maior a produção de NO não se alterou. A este fato deu-se o nome de “paradoxo da via L-arginina-NO” (72, 73).

Teorias foram propostas para tentar explicar este paradoxo. Uma explicação seria de que o transportador e a enzima NOS estariam ligados, portanto a produção de NO não dependeria da concentração intracelular de L-arginina, mas sim do transporte da mesma.

Em alguns tipos de células existe a colocalização da eNOS e do transportador de L-arginina y^+ em porções específicas da membrana denominadas cavéolos, mas esta teoria foi comprovada somente em células endoteliais (74, 75). Outra teoria, propôs que as células endoteliais e macrófagos possuiriam dois reservatórios intracelulares de L-arginina, sendo que um deles poderia fazer trocas com o meio extracelular e o outro não. Portanto, o transporte de L-arginina seria importante porque este segundo reservatório seria inacessível à NOS em macrófago (76, 77).

Um fator importante à considerar é a participação da L-arginina em diferentes vias metabólicas como na síntese de creatinina, ureia, agmatina, poliaminas e bases pirimidinas, além de modular a liberação de alguns hormônios (catecolaminas, glucagon, insulina, corticosteróide, hormônio do crescimento, prolactina e somatostatina). Pois, a disponibilidade de L-arginina varia de acordo com a quantidade que é utilizada nestas diferentes vias (78).

Apesar de várias hipóteses para explicar o “paradoxo da L-arginina”, não se chegou a um consenso, mas sabe-se que os carreadores de aminoácidos catiônicos são essenciais na produção de NO em diferentes células e condições patológicas (79).

Existem descritos na literatura, quatro sistemas responsáveis pelo transporte de aminoácidos catiônicos (L-arginina, L-lisina e L-ornitina) em mamíferos: y^+ , y^+L ,

$b^{0,+}$ e $B^{0,+}$ (80, 81).

O sistema y^+ foi descrito por Halvor Christensen, sendo caracterizado como Na^+ e pH independente, e seletivos para aminoácidos catiônicos. O sistema de transporte y^+ é sensível a *trans*-estimulação, e a hiperpolarização ativa o transporte de aminoácido catiônicos (82, 83).

Os sistemas y^+L , $b^{0,+}$ e $B^{0,+}$, transportam tanto aminoácidos catiônicos quanto neutros, mas diferem na dependência ou não de Na^+ (84). Os sistemas de transporte $B^{0,+}$ e $b^{0,+}$ foram elucidados por Van Winlke e colaboradores. O sistema $B^{0,+}$ Na^+ -dependente e $b^{0,+}$ Na^+ -independente (85). O sistema y^+L foi descrito inicialmente em eritrócitos humanos por Rose Devés e colaboradores, o qual transporta aminoácidos catiônicos na ausência de Na^+ e aminoácido neutros somente na presença de Na^+ (86). Foi demonstrado que a atividade do transportador y^+L ocorre em resposta a expressão de dois transportadores heterodiméricos: glicoproteína 4F2 (cadeia pesada) associada a um carreador de aminoácidos (cadeia leve), y^+LAT1 ou y^+LAT2 (87, 88).

O transporte de L-arginina em leucócitos e hemácias é mediado pelos sistemas y^+ e y^+L , enquanto nas plaquetas ocorre somente pelo sistema y^+L . O nosso grupo demonstrou, através de estudos cinéticos, que o sistema y^+L apresenta alta afinidade e baixa capacidade (K_m 10 μ M) para aminoácidos catiônicos, que também transporta aminoácidos neutros com elevada afinidade na presença de Na^+ (89).

1.2.3 Via L-arginina-NO-GMPc em neutrófilos e plaquetas

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados derivados de megacariócitos localizados na medula óssea. Elas apresentam um papel essencial tanto na hemostasia como na trombose. São necessárias três fases distintas para que haja a formação do tampão plaquetário: adesão, ativação e agregação plaquetária. O NO secretado pelas plaquetas é um inibidor natural destas três fases (90, 91), sendo o transporte de L-arginina via sistema y^+L essencial para a produção de NO (89).

Os neutrófilos são células do sistema imune inato que circulam através do corpo e são direcionados para os locais de infecção e lesão para desempenhar papéis importantes na defesa do hospedeiro. A capacidade dos neutrófilos de sintetizar NO foi descoberta pela primeira vez através da sua capacidade de relaxar anéis aórticos (92) e pela inibição da agregação plaquetária (50, 93). Estudos demonstraram que os neutrófilos geram NO a uma taxa de 10-100 nmols/5min/10⁶ células, uma quantidade comparável a células do endotélio, contribuindo para a quantidade de NO circulante (64).

Malawista *et al.* relataram pela primeira que o NO gerado pelos neutrófilos estava envolvido na sua função antimicrobiana (94). Ao longo dos anos, foram identificadas várias outras funções como a modulação de cascatas de sinalizações, adesão, quimiotaxia, fagocitose, “burst” oxidativo, e apoptose (95).

1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o termo utilizado para definir o desequilíbrio entre a geração exacerbada de espécies oxidantes e o mecanismo insuficiente de defesa antioxidantes (96). As células produzem espécies reativas de oxigênio por diferentes mecanismos, como pela cadeia respiratória mitocondrial ou pela ativação de neutrófilos, ao sofrerem estímulos de citocinas inflamatórias (97).

Uma das vias bastante estudada da síntese EROs é complexo enzimático NADPH oxidase, que é responsável pela formação de ânion superóxido (O_2^-) a partir do oxigênio consumido durante a *burst* oxidativo. Este complexo enzimático é composto por várias proteínas, como gp91phox e p22phox na membrana, e p47phox, p67phox, p40phox, Rac1 no citoplasma (98).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado pela dismutação do O_2^- que ocorre espontaneamente ou pela estimulação da enzima superóxido dismutase (SOD). Tanto o O_2^- quanto H_2O_2 contribuem para a formação de outras espécies reativas. Por exemplo, a espécie reativa de nitrogênio (ERN) é formada pela reação do NO com O_2^- formando o peroxinitrito ($ONOO^-$). O radical (OH^\cdot), o mais reativo em sistemas biológicos, é formado pela reação do H_2O_2 com moléculas de metais como cobre e zinco (Figura 2) (99).

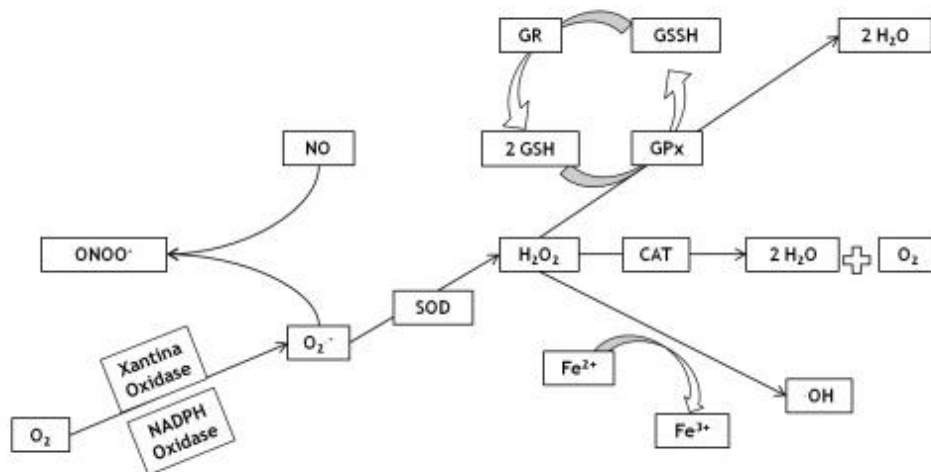
Uma outra fonte de ERN ocorre a partir das enzimas NOS, as quais são essenciais na conversão da L-arginina em NO. Quando a concentração de BH₄ (cofator) ou de L-arginina (substrato) está reduzida, a NOS produz O₂⁻, além de produzir NO (100).

Neste contexto, é importante considerar que a biodisponibilidade de NO não depende somente da sua síntese como também da degradação, mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o ânion superóxido (O₂⁻) (15).

Com a finalidade de equilibrar a quantidade de espécies reativas no organismo existem as defesas antioxidantes enzimáticas, compostas pela superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase, e as não-enzimática pelas vitaminas A, C e E, e pela glutatona (101, 102).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está relacionado a doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas, entre outras. Por isso, a importância de análises oxidativas nos pacientes com insuficiência renal crônica (103).

Figura 2 - Espécies reativas e oxigênio e sistema de defesa antioxidante enzimático



Legenda: CAT, catalase; GPx glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase; GSH, glutatona; GSSH, Glutatona oxidada. NO, óxido nítrico; ONOO⁻, peróxinitrito; SOD, superóxido dismutase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a via L-arginina-NO em neutrófilos e sua associação com os marcadores de estresse oxidativo e seus efeitos na agregação plaquetária em pacientes com IRC em hemodiálise.

2.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar e comparar o transporte da L-arginina total, via sistemas γ^+ e sistema γ^+L em neutrófilos de controles e pacientes com IRC em hemodiálise.
- b. Analisar a atividade da NOS e a expressão da eNOS e iNOS em neutrófilos de controles e pacientes com IRC em hemodiálise.
- c. Avaliar o efeito da incubação dos neutrófilos com plaquetas, em tempos diferentes, na agregação plaquetária induzida por ADP de controles e pacientes com IRC em hemodiálise.
- d. Quantificar e comparar as concentrações de aminoácidos em lisado de neutrófilos de controles e pacientes com IRC em hemodiálise.
- e. Analisar a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase em soro de controles e pacientes com IRC em hemodiálise.
- f. Avaliar a presença do dano oxidativo, através da carbonilação de proteínas e dos níveis de peroxidação lipídica através do TBARS em soro de controles e pacientes com IRC em hemodiálise.
- g. Avaliar o “burst” oxidativo em neutrófilos estimulados com PMA de controles e pacientes com IRC em hemodiálise.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de indivíduos

O grupo IRC foi constituído por 15 pacientes com IRC em hemodiálise há pelo menos seis meses provenientes da clínica de hemodiálise DERT Depuração Extra Renal e Transplante (Niterói, Rio de Janeiro, Brasil). Foram considerados critérios de exclusão a presença de cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, transfusão de sangue recente, obesidade, desnutrição, diabetes mellitus, infecção e uso de medicamentos antiplaquetários.

O grupo controle foi composto por 15 indivíduos saudáveis, pareados por idade, recrutados entre alunos e funcionários da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os participantes foram submetidos a uma avaliação clínica e laboratorial, e foram excluídos do grupo controle aqueles que apresentassem qualquer doença e/ou faziam uso de fármacos.

As características demográficas e laboratoriais de ambos os grupos estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (processo 451-CEP/HUPE). A participação no estudo foi voluntária e somente se deu após esclarecimento de todos os aspectos associados ao estudo aos sujeitos e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Isolamento de neutrófilos

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas após a sessão de hemodiálise e transferidas para tubos contendo o anticoagulante heparina. Os neutrófilos foram isolados por um gradiente de densidade composto por uma camada de Histopaque 1119 (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) e Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). O sangue foi colocado em

cima das duas camadas de histopaque e centrifugados a 700x g por 30 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, os neutrófilos foram coletados, lavados com PBS e centrifugados a 600x g por 10 min a 4°C. Ao pellet foi adicionado água gelada para lisar os eritrócitos e a suspensão foi centrifugada novamente a 600x g por 10 min a 4°C. Ao final, o pellet de neutrófilos foi ressuspensão em PBS e a contagem e viabilidade das células foram analisadas com o corante líquido de Lázarus na câmara de Neubauer.

3.3 Isolamento de plaquetas

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio (3,8% , 9:1 v/v) e centrifugadas a 250x g por 15 min para obter o plasma rico em plaquetas (PRP), após retirar o plasma rico o mesmo sangue foi centrifugado novamente a 900x g por 10 minutos a temperatura ambiente para obter o plasma pobre em plaquetas (PPP). A contagem do PRP foi feita no contador de células ABX Pentra 60 (Horiba, Tóquio, Japão) e a concentração de plaquetas do PRP foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ cels/mL com PPP.

3.4 Avaliação laboratorial

As avaliações bioquímica e hematológica foram feitas no Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

3.5 Transporte de L-arginina em neutrófilos

O influxo de 1mM de L-[³H] arginina foi medido. O transporte total foi fracionado nas vias sistema y^+ e y^+L através da inibição do y^+L com 100 μ M de L-leucina. O influxo foi medido a 37°C (durante um período de 3 minutos) pela adição de 200 μ L de suspensão de células em 700 μ L de tampão PBS contendo L-arginina fria e radioativa.

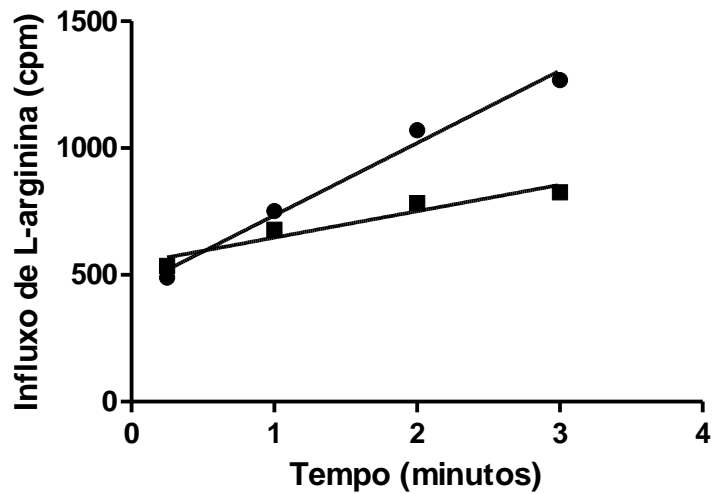
Posteriormente, alíquotas de 200 μ L foram retiradas em 15s, 1, 2 e 3 minutos, e colocadas em microtubos contendo 50 μ L de óleo (3 vol dibutil phatalate: 2 dinonyl phatalate) e centrifugados por 15s a 10000x g (microcentrífuga Eppendorf 5417 C/R). Este processo separa as células do sobrenadante. Técnica adaptada do linfócito realizada pelo nosso grupo (16).

Os padrões foram preparados através de uma alíquota de 20 μ L do sobrenadante. O sobrenadante e o óleo foram aspirados do tubo e o mesmo foi mantido no freezer. O tubo contendo o pellet de células foi cortado em tubos contendo 2mL de líquido de cintilação. A medida da radioatividade foi feita, após 24h, através do cintilador (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

3.5.1 Cálculo do influxo

O influxo de L-arginina foi medido ao longo de três minutos usando uma regressão linear. A taxa inicial de transporte foi calculada usando uma inclinação linear.

Gráfico 1 -Cinética temporal do influxo de L-arginina (1mM) nos neutrófilos



Legenda: influxo total (●) foi inibido por 100 mM de L-leucina (■). Dados apresentados são uma representação de um experimento.

A taxa inicial do transporte foi calculada e expressa em picomol/ 10^6 cels/ minutos. A equação para o cálculo do influxo é:

$$\text{Taxa inicial} = \frac{\text{inclinação da linha} \times [\text{AA}] \times V_{\text{padrão}}}{\text{Radioatividade}_{\text{padrão}} \times n}$$

Sendo:

[AA] concentração do aminoácido presente no padrão

$V_{\text{padrão}}$ = volume do padrão

n= número de células presente no pellet da amostra

3.6 Avaliação da atividade da NOS

A atividade de NOS foi avaliada pela conversão de L-[³H]-arginina em L-[³H]-citrulina (104).

À suspensão de neutrófilos foi adicionada L-[³H]-arginina na presença e na ausência de um análogo, L-NMMA (10mM), posteriormente foi realizada a incubação por 120 minutos a 37°C. A reação foi interrompida por rápida centrifugação seguida por lavagem com solução de PBS. Os neutrófilos foram lisados com Triton e transferidos para uma coluna contendo a resina catiônica Dowex, que retém a L-[³H]-arginina não metabolizada e permite a passagem da L-[³H]-citrulina.

A L-[³H]-citrulina foi então removida para tubos de cintilação, o líquido cintilante adicionado e a radioatividade contada no cintilador (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

3.7 Neutrófilos e agregação plaquetária

O efeito dos neutrófilos na agregação plaquetária foi analisado através da incubação do PRP ($1,25 \times 10^6$ cels/mL) com os neutrófilos autólogos (2×10^6 cels/mL) por 5 e 30 minutos, e em seguida a agregação foi monitorada por 5 minutos com ADP (5 μ M). A agregação basal foi analisada pela incubação do PRP com o tampão PBS, o qual os neutrófilos foram ressuspensos. A agregação foi monitorada num agregômetro de 4 canais (Chrono-Log, Havertown, PA) (105). Os testes foram realizados a 37°C numa velocidade de rotação de 900 rpm.

3.8 Dosagem de aminoácidos

Os neutrófilos foram separados e contados em câmara de Neubauer. Foram separadas alíquotas de suspensão de neutrófilos em concentrações de, aproximadamente, 9×10^6 cels/ml.

Posteriormente, a alíquota foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet de neutrófilos foi adicionado 1mL da solução de Triton 10% para lisar as células. As alíquotas de célula lisada foram armazenadas e enviadas ao laboratório de análise DLE (Rio de Janeiro, Brasil). A dosagem quantitativa e qualitativas dos aminoácidos foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

3.9 Dosagem de proteína

A mensuração das proteínas foi feita através de um ensaio colorimétrico, utilizando-se o kit BCA™ Protein Assay (BioAgency, São Paulo, Brazil).

3.10 Extração de proteína e western blotting

Os neutrófilos foram isolados e lisados com uma tampão de lise. A quantificação de proteína foi feita pelo método previamente descrito. As amostras contendo 20µg de proteína dos lisados de neutrófilos foram suspensas em tampão NuPage, após desnaturação das proteínas por incubação a 70°C por 10 minutos (Sigma Chemical, St. Lois).

As proteínas foram fracionadas por eletroforese (200V, 100mA) em gel poliacrilamida NuPAGE® Novex Bis-Tris 10% (Invitrogen, Califórnia, EUA) utilizando-se tampão de corrida [concentrado 5 x (250 mM MOPS, 250 mM Tris, 5 mM EDTA, 17,3mM SDS), e transferidas (15V, 328mA) para

membranas de PVDF (Invitrogen, Califórnia, EUA) em tampão de transferência (48mM Tris, 39 mM Glicina, 1,3mM SDS).

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais para eNOS e iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) na concentração de 1:1000. A tubulina foi utilizada como controle de quantidade de proteína nas amostras na concentração de 1:1000.

O procedimento empregado para a detecção de bandas foi a incubação com ECL (Amersham-Biosciences Buckinghamshire, UK). Foram utilizados como padrão de peso molecular o Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (GE Helathcare, EUA).

As intensidades das bandas foram normalizadas para a intensidade da banda de tubulina correspondente por análise densitométrica. A quantificação de imagens foi realizada com o programa image J (ImageJ 1.43, National Institutes of Health, EUA).

3.11 Avaliação do estresse oxidativo em soro

3.11.1 Atividade da catalase

O ensaio é baseado na capacidade que a catalase apresenta de reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formar oxigênio molecular e água.

Foi preparado um tampão de peróxido de hidrogênio (25mL de PBS para 40 μ L de H_2O_2). Na cubeta de quartzo foram adicionados 1980 μ L do tampão com peróxido de hidrogênio, e em seguida 20 μ L de soro.

A leitura foi realizada no período de 1 minuto a cada 10 segundos numa absorbância de 240nm no espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis Thermo Scientific). Os valores foram analisados em uma planilha do Excel e os resultados foram apresentados em U de catalase/mg de proteína.

3.11.2 Atividade da glutathiona peroxidase

A medida da glutathiona peroxidase (GPx) é medida a partir da taxa de decaimento da NADPH.

A reação foi feita em cubetas de plástico. Na cubeta foram adicionados 1800 μ L de tampão fosfato adicionado de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona redutase (GR) e azida sódica (20mL tampão para 4mL de GR + 1mL de NADPH) e a leitura realizada por 3 minutos.

Em seguida, foram adicionados 200 μ L de peróxido de hidrogênio e lido por 5 minutos. A leitura foi feita em comprimento de onda de 340nm no espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis Thermo Scientific).

3.11.3 Carbonilação de proteínas

Este ensaio foi utilizado para avaliar a degradação de proteínas no soro, e baseia-se no princípio de que os resíduos de proteínas (histidina, arginina, lisina e prolina) são oxidados por radicais livres e formam produtos com o grupo carbonil, que pode ser detectado através da reação com 2,4 dinitrophenylhidrazina (DNPH).

Foram utilizados 100 μ L de soro em duplicata. As alíquotas foram lavadas três vezes com solução de HCl-Acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e Etanol-Acetato de Etila, respectivamente. Entre cada lavagem as amostras foram passadas no vortex e centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi descartado.

Uma das duplicatas foi incubada com HCl 2M e a outra com DNPH diluído em HCl 2M, ambas por 1 hora. Posteriormente, todas as amostras foram incubadas à -20°C por 10 minutos, centrifugadas e o sobrenadante descartado. No final, as amostras foram incubadas com guanidina 6M à 60°C por 30 minutos.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e 200 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca e foi feita a leitura da absorbância a 380nm no espectrofotômetro (Fluoestar Omega BMG labtech).

Os valores encontrados nas duplicatas que foram incubadas com DNPH foram descontados do encontrado nas amostras incubadas com HCl. Os resultados obtidos foram apresentados em nmol/mg de proteína.

3.11.4 Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi mensurada no soro dos controles e pacientes através da formação de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Alíquotas de 200 μ L de soro foram misturadas com ácido tricloroacético a 10%, em seguida as amostras foram centrifugadas e incubadas com ácido tiobarbitúrico 0,67% por 30 minutos a 96°C. As amostras foram colocadas em microplacas e foi feita a leitura de absorbância em 532nm no espectrofotômetro (Fluoestar Omega BMG labtech) expressas como equivalentes de malondialdeído (pmol/mg de proteína).

3.12 **Análise do *burst* oxidativo em neutrófilos**

Esse experimento baseia-se na quantificação da geração de ânion superóxido no “*burst*” oxidativo dos neutrófilos, que utiliza como sonda específica a lucigenina (Nitrato bis-N-metil acridina). A reação acontece quando a lucigenina reage com o ânion superóxido e forma uma molécula excitada que emite luz ao voltar ao seu estado fundamental. O “*burst*” ocorre através do estímulo da enzima NADPH com o PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), e a enzima superóxido dismutase (SOD) tem a função de dismutar o ânion superóxido que reage com a lucigenina.

Os neutrófilos foram obtidos do sangue periférico e ajustados a uma concentração de 3×10^6 cels/mL com tampão PBS. Na microplaca foram adicionados 150 μ L da suspensão de células, 50 μ L de lucigenina (5 μ M), 50 μ L de PMA (20ng/poço) para estimular o “*burst*” oxidativo e 20 μ L de SOD (500U/mL). A reação foi monitorada no intervalo de 120min com leituras a cada 2 min. As leituras de luminescência foram feitas no luminômetro (Fluoestar Omega BMG labtech).

3.13 Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de média e erro padrão (EP). As diferenças entre os grupos foram testadas utilizando o teste t independente, com exceção dos dados de agregação e de atividade da óxido nítrico sintase. Nesses casos, os resultados foram comparados com uma análise de variâncias de duas entradas (condição clínica x meio de incubação) com medidas repetidas no segundo fator. Em caso de F significativo, foi aplicado um pós teste de Holm-Sidak para identificar as diferenças. As premissas de normalidade, homogeneidade de variâncias e esfericidade foram testadas com os testes de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly, respectivamente.

A análise dos dados e a preparação dos gráficos foram realizadas através do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., CA, EUA). A significância estatística foi determinada quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas (idade e sexo), etiológicas e dados laboratoriais e clínicos

A Tabela 2 apresenta características demográficas e etiológicas dos pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) em hemodiálise e controles.

Como podemos observar nesta tabela, os pacientes com IRC eram adultos jovens, eutróficos, e a principal causa de IRC foi a HAS. Os pacientes realizavam 4 horas de sessão de hemodiálise três vezes por semana e o Kt/V ureia demonstra a eficiência da diálise. Alguns pacientes faziam o uso de medicamentos anti-hipertensivos, como inibidores da enzima conversora de angiotensina (n=4), agonistas α -2 (n=5), β -bloqueadores (n=4) e bloqueadores dos canais de cálcio (n=1).

Tabela 2 - Características demográficas, etiológicas e nutricionais dos controles saudáveis e dos pacientes renais crônicos

Dados	Controles (n=15)	Pacientes com IRC (n=15)
Idade (anos)	36 \pm 2	42 \pm 3
Sexo (F/M)	10/5	7/8
Meses em diálise	---	107 \pm 52
Sessão de diálise, min	---	240 \pm 0
Kt/ V uréia	---	1,35 \pm 0,3
IMC (kg/m ²)	22,8 \pm 0,7	22,7 \pm 0,8
Etiologia	---	Hipertensão - 11
	---	Glomerulonefrite -2
	---	Idiopática- 2

Legenda: índice de massa corporal (IMC), medida da qualidade da diálise (Kt/V ureia)

A Tabela 3 mostra os dados laboratoriais dos pacientes com IRC em hemodiálise e controles. Como esperado, os pacientes com IRC apresentaram

uma concentração sérica de creatinina e de ureia antes de uma sessão de hemodiálise superior ao grupo controle, em valores que indicam a disfunção renal. Pacientes com IRC em hemodiálise apresentaram níveis séricos de potássio significativamente mais elevados e um maior número de leucócitos que o grupo controle. Por outro lado, apresentaram níveis mais baixos de hematócrito e hemoglobina, embora estes valores estejam dentro dos valores considerados normais. Os níveis plasmáticos de fibrinogênio não foram modificados em pacientes com IRC em hemodiálise.

Tabela 3 - Dados laboratoriais dos controles saudáveis e dos pacientes renais crônicos

Dados	Controles	Pacientes com IRC
Número de pacientes	15	15
Potássio (mEq/l)	4,3 ± 0,2	5,2 ± 0,4*
Hematócrito (%)	40 ± 1,5	36 ± 0,9*
Hemoglobina (g/dL)	14 ± 0,4	12 ± 0,3*
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	5,6 ± 0,5	7,3 ± 0,6*
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	210 ± 21	220 ± 27
Colesterol total (mg/dL)	180 ± 7,6	160 ± 13
Colesterol LDL (mg/dL)	110 ± 6,6	89 ± 9,3
Colesterol HDL (mg/dL)	55 ± 4,5	44 ± 5,6
Triglicerídeos (mg/dL)	88 ± 9,7	150 ± 28
Glicose (mg/dL)	88 ± 3,0	92 ± 8,4
Creatinina (mg/dL)	0,85 ± 0,05	4,6 ± 1,5*
Ureia (mg/dL)	20 ± 4,3	167 ± 7,9* (pré- HD) 39 ± 6,3 (pós-HD)
Fibrinogênio (mg/dL)	269 ± 26	302 ± 55

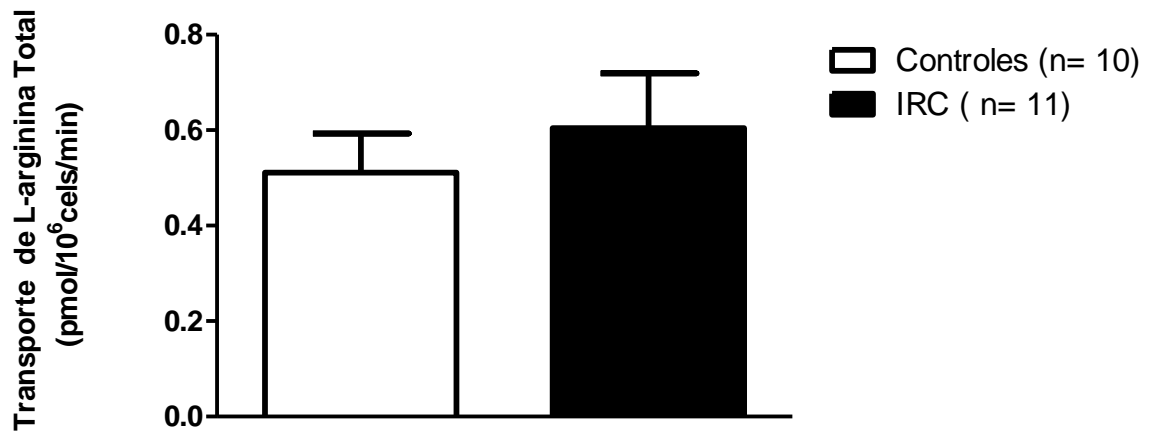
Legenda: índice de massa corporal (IMC), hemodiálise (HD), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), *p≤0,05 – vs controle/IRC

Nota: Dados representados na forma de média ± EP.

4.2 Transporte de L-arginina em neutrófilos

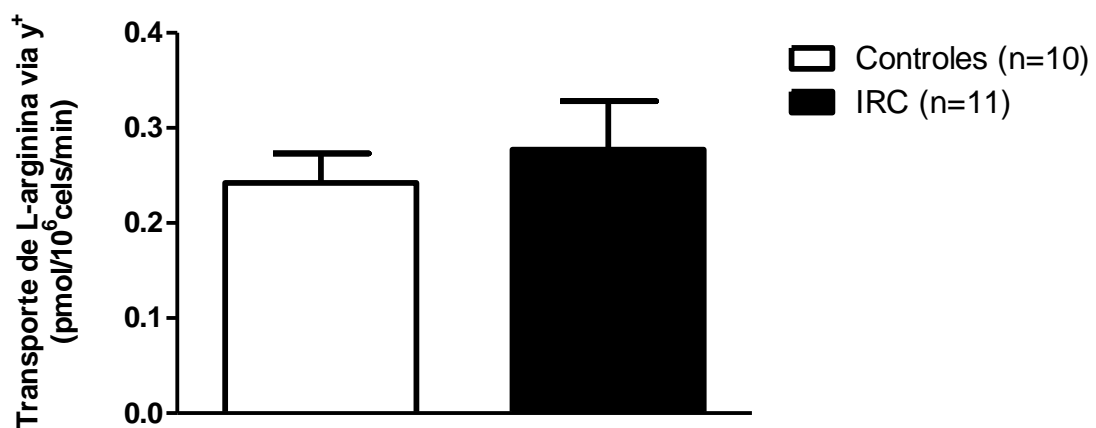
O transporte de L-arginina em neutrófilos mostra-se similar entre pacientes com IRC em hemodiálise e controles. Quando os sistemas γ^+ e γ^+L são isolados também não são observadas diferenças entre os grupos (Gráficos 2, 3 e 4).

Gráfico 2 - Influxo total de L-arginina em neutrófilos de controles e pacientes IRC em hemodiálise



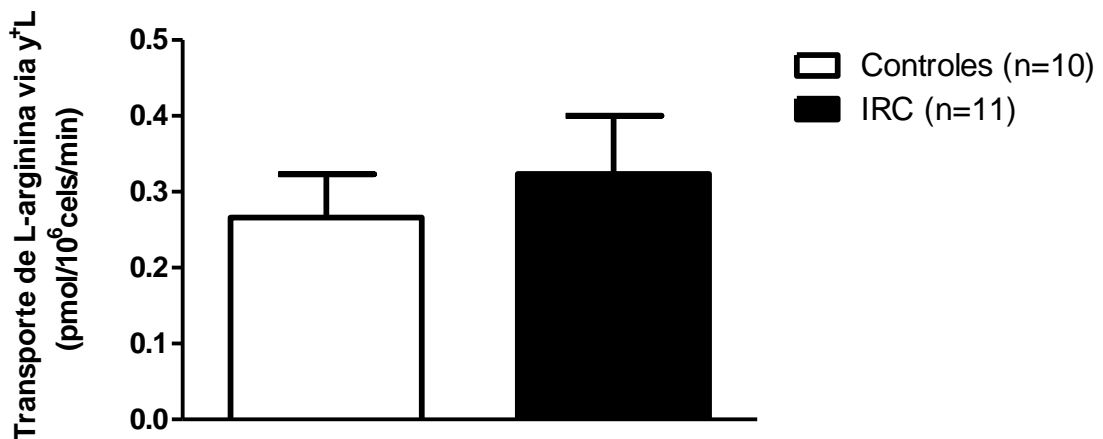
Nota: Os valores estão representados em média \pm EP.

Gráfico 3 - Influxo de L-arginina via sistema γ^+ em neutrófilos de controles e pacientes IRC em hemodiálise



Nota: Os valores estão representados em média \pm EP.

Gráfico 4 - Influxo de L-arginina via sistema γ^+L em em neutrófilos de controles e pacientes IRC em hemodiálise

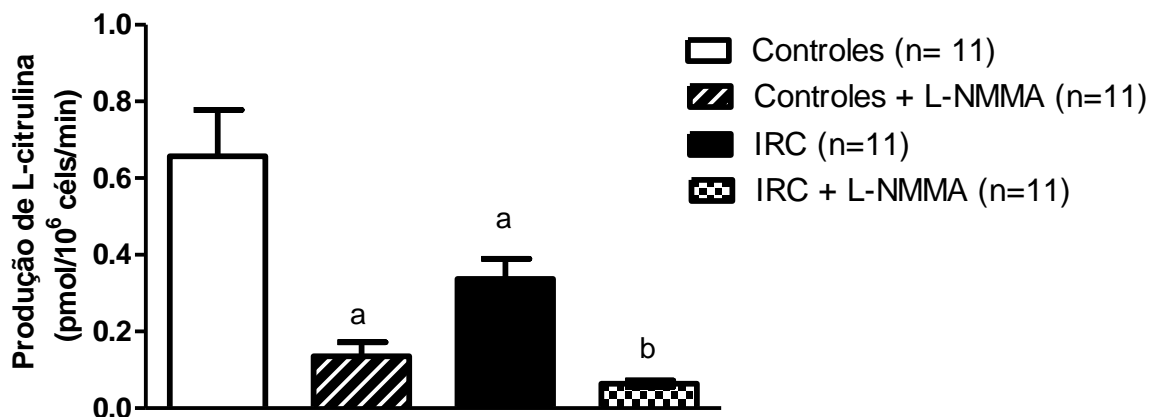


Nota: os valores estão representados em média \pm EP.

4.3 Atividade da NOS em neutrófilos

A atividade basal da NOS encontra-se significativamente reduzida em neutrófilos de pacientes com IRC em hemodiálise comparada aos controles (Gráfico 5). A presença do análogo da L-arginina, L-NMMA, mostrou-se ser um potente inibidor da atividade basal da NOS de neutrófilos tanto em controles como pacientes.

Gráfico 5 - Produção basal de L^{[3]H}-citrulina em neutrófilos de controles e pacientes IRC em hemodiálise

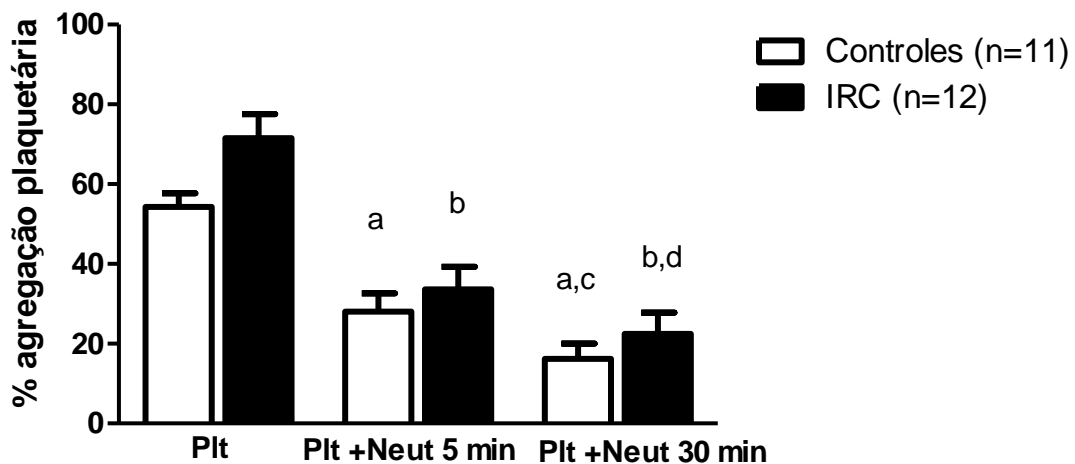


Nota: Os valores estão representados em média \pm EP. a \neq controle ($p \leq 0,05$); b \neq IRC ($p \leq 0,05$).

4.4 Efeitos dos neutrófilos na agregação plaquetária

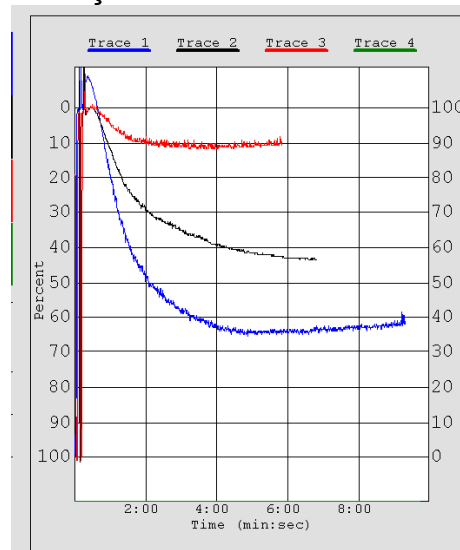
Foram observados efeito tempo-resposta na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP na presença de neutrófilos em pacientes e controles, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Agregação plaquetária induzida por ADP na presença de neutrófilos



Nota: os valores estão representados em média \pm EP. a \neq Plt Controle ($p \leq 0,05$); b \neq Plt IRC ($p \leq 0,05$); c \neq Plt +Neut 5 min Controle ($p \leq 0,05$); d \neq Plt +Neut 5 min IRC ($p \leq 0,05$).

Gráfico 7 - Ilustrativo do percentual de agregação plaquetária induzida por ADP (2,5 μ M) na presença e ausência de neutrófilos



Legenda: Agregação basal (curva azul), plaquetas incubadas com neutrófilos por 5 min (curva preta) e plaquetas incubadas com neutrófilos por 30 min (curva vermelha).

4.5 Dosagem de aminoácidos em neutrófilos

Na dosagem da L-arginina em neutrófilos foi observado um aumento de 4 vezes desse aminoácido quando comparou-se pacientes portadores de IRC em hemodiálise com controles. Os outros aminoácidos catiônicos, L-ornitina e L-lisina, apresentavam concentrações intracelulares similares em pacientes com IRC em hemodiálise e controles. Os níveis de aminoácido aniônico L-glutamato estavam aumentados em pacientes com IRC em comparação aos controles assim como o aminoácido neutro L-glicina (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil de aminoácidos nos neutrófilos

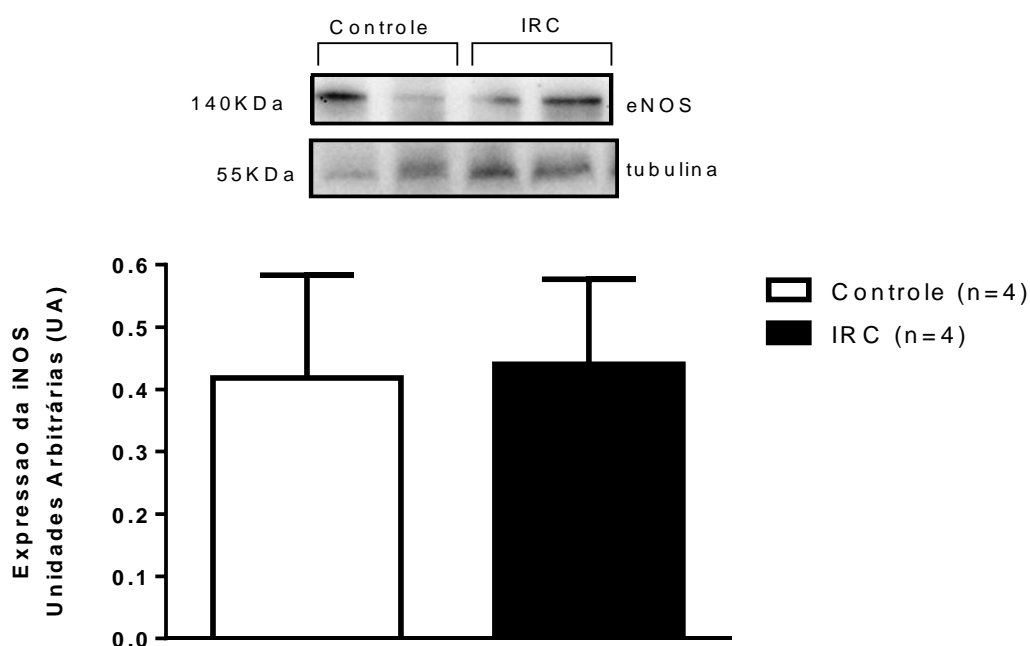
Aminoácidos ($\mu\text{mol}/10^9$ cels)	Controles (n=5)	Pacientes com IRC (n=5)
L-arginina	3,2 \pm 0,5	12,0 \pm 2,0 *
L-glicina	12,4 \pm 2,9	23,0 \pm 3,4 *
L-glutamato	3,9 \pm 1,1	7,8 \pm 1,2 *
L-leucina	10,9 \pm 2,1	16,1 \pm 1,6
L-lisina	9,2 \pm 1,4	15,6 \pm 3,7
L-metionina	3,0 \pm 0,6	4,2 \pm 0,2
L-ornitina	5,1 \pm 0,6	6,1 \pm 1,2
L-serina	6,3 \pm 1,0	11,3 \pm 1,9
L-tirosina	8,9 \pm 1,3	11,5 \pm 1,2
L-triptofano	4,4 \pm 0,7	6,0 \pm 1,4

Nota: Dados representados na forma de média \pm EP * $p \leq 0,05$ – IRC vs controle

4.6 Western Blotting em neutrófilos

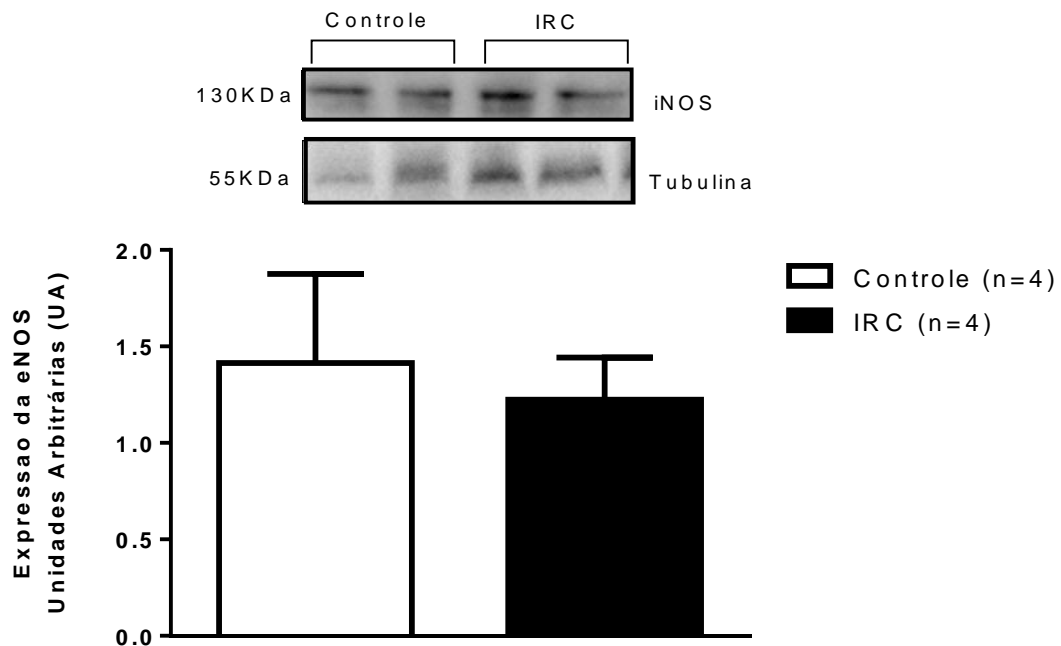
A avaliação da expressão das enzimas NOS realizada por Western Blotting mostra que os neutrófilos humanos expressam eNOS e iNOS em condições basais (Gráficos 8 e 9). Não foram observadas diferenças significativas na expressão de eNOS e iNOS em neutrófilos de pacientes com IRC comparados aos controles.

Gráfico 8 - Expressão da enzima iNOS em neutrófilos de controles e pacientes IRC em hemodiálise



Nota: Os valores estão representados em média \pm EP.

Gráfico 9 - Expressão da enzima iNOS em neutrófilos de controles e pacientes IRC em hemodiálise

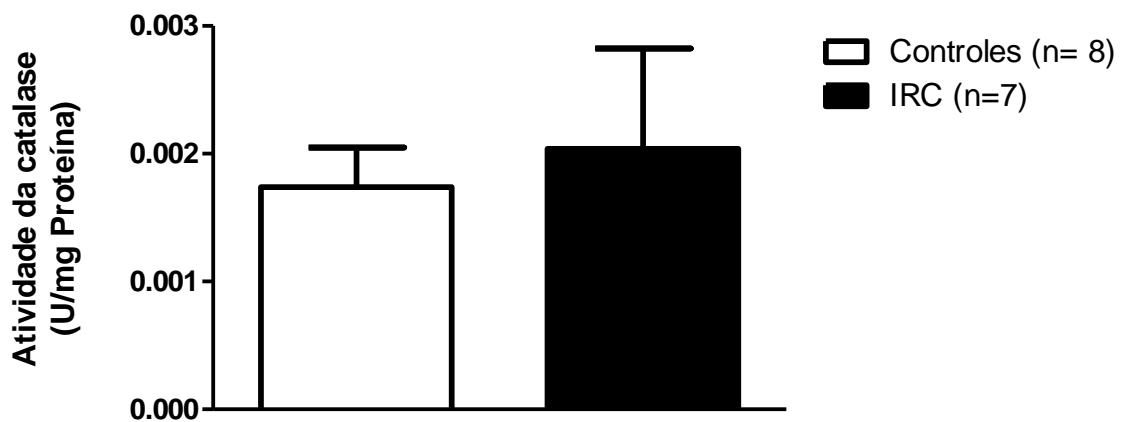


Nota: Os valores estão representados em média \pm EP.

4.7 Atividade da catalase em soro

Não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes com IRC e os controles quanto à atividade da enzima catalase no soro (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Atividade da catalase em soro de controles e pacientes IRC em hemodiálise

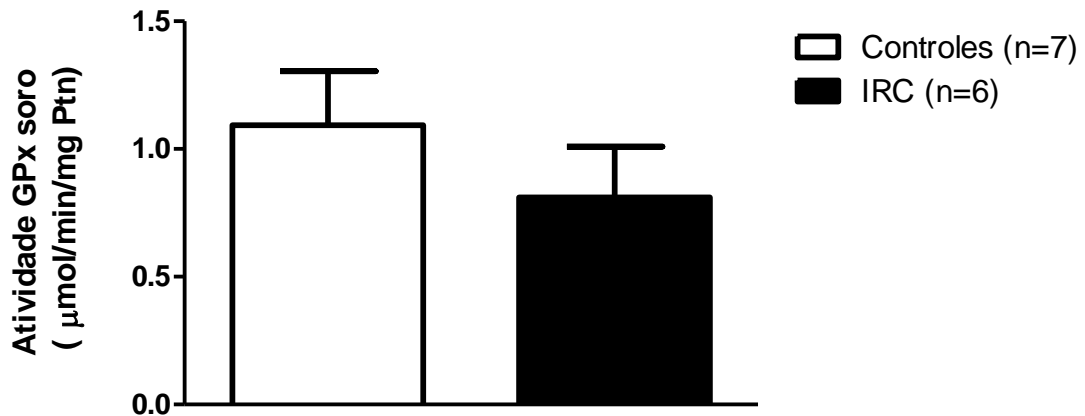


Nota: Os valores estão representados em média \pm EP.

4.8 Atividade da glutatona peroxidase em soro

A atividade da GPx, através da mensuração da inibição da auto-oxidação da adrenalina, mostrou-se inalterada no soro de pacientes com IRC (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Atividade da glutatona em soro de controles e pacientes com IRC

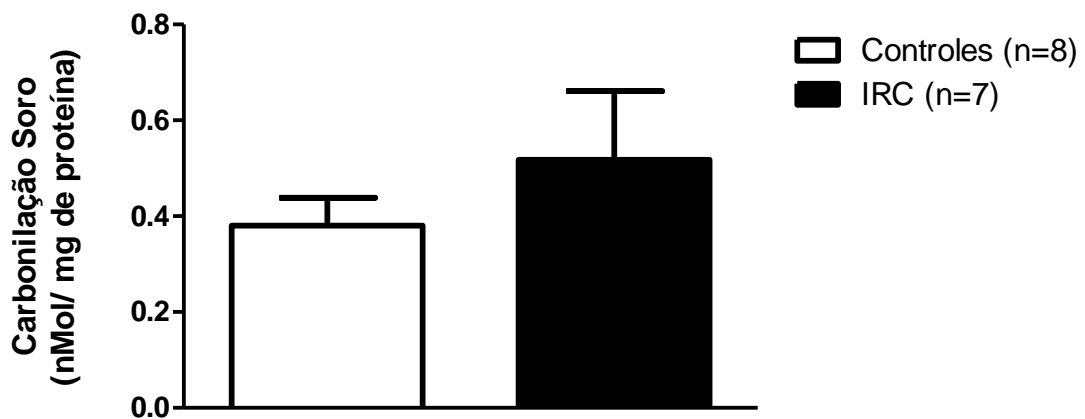


Nota: Os valores estão representados em média ± EP.

4.9 Carbonilação de proteínas em soro

Não foi observada diferença significativa na carbonilação de proteínas no soro de pacientes com IRC e de controles (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Carbonilação de proteínas em soro de controle e pacientes com IRC

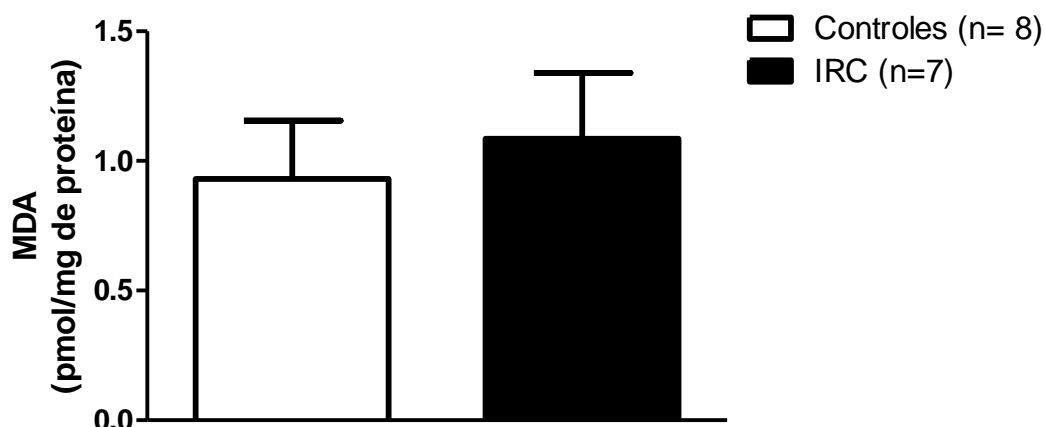


Nota: Os valores estão representados em média ± EP.

4.10 Avaliação da peroxidação lipídica em soro

O dano em lipídios de membrana determinado pela formação substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não foi afetada pela IRC (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em soro de controles e pacientes com IRC

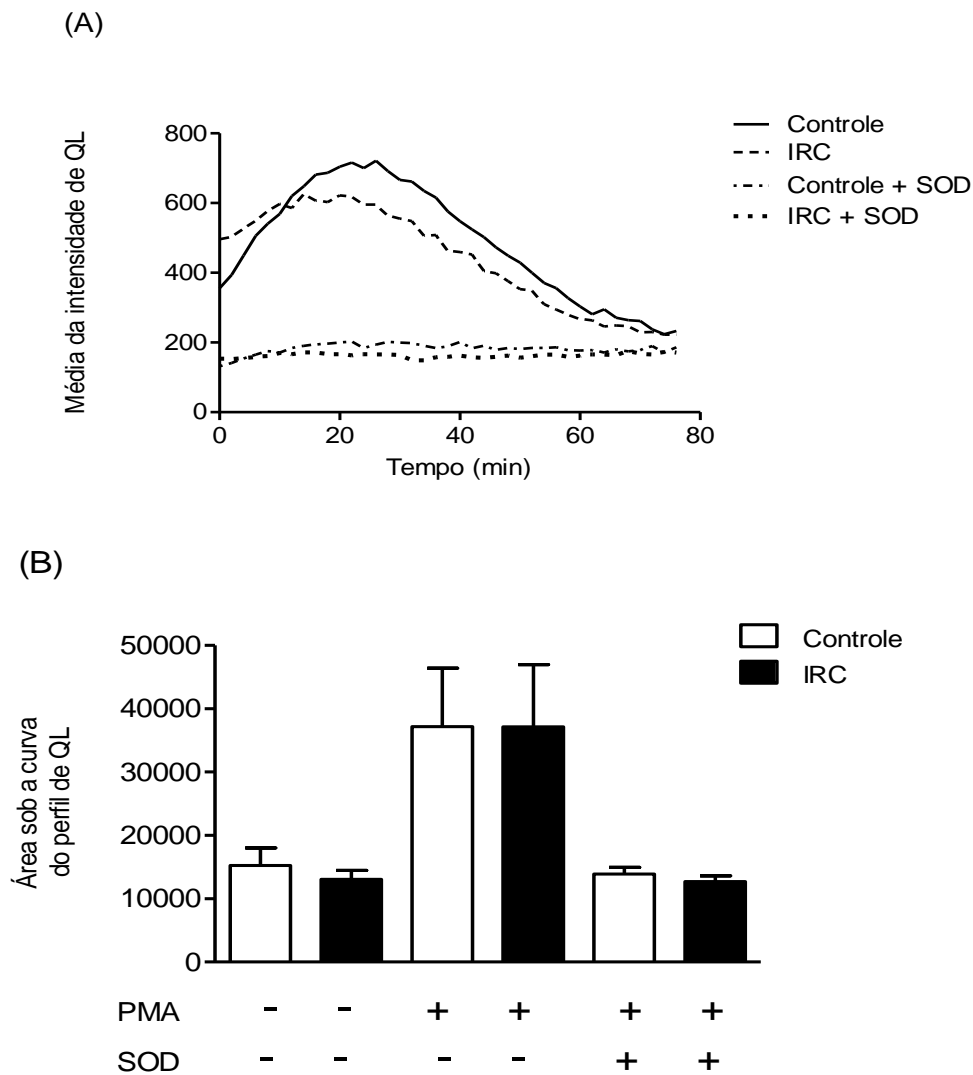


Nota: Os valores estão representados em média \pm EP.

4.11 Avaliação do *burst* oxidativo em neutrófilos

Não houve diferença significativa na resposta dos neutrófilos de pacientes IRC em hemodiálise comparado ao controle quando estimulados com PMA. O mesmo foi verificado quando os neutrófilos foram estimulados na presença de SOD (Gráfico 14 A,B).

Gráfico 14 - Medida do *burst* oxidativo por quimioluminescência (QL) dependente da lucigenina



Legenda: O experimento foi realizado com pelo menos 4 amostras de cada grupo. (A) Média da intensidade de QL em pacientes com IRC em hemodiálise e controles estimulados na presença e ausência de SOD (as barras de erro foram suprimidas para melhor visualização). (B) Área sob a curva do perfil de QL sem e com estimulação com PMA, e na presença e ausência de superóxido dismutase (SOD).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou, pela primeira vez, a via L-arginina-NO em neutrófilos de pacientes com IRC em hemodiálise, visando contribuir para uma melhor compreensão da relação desta síndrome e DCV (106, 107). Tem sido dado destaque para a a geração de NO por leucócitos, bem como seus efeitos sobre outras células e na formação do trombo (108, 109). Os resultados obtidos nesta dissertação apontam uma menor produção de NO nos neutrófilos obtidos de pacientes com IRC em hemodiálise comparados com controles associada a uma expressão normal de eNOS e iNOS nestas células.

Uma vez que o transporte de L-arginina do meio extra para o meio intracelular é importante para a síntese de NO, no presente estudo a investigação da via-L-arginina-NO em neutrófilos foi iniciada através da mensuração do influxo da L-arginina. Os resultados desses experimentos mostraram que o transporte total de L-arginina foi semelhante entre os indivíduos sem e com IRC. Além disso, quando o influxo de L-arginina foi fracionado nos sistemas de transporte catiônicos γ^+ e γ^+L também não foi observada alteração nestes sistemas em neutrófilos. Por outro lado, estudos prévios realizados pelo nosso grupo evidenciaram uma ativação do sistema γ^+ , mas não do sistema γ^+L , em eritrócitos e linfócitos de pacientes com IRC em HD e diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD) (18, 110). Já Schwartz *et al* evidenciaram que o transporte de L-arginina via sistema γ^+ em aorta de ratos urêmicos estava reduzido devido a uma redução da expressão da proteína CAT-1 (111). Estudos de biologia molecular identificaram uma família de proteínas em ratos, codificadas por mCAT incluindo quatro proteínas homólogas que induzem a atividade do sistema γ^+ . As proteínas clonadas são: mCAT-1 (alta afinidade, expressa em muitos tecidos e células, exceto fígado); mCAT-2A (variante do mCAT-1 de baixa afinidade, expressa predominantemente no fígado), mCAT 2B (isoforma induzível do mCAT-1, de alta afinidade, induzida em células T, macrófagos, pulmão e testículos) e mCAT-3 (expressa no tecido nervoso) (84, 112-114). Em humanos, transportadores de aminoácidos catiônicos homólogos aos de ratos foram clonados e as proteínas codificadas como hCAT (115, 116). Os achados contrastantes podem

ser em decorrência a expressão de diferentes proteínas com propriedades de transporte distintas associadas a diferenças de espécies.

Diferentemente de leucócitos e eritrócitos, o transporte de L-arginina em plaquetas, é mediado exclusivamente pelo sistema de alta afinidade y^+L que está ativado na IRC (89). É possível que a ativação do sistema y^+L em plaquetas de pacientes renais crônicos, represente uma resposta adaptativa aos reduzidos níveis plasmáticos de L-arginina presente em pacientes com IRC para manter a produção de NO (89). Estudos moleculares demonstraram, que o $y+LAT$ associado ao 4F2hc induzem o sistema y^+L em oócitos, mas os mecanismos responsáveis pela indução permanecem desconhecidos (88). Nesta dissertação, o sistema y^+L em neutrófilos não sofreu influência da IRC em hemodiálise.

Independente dos níveis plasmáticos de L-arginina estarem reduzidos pela metade, conforme descrição anterior (89), e a análise do transporte de L-arginina em neutrófilos estar normal no presente estudo, a concentração deste aminoácido está 4 vezes aumentada em neutrófilos lisados de pacientes com IRC comparados aos controles, o que seria suficiente para manter a produção de NO. Closs e colaboradores, em 2000, propuseram que algumas células como endotélio e macrófago possuíam reservatórios intracelulares de L-arginina, alguns deles inacessíveis a NOS, o que poderia explicar a baixa produção de NO (117).

É importante salientar que a L-arginina não é substrato apenas da NOS, podendo ser também utilizada pela enzima arginase para a formação de L-ornitina e ureia (118). Como a expressão e atividade da NOS e arginase variam amplamente, existe uma complexa interação entre elas de modo que o produto de uma pode inibir a atividade da outra. A enzima arginase, presente nos neutrófilos, poderia estar desviando a L-arginina para o ciclo da uréia (119). Futuros estudos da atividade e expressão da arginase em neutrófilos de pacientes com IRC são necessários.

Uma outra hipótese para explicar a atividade diminuída das NOS seria a presença de baixas concentrações de co-fatores necessários para a produção de NO, a exemplo da tetrahydrobiopterina (BH_4) (120). Corroborando com esta hipótese, um estudo prévio evidenciou níveis reduzidos de BH_4 em um modelo animal de IRC (121). Além disso, existem fortes evidências que a suplementação com BH_4 reduz a disfunção renal induzida por isquemia, impedindo a formação de peroxinitrito (122), e a disfunção endotelial (123).

Outra possibilidade para este achado poderia ser o acúmulo sistêmico de análogos de L-arginina, ADMA e L-NMMA, observado em pacientes com IRC em hemodiálise, que são antagonistas competitivos reversíveis das enzimas eNOS e iNOS (18, 124, 125). No presente estudo, o efeito do L-NMMA foi testado na atividade basal das NOS em neutrófilos e este análogo mostrou ser um potente inibidor destas enzimas. Crescentes evidências sugerem que o ADMA é um novo marcador para aterosclerose e um fator de risco cardiovascular independente em pacientes em HD (126, 127).

A análise da incubação das plaquetas com neutrófilos revelou uma diminuição da agregação plaquetária após 5 e 30 minutos em relação aos níveis basais tanto em pacientes como em controles. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os presentes resultados mostram que as plaquetas e neutrófilos interagem bioquimicamente. Como os neutrófilos parecem não ter a via da cicloxigenase e dessa forma não produzem prostaciclina (128), é possível que o NO derivado dos neutrófilos tenha um efeito anti-agregante plaquetário contribuindo em manter a homeostasia vascular. Presume-se que qualquer desequilíbrio na geração de NO pelas células sanguíneas e endoteliais pode ter consequências graves, opostas e até certo ponto paradoxais como trombose e hemorragias nos pacientes com IRC em hemodiálise (129).

A biodisponibilidade do NO depende tanto de sua síntese como de sua degradação. Nosso estudo mostrou uma redução da biodisponibilidade do NO através da diminuição de sua síntese, mas não de sua degradação através do estresse oxidativo. A carbonilação de proteínas, um método que avalia os mecanismos pró-oxidantes, se apresentou inalterada, assim como a peroxidação lipídica quando avaliada em soro de pacientes com IRC em hemodiálise quando comparada ao grupo controle. Além disso, a atividade da catalase e da GPx, enzimas que participam da defesa antioxidante, não diferiu quando comparamos os pacientes e o grupo controle.

Estudos prévios sobre o estresse oxidativo na IRC são controversos e geralmente não apresentam um grupo controle, e sim diferentes estágios de IRC (130, 131). É importante salientar que na nossa amostra os pacientes eram todos eutróficos, já que a desnutrição está mais comumente associada ao estresse oxidativo. Terapia anti-oxidante já vem sendo testada em pacientes em hemodiálise sem apresentar uma melhora dos marcadores de estresse oxidativo (132, 133).

A função de neutrófilos vêm sendo investigada nos pacientes em hemodiálise, mas os resultados ainda são questionáveis (134). Nossos achados mostram que neutrófilos isolados de pacientes com IRC em hemodiálise apresentam um *burst* oxidativo após estimulação com PMA similar aos controles, determinado através da liberação de superóxido. Um estudo realizado por Cohen *et al* demonstrou uma diminuição do *burst* oxidativo em pacientes em hemodiálise em relação aos controles após estimulação com *Escherichia Coli* e PMA (135). Por outro lado, Wann *et al* evidenciaram um aumento do *burst* oxidativo de neutrófilos, estimulados com PMA, em pacientes em hemodiálise que se correlacionava com acidose. As diferenças encontradas nestes estudos podem ser devido as características da população de pacientes em hemodiálise e as técnicas utilizadas (136).

Na quantificação de aminoácidos em neutrófilos, a glicina e o glutamato, precursores da glutathione, apresentaram-se em maior quantidade nos pacientes com IRC em hemodiálise comparados com controles. A glutathione é o maior antioxidante celular e a presença de níveis aumentados destes aminoácidos podem contribuir para sua síntese. Além disso, o glutamato tem um papel importante na migração de neutrófilos (137) e já existe um estudo experimental mostrando efeitos benéficos da sua suplementação na função dos neutrófilos (138). Também existe um estudo em humanos que investiga os efeitos da suplementação de glicina na pressão arterial em pacientes asiáticos. Os resultados mostraram uma elevação da pressão arterial nestes pacientes (139).

Este estudo apresenta algumas limitações como a diferença do sexo entre pacientes e controles, e o fato de não analisar os parâmetros pré- hemodiálise, pois o estudo foi realizado utilizando somente amostras coletadas pós-hemodiálise.

CONCLUSÃO

A menor atividade da NOS em neutrófilos foi observada independente do influxo de L-arginina, evidenciando que esta não compreende uma etapa limitante da via. Além disso, também foi observada a expressão inalterada da enzima NOS, em suas isoformas eNOS e iNOS. Neste contexto, o NO derivado dos neutrófilos mostrou-se eficaz em reduzir a agregação plaquetária podendo contribuir para a homeostasia vascular.

Um completo entendimento da modulação desta via é necessário, uma vez que pode conduzir a novas ferramentas terapêuticas na IRC, na tentativa de evitar o desenvolvimento de complicações cardiovasculares associadas com essa doença.

REFERÊNCIAS

1. da Silva DM, Vieira RM, Koschnik Z, Azevedo M, de Souza Sda S. Quality of life of patients with chronic renal insufficiency in hemodialysis treatment. *Rev Bras Enferm* 2002;55:562-7.
2. El Nahas M. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2918-29.
3. Vanholder R, Glorieux G, Lameire N. New insights in uremic toxicity. *Contrib Nephrol* 2005;149:315-24.
4. Campean V, Neureiter D, Varga I, Runk F, Reiman A, Garlichs C, et al. Atherosclerosis and vascular calcification in chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res* 2005;28:280-9.
5. Guerin AP, Pannier B, Metivier F, Marchais SJ, London GM. Assessment and significance of arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:635-41.
6. 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;34:1267-71.
7. Turkmen K, Tonbul HZ, Toker A, Gaipov A, Erdur FM, Cicekler H, et al. The relationship between oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis in renal transplant and end-stage renal disease patients. *Ren Fail* 2012;34:1229-37.
8. Turkmen K, Guney I, Yerlikaya FH, Tonbul HZ. The relationship between neutrophil-to-lymphocyte ratio and inflammation in end-stage renal disease patients. *Ren Fail* 2012;34:155-9.
9. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr* 2012;22:149-56.
10. Dong HP, Chunag IC, Wang DC, Huang LJ, Lee CI, Tsai JH, et al. Lipopolysaccharide-stimulated leukocytes contribute to platelet aggregative dysfunction, which is attenuated by catalase in rats. *Kaohsiung J Med Sci* 2010;26:584-92.
11. Della Bona R, Cardillo MT, Leo M, Biasillo G, Gustapane M, Trotta F, et al. Polymorphonuclear neutrophils and instability of the atherosclerotic plaque: a causative role? *Inflamm Res* 2013;62:537-50.
12. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988;12:365-72.

13. Van Dervort AL, Yan L, Madara PJ, Cobb JP, Wesley RA, Corriveau CC, et al. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils. *J Immunol* 1994;152:4102-9.
14. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
15. Rodrigues Pereira N, Bandeira Moss M, Assumpcao 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;44:164-8.
16. 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 y(+)-L. *Pflugers Arch* 2003;445:547-50.
17. Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998;78:487-545.
18. 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;93:57-64.
19. Li PK, Burdmann EA, Mehta RL. Acute kidney injury: global health alert. *Arab J Nephrol Transplant* 2013;6:75-81.
20. Foundation NK. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis* 39:S1-S266,2002 (suppl 1) 2002.
21. Romão Junior JE. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefr* 2004;26:1-3.
22. Sesso RG, P Available Data on Chronic Kidney Disease in Brazil. *Bras Nephrology* 2007;29:9-12.
23. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo de Diálise SBN 2012. 2012. [acesso em 2013 Dez 10]. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/pdf/publico2012.pdf>>.
24. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *N Engl J Med* 2007;357:1316-25.
25. Moradi H, Sica DA, Kalantar-Zadeh K. Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2013;38:136-48.
26. Almeras C, Argiles A. The general picture of uremia. *Semin Dial* 2009;22:329-33.
27. Currie G, Delles C. Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2013;7:13-24.

28. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010;375:2073-81.
29. Lee HY, Sakuma I, Ihm SH, Goh CW, Koh KK. Statins and Renin-Angiotensin System Inhibitor Combination Treatment to Prevent Cardiovascular Disease. *Circ J* 2014;24:281-7.
30. Marenzi G, Cabiati A, Assanelli E. Chronic kidney disease in acute coronary syndromes. *World J Nephrol* 2013;1:134-45.
31. Ros S, Carrero JJ. Endocrine alterations and cardiovascular risk in CKD: is there a link? *Nefrologia* 2013;33:181-7.
32. Avramovski P, Janakievska P, Sotiroski K, Sikole A. Accelerated progression of arterial stiffness in dialysis patients compared with the general population. *Korean J Intern Med* 2013;28:464-74.
33. Chavez-Sanchez L, Espinosa-Luna JE, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Montoya-Diaz E, Blanco-Favela F. Innate immune system cells in atherosclerosis. *Archives of medical research* 2014;45:1-14.
34. Legein B, Temmerman L, Biessen EA, Lutgens E. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2013;70:3847-69.
35. 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.
36. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Castaneda S. The influence of inflammation in the development of subclinical atherosclerosis in psoriatic arthritis: comment on 'Cardiovascular comorbidities in patients with psoriatic arthritis: a systematic review' by Jamnistki et al. *Annals of the rheumatic diseases*. No prelo 2014.
37. Violi F, Pignatelli P. Clinical Application of Nox Activity and Other Oxidative Biomarkers in Cardiovascular Disease? A Critical Review. *Antioxid Redox Signal* 2014.
38. Chonchol M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. *Semin Dial* 2006;19:291-6.
39. Betjes MG. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:255-65.
40. Alexiewicz JM, Smogorzewski M, Fadda GZ, Massry SG. Impaired phagocytosis in dialysis patients: studies on mechanisms. *Am J Nephrol* 1991;11:102-11.

41. Massry S, Smogorzewski M. Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int Suppl* 2001;78:S195-6.
42. Yoon JW, Pahl MV, Vaziri ND. Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2007;71:167-72.
43. Gollapudi P, Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND. Leukocyte toll-like receptor expression in end-stage kidney disease. *Am J Nephrol* 2010;31:247-54.
44. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-64.
45. Jyoti A, Singh AK, Dubey M, Kumar S, Saluja R, Keshari RS, et al. Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:417-31.
46. Meenakshi SR, Agarwal R. Nitric oxide levels in patients with chronic renal disease. *J Clin Diagn Res* 2013;7:1288-90.
47. Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H, Thurmel K. Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:29-40.
48. Jin R, Yu S, Song Z, Zhu X, Wang C, Yan J, et al. Soluble CD40 ligand stimulates CD40-dependent activation of the beta2 integrin Mac-1 and protein kinase C zeta (PKCzeta) in neutrophils: implications for neutrophil-platelet interactions and neutrophil oxidative burst. *PLoS One* 2013;8:e64631.
49. Sirolli V, Amoroso L, Pietropaolo M, Grandaliano G, Pertosa G, Bonomini M. Platelet-leukocyte interactions in hemodialysis patients: culprit or bystander? *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19:461-70.
50. Dikshit M, Kumari R, Srimal RC. Pulmonary thromboembolism-induced alterations in nitric oxide release from rat circulating neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:1369-73.
51. Lopez-Farre A, Farre J, Sanchez de Miguel L, Romero J, Gomez J, Rico L, et al. [Thrombosis and coronary disease: neutrophils, nitric oxide and aspirin]. *Rev Esp Cardiol* 1998;51:171-7.
52. Schafer K, Konstantinides S. Adipokines and thrombosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011;38:864-71.
53. 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 U S A* 1987;84:9265-9.
54. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.

55. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6 Suppl 2:S336-43.
56. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992;266:68-71, 4-7.
57. Tang L, Wang H, Ziolo MT. Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. *Pharmacol Ther* 2013;S0163-7258:255-6.
58. Chen DD, Shu C, Yang T, Zhou S, Yuan H, Chen AF. Tetrahydrobiopterin Regulation of eNOS Redox Function. *Curr Pharm Des* 2013;(no prelo).
59. Mastrangelo F, Grilli A, Tettamanti L, Gatto R, Marzo G, Vinci R, et al. Nitric oxide synthase isoenzyme expression in human oral lichen planus. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013;27:1069-75.
60. Lei H, Luo S, Qin H, Xia Y. Molecular Mechanisms of Endothelial NO Synthase Uncoupling. *Curr Pharm Des*. No prelo 2013.
61. Lorenc-Koci E, Czarnecka A. Role of nitric oxide in the regulation of motor function. An overview of behavioral, biochemical and histological studies in animal models. *Pharmacological reports* : PR 2013;65:1043-55.
62. O'Sullivan S, Medina C, Ledwidge M, Radomski MW, Gilmer JF. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: Biological and pharmacological significance: NO and MMP-9 interactions. *Biochim Biophys Acta* 2013;1843:603-17.
63. 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;125:370-7.
64. Kumar S, Jyoti A, Keshari RS, Singh M, Barthwal MK, Dikshit M. Functional and molecular characterization of NOS isoforms in rat neutrophil precursor cells. *Cytometry A* 2010;77:467-77.
65. Sopi RB, Zaidi SI, Mladenov M, Sahiti H, Istrefi Z, Gjorgoski I, et al. L-citrulline supplementation reverses the impaired airway relaxation in neonatal rats exposed to hyperoxia. *Respir Res* 2012;13:68.
66. Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Ellory JC, Mann GE. Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: a role for L-arginine supplementation in vascular protection? *Cardiovasc Res* 2007;73:359-67.
67. Bahri S, Zerrouk N, Aussel C, Moinard C, Crenn P, Curis E, et al. Citrulline: from metabolism to therapeutic use. *Nutrition* 2013;29:479-84.
68. Bogle RG, Moncada S, Pearson JD, Mann GE. Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter. *Br J Pharmacol* 1992;105:768-70.

69. 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 (Pt 1):229-41.
70. Sadovnikov VB, Navolotskaya EV. Synthetic peptide octarphin (TPLVTLFK), a selective agonist of nonopioid beta-endorphin receptor, stimulates nitric oxide synthesis in macrophages. *J Pept Sci*. No prelo 2014.
71. Sun X, Kumar S, Sharma S, Aggarwal S, Lu Q, Gross C, et al. Endothelin-1 Induces a Glycolytic Switch in Pulmonary Arterial Endothelial Cells via the Mitochondrial Translocation of Endothelial NO Synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. No prelo 2014.
72. Brunini TM, Yaqoob MM, Roberts NB, Ellory JC, Moss MB, Siqueira MA, et al. Characterization of cationic amino acid transport systems in rat erythrocytes: lack of effect of uraemia on L-arginine influx. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:702-7.
73. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 2005;26:3-31.
74. Mineo C, Shaul PW. Regulation of eNOS in caveolae. *Adv Exp Med Biol* 2012;729:51-62.
75. Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol* 2003;547:21-33.
76. Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr* 2004;134:2752S-9S; discussion 65S-67S.
77. Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res* 2001;49:697-712.
78. Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: implications for anesthesiology and intensive care. *Anesthesiology* 2010;113:1460-75.
79. Karbach S, Simon A, Slenzka A, Jaenecke I, Habermeier A, Martine U, et al. Relative contribution of different L-arginine sources to the substrate supply of endothelial nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:855-61.
80. Rotmann A, Simon A, Martine U, Habermeier A, Closs EI. Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y⁺ and y⁺L. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C2259-68.
81. Metzler R, Meleshkevitch EA, Fox J, Kim H, Boudko DY. An SLC6 transporter of the novel B(0,_s)- system aids in absorption and detection of nutrient amino acids in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* 2013;216:2843-57.
82. Rotoli BM, Dall'asta V, Barilli A, D'Ippolito R, Tipa A, Olivieri D, et al. Alveolar macrophages from normal subjects lack the NOS-related system y⁺ for arginine transport. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:105-12.

83. Christensen HN. A Transport System Serving for Mono- and Diamino Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;51:337-44.
84. 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.
85. Van Winkle LJ, Campione AL, Gorman JM. Inhibition of transport system b₀,+ in blastocysts by inorganic and organic cations yields insight into the structure of its amino acid receptor site. *Biochim Biophys Acta* 1990;1025:215-24.
86. Deves R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system (y+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol* 1992;454:491-501.
87. Torrents D, Estevez R, Pineda M, Fernandez E, Lloberas J, Shi YB, et al. Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* 1998;273:32437-45.
88. Torrents D, Mykkanen J, Pineda M, Feliubadalo L, Estevez R, de Cid R, et al. Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 1999;21:293-6.
89. Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Yaqoob M, Aronson JK, Mann GE, Ellory JC. Identification of system y+L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uraemia. *Pflugers Arch* 1999;438:573-5.
90. Saboor M, Ayub Q, Ilyas S, Moinuddin. Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology. *Pak J Med Sci* 2013;29:891-6.
91. Mountrakis L, Lorenz E, Hoekstra AG. Where do the platelets go? A simulation study of fully resolved blood flow through aneurysmal vessels. *Interface Focus* 2013;3:20120089.
92. Rimele TJ, Sturm RJ, Adams LM, Henry DE, Heaslip RJ, Weichman BM, et al. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245:102-11.
93. Faint RW, Mackie IJ, Machin SJ. Platelet aggregation is inhibited by a nitric oxide-like factor released from human neutrophils in vitro. *Br J Haematol* 1991;77:539-45.
94. Malawista SE, Montgomery RR, van Blaricom G. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1992;90:631-6.
95. Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thrombosis research* 2000;100:223-47.

96. Popolo A, Autore G, Pinto A, Marzocco S. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radic Res* 2013;47:346-56.
97. Zhang A, Jia Z, Wang N, Tidwell TJ, Yang T. Relative contributions of mitochondria and NADPH oxidase to deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in mice. *Kidney Int* 2011;80:51-60.
98. Meyer MR, Barton M, Prossnitz ER. Functional heterogeneity of NADPH oxidase-mediated contractions to endothelin with vascular aging. *Life sciences* 2013.
99. Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 2014;14:24438-75.
100. Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillaud JC, Lorgis L, Cottin Y, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther* 2013;140:239-57.
101. Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras* 1997;43:61-8.
102. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 2013;1:244-57.
103. Krofic Zel M, Tozon N, Nemeč Svete A. Plasma and Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity, Serum Selenium Concentration, and Plasma Total Antioxidant Capacity in Cats with IRIS Stages I-IV Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 2013;28:130-6.
104. Siqueira MA, Brunini TM, Pereira NR, Martins MA, Moss MB, Santos SF, et al. Increased nitric oxide production in platelets from severe chronic renal failure patients. *Can J Physiol Pharmacol* 2011;89:97-102.
105. Pinto VL, de Souza PF, Brunini TM, Oliveira MB, Moss MB, Siqueira MA, et al. Low plasma levels of L-arginine, impaired intraplatelet nitric oxide and platelet hyperaggregability: implications for cardiovascular disease in depressive patients. *J Affect Disord* 2011;140:187-92.
106. de Boer OJ, Li X, Teeling P, Mackaay C, Ploegmakers HJ, van der Loos CM, et al. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2012;109:290-7.
107. Dircks BH, Mischke R, Schuberth HJ. Platelet-neutrophil aggregate formation in blood samples from dogs with systemic inflammatory disorders. *Am J Vet Res* 2012;73:939-45.
108. Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995;91:2080-8.

109. Mollace V, Romeo F, Martuscelli E, Rosano GM, Federici G, Nistico G, et al. Low formation of nitric oxide in polymorphonuclear cells in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1994;74:65-8.
110. 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;445:147-51.
111. Schwartz IF, Ayalon R, Chernichovski T, Reshef R, Chernin G, Weinstein T, et al. Arginine uptake is attenuated through modulation of cationic amino-acid transporter-1, in uremic rats. *Kidney Int* 2006;69:298-303.
112. Closs EI, Lyons CR, Kelly C, Cunningham JM. Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J Biol Chem* 1993;268:20796-800.
113. MacLeod CL, Finley KD, Kakuda DK. γ (+)-type cationic amino acid transport: expression and regulation of the mCAT genes. *J Exp Biol* 1994;196:109-21.
114. Closs EI. CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporters. *Amino acids* 1996;11:193-208.
115. Albritton LM, Bowcock AM, Eddy RL, Morton CC, Tseng L, Farrer LA, et al. The human cationic amino acid transporter (ATRC1): physical and genetic mapping to 13q12-q14. *Genomics* 1992;12:430-4.
116. Closs EI, Graf P, Habermeier A, Cunningham JM, Forstermann U. Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 1997;36:6462-8.
117. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Molecular pharmacology* 2000;57:68-74.
118. Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:1-8.
119. Darcy CJ, Woodberry T, Davis JS, Piera KA, McNeil YR, Chen Y, et al. Increased plasma arginase activity in human sepsis: association with increased circulating neutrophils. *Clin Chem Lab Med* 2013:1-9.
120. Yokoyama K, Tajima M, Yoshida H, Nakayama M, Tokutome G, Sakagami H, et al. Plasma pteridine concentrations in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1032-6.
121. Okamura DM, Himmelfarb J. Tipping the redox balance of oxidative stress in fibrogenic pathways in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2009;24:2309-19.

122. Sucher R, Gehwolf P, Oberhuber R, Hermann M, Margreiter C, Werner ER, et al. Tetrahydrobiopterin protects the kidney from ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2010;77:681-9.
123. Yamamizu K, Shinozaki K, Ayajiki K, Gemba M, Okamura T. Oral administration of both tetrahydrobiopterin and L-arginine prevents endothelial dysfunction in rats with chronic renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:131-9.
124. Hacisevki A, Gonenc A, Sezer S, Karakan S, Simsek B, Torun M. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis and oxidative DNA damage in end-stage renal disease. *Clin Lab* 2014;59:1353-61.
125. Duranton F, Lundin U, Gayraud N, Mischak H, Aparicio M, Mourad G, et al. Plasma and urinary amino Acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:37-45.
126. Alsagaff MY, Thaha M, Aminuddin M, Yogiarto RM, Yogiartoro M, Tomino Y. Asymmetric dimethylarginine: a novel cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *The Journal of international medical research* 2012;40:340-9.
127. Tripepi G, Mattace Raso F, Sijbrands E, Seck MS, Maas R, Boger R, et al. Inflammation and asymmetric dimethylarginine for predicting death and cardiovascular events in ESRD patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1714-21.
128. Marcus AJ, Safier LB, Ullman HL, Broekman MJ, Islam N, Oglesby TD, et al. Inhibition of platelet function in thrombosis. *Circulation* 1985;72:698-701.
129. Galbusera M, Remuzzi G, Boccardo P. Treatment of bleeding in dialysis patients. *Semin Dial* 2009;22:279-86.
130. Tbahriti HF, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. Effect of different stages of chronic kidney disease and renal replacement therapies on oxidant-antioxidant balance in uremic patients. *Biochem Res Int* 2014;2013:358985.
131. Gunal SY, Ustundag B, Gunal AI. The assessment of oxidative stress on patients with chronic renal failure at different stages and on dialysis patients receiving different hypertensive treatment. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 2013;28:390-5.
132. Himmelfarb J, Ikizler TA, Ellis C, Wu P, Shintani A, Dalal S, et al. Provision of Antioxidant Therapy in Hemodialysis (PATH): A Randomized Clinical Trial. *J Am Soc Nephrol*. No prelo 2013.
133. Ahmadi A, Mazooji N, Roozbeh J, Mazloom Z, Hasanzade J. Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients. *Iran J Kidney Dis* 2013;7:461-7.
134. Hassoba HM, Younis SE, Fahmy HA, Labib S, Abdelrazek NY, Youssef A, et al. Impact of hepatitis C virus infection on neutrophil oxidative burst function in

hemodialysis patients. *The Egyptian journal of immunology / Egyptian Association of Immunologists* 2010;17:1-8.

135. Cohen G, Raupachova J, Borchhardt K, Horl WH. Cinacalcet effect on polymorphonuclear leucocytes of kidney transplant patients. *European journal of clinical investigation* 2013;43:476-82.
136. Wann JG, Hsu YH, Yang CC, Lin CS, Tai DW, Chen JS, et al. Neutrophils in acidotic haemodialysed patients have lower intracellular pH and inflamed state. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:2613-22.
137. Gupta R, Palchaudhuri S, Chattopadhyay D. Glutamate induces neutrophil cell migration by activating class I metabotropic glutamate receptors. *Amino acids* 2013;44:757-67.
138. Dong J, Chen P, Liu Q, Wang R, Xiao W, Zhang Y. Reverse effects of DPI administration combined with glutamine supplementation on function of rat neutrophils induced by overtraining. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 2013;23:137-49.
139. Stamler J, Brown IJ, Daviglus ML, Chan Q, Miura K, Okuda N, et al. Dietary glycine and blood pressure: the International Study on Macro/Micronutrients and Blood Pressure. *The American journal of clinical nutrition* 2013;98:136-45.

APÊNDICE - Questionário**Ficha Clínica****DADOS PESSOAIS**

Nome: _____

Prontuário: _____

Telefone: _____

Data de nascimento _____ / _____ / _____ Idade: _____ Sexo _____

Estado Civil _____ Profissão _____

Endereço _____

Cidade : _____ Estado: _____

ANAMNESE

Quanto tempo em diálise: _____

Causa da doença renal: _____

Está em tratamento médico atualmente? () Sim () Não

Histórico familiar de obesidade? () Sim () Não

Atividade física? () Sim () Não Tempo: _____

Gravidez: () Sim () Não

Está fazendo uso de alguma medicação (antiinflamatório, antibiótico)?

() Sim () Não

Já foi operado? () Sim () Não Qual _____

Fez transfusão sanguínea recentemente? _____

Sofre alguma das seguintes doenças?

Febre reumática

Problemas cardíacos(cardiopatia esquêmica, ICC,HAS,prótese cardíaca):

() Sim () Não

Problemas hepáticos: () Sim () Não

Problemas renais: () Sim () Não

Problemas gástricos: () Sim () Não

Problemas Respiratórios: () Sim () Não

Problemas alérgicos: () Sim () Não

Problemas Articulares ou Reumatismo: () Sim () Não

Problemas sanguíneos: () Sim () Não

Diabetes: () Sim () Não

Tabagismo: (atual/passado-tempo, numero de cigarros/dia) () Sim () Não

Peso: _____ Kg Altura: _____ m IMC: _____ Kg/m²

Circunferência da cintura: _____ cm Pressão arterial: _____ mmHg

ANEXO A- Comitê de ética em pesquisa HUPE/UERJ

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^a. 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^a., 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- Termo de Consentimento**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título da pesquisa: **Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na modulação da via L-arginina-óxido nítrico em pacientes com hipertensão ou hipotensão intradialítica.** Pesquisadores participantes: **Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro e Mestranda Daniele Carvalho Abrantes** [Telefone para contato: **(21)28688201 ou (21)82279767**

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 Daniele Carvalho Abrantes 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 2013.

Assinatura do sujeito ou responsável

Testemunha

Pesquisador