



Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

**Ca²⁺-ATPase E PROTEÍNA KINASE C α DE MEMBRANA DE ERITRÓCITO:
ALTERAÇÕES NA OBESIDADE E SOBREPESO**

Kamila Fonte Zanon de Souza

Orientador: Paulo André da Silva

Duque de Caxias

2023

KAMILA FONTE ZANON DE SOUZA

**Ca²⁺-ATPase E PROTEÍNA KINASE C α DE MEMBRANA DE ERITRÓCITO:
ALTERAÇÕES NA OBESIDADE E SOBREPESO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, da Universidade do Grande Rio, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo André da Silva.

Duque de Caxias

2023

KAMILA FONTE ZANON DE SOUZA

**Ca²⁺-ATPase E PROTEÍNA KINASE C α DE MEMBRANA DE ERITRÓCITO:
ALTERAÇÕES NA OBESIDADE E SOBREPESO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, da Universidade do Grande Rio, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo André da Silva.

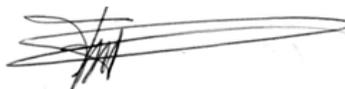
Aprovada em 24 de janeiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA



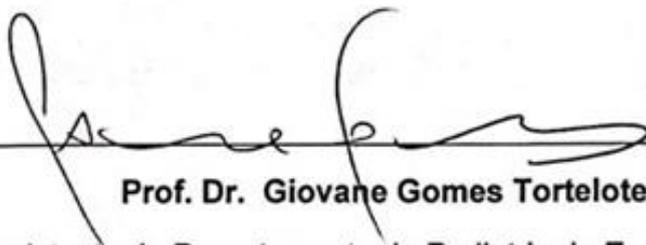
Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

Professor Adjunto Doutor da Universidade do Grande Rio



Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes

Professor Associado - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)



Prof. Dr. Giovane Gomes Tortelote

Prof. Assistente do Departamento de Pediatria da Escola de Medicina

Universidade de Tulane - USA

Resumo

A obesidade se tornou um problema de saúde pública no mundo e no Brasil, atingindo todas as classes sociais e idades. O sobrepeso e a obesidade estão correlacionados com várias comorbidades, entre elas estão a hipertensão arterial, diabetes mellitus, doenças cardíacas, entre outras. As alterações metabólicas e hormonais ocorridas na obesidade levam a hipertensão arterial e alterações no balanço hidroeletrólítico, levando a modificações em várias células e tecidos. Os eritrócitos são células muito sensíveis a modificações osmóticas, podendo apresentar alterações em sua estrutura e composição proteica causadas pela obesidade e sobrepeso. O objetivo desta dissertação é verificar possíveis alterações na atividade da Ca^{2+} -ATPase e na quantidade de PKC α nas membranas de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso e utilizar estes parâmetros como possíveis biomarcadores das modificações metabólicas geradas pela obesidade. Foram recrutados 40 indivíduos, que trabalham ou estudam na Universidade do Grande Rio (Unigranrio) e classificados, a partir do índice de massa corporal (IMC), em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. Foram coletados 25 ml de sangue (em jejum), para mensuração dos parâmetros bioquímicos e obtenção das membranas de eritrócitos para mensuração da atividade Ca^{2+} -ATPásica e da PKC α . Foi verificado que a obesidade e o sobrepeso promovem uma redução significativa da atividade Ca^{2+} -ATPásica em relação ao grupo eutrófico ($n = 12-16$; eutróficos = $28,8 \pm 4,6$; sobrepesos = $14,6 \pm 2,2$; obeso = $8,7 \pm 1,9 \text{ nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Em relação a PKC α , ocorreu um aumento significativo nos grupos obesos e com sobrepeso em relação ao grupo eutrófico (de aproximadamente 5 vezes). Em conclusão, as alterações metabólicas e hormonais geradas pela obesidade e o sobrepeso modulam negativamente a atividade da Ca^{2+} -ATPase e positivamente a quantidade de PKC α nas membranas de eritrócitos. Possivelmente as alterações na atividade da Ca^{2+} -ATPase em eritrócitos podem ser utilizadas como biomarcadores na obesidade e suas comorbidades.

Palavras-Chave: Obesidade, Hipertensão Arterial, Eritrócitos, Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, Ca^{2+} -ATPase.

Abstract

Obesity has become a public health problem in the world and Brazil, affecting all social classes and ages. Overweight and obesity are correlated with several comorbidities, including high blood pressure, diabetes mellitus, heart disease, among others. The metabolic and hormonal alterations that occur in obesity lead to arterial hypertension and changes in the hydroelectrolytic balance, leading to changes in various cells and tissues. Erythrocytes are very sensitive cells to osmotic changes, and may present alterations in their structure and protein composition caused by obesity and overweight. The objective of this work is verify possible alterations in the activity of Ca^{2+} -ATPase and PKC α in erythrocyte membranes of obese and overweight individuals and to use these parameters as possible biomarkers of the metabolic modifications generated by obesity. Forty individuals who work or study at the University of Grande Rio (Unigranrio) were recruited and classified, based on the body mass index (BMI), into eutrophic, overweight and obese individuals. Twenty-five ml of blood (fasting) were collected to measure biochemical parameters and obtain erythrocyte membranes to measure Ca^{2+} -ATPase activity and PKC α . It was verified that obesity and overweight promote a significative reduction in Ca^{2+} -ATPasic activity in relation to the eutrophic group (n = 12–16; eutrophic = 28.8 ± 4.6 ; overweight = 14.6 ± 2.2 ; obese = 8.7 ± 1.9 nmol $\text{P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Regarding PKC α , there was a significant increase in the obese and overweight groups compared to the eutrophic group (approximately 5 times). In conclusion, the metabolic and hormonal alterations generated by obesity and overweight negatively modulate Ca^{2+} -ATPase activity and positively modulate the amount of PKC α in erythrocyte membranes. Possibly changes in Ca^{2+} -ATPase activity in erythrocytes can be used as biomarkers in obesity and its comorbidities.

Keywords: Obesity, Hypertension, Erythrocytes, Renin Angiotensin Aldosterone System, Ca^{2+} -ATPase.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Mapa da obesidade no mundo em 1975..... | 10 |
| Figura 2 – Mapa da obesidade no mundo em 2016..... | 11 |
| Figura 3 – Tipos de adipócitos. | 15 |
| Figura 4 – Alterações do tecido adiposo branco na obesidade..... | 17 |
| Figura 5 – Mecanismos da hipertensão arterial associada a obesidade e suas comorbidades | 18 |
| Figura 6 – Modelo de transporte iônico no eritrócito | 20 |
| Figura 7 – Ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase de membrana..... | 22 |
| Figura 8 – Estrutura e isoformas de PKC..... | 24 |
| Figura 9 – A atividade da Ca^{2+} -ATPase em membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. | 33 |
| Figura 10 – Correlação entre a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membranas de eritrócitos com o IMC..... | 33 |
| Figura 11 – Correlação entre a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membranas de eritrócitos com o RCQ. | 34 |
| Figura 12 – Aumento do número de cópias de PKC α na obesidade e sobrepeso..... | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Dados demográficos e clínicos..... | 31 |
| Tabela 2- Dados bioquímicos..... | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| Ang I | Angiotensina I |
| Ang II | Angiotensina II |
| AT ₁ R | Receptor tipo 1 |
| AT ₂ R | Receptor tipo 2 |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| ATPases | Adenosinatrifosfatases |
| CaM | Calmodulina |
| CaMK | Proteína quinase dependente de Ca ²⁺ -calmodulina |
| CC | Circunferência da cintura |
| CQ | Circunferência do quadril |
| CT | Colesterol total |
| DAG | Diacilglicerol |
| DM2 | Diabetes tipo 2 |
| ECA | Enzima conversora da angiotensina |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGTA | Ácido aminopolicarboxílico |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| HOMA-IR | Avaliação do modelo de homeostase - resistência à insulina |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-12 | Interleucina-12 |
| IL1 β | Interleucina-1 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IMC | Índice de massa corporal |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| MCP1 | Proteína quimioatraente de monócito-1 |
| MR | Receptor de Mineralocorticoide |
| NCKX | Trocador de potássio dependente de sódio-cálcio |
| NCX | Trocador sódio-cálcio |

| | |
|--------------|---|
| PA | Pressão Arterial |
| PKA | Proteína quinase |
| PKC | Proteína quinase C |
| PKC α | Proteína quinase C – isoforma alfa |
| PLN | Proteína fosfolambam |
| PMCA | Ca ²⁺ -ATPase de Membrana plasmática |
| PNS | Pesquisa Nacional de Saúde |
| POF | Pesquisa de Orçamentos Familiares |
| RCQ | Relação cintura quadril |
| RE | Retículo endoplasmático |
| RS | Retículo sarcoplasmático |
| SBD | Sociedade Brasileira de Diabetes |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SERCA | Ca ²⁺ -ATPase de Retículo endoplasmático e sarcoplasmático |
| SNS | Sistema nervoso simpático |
| SRAA | Sistema Renina Angiotensina Aldosterona |
| TBSt | Tampão salino com Tris e Tween |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TG | Triglicerídeos |
| TGF- β | Fator de crescimento beta |
| TNF α | Fator de necrose tumoral alfa |
| WHO | World Health Organization |

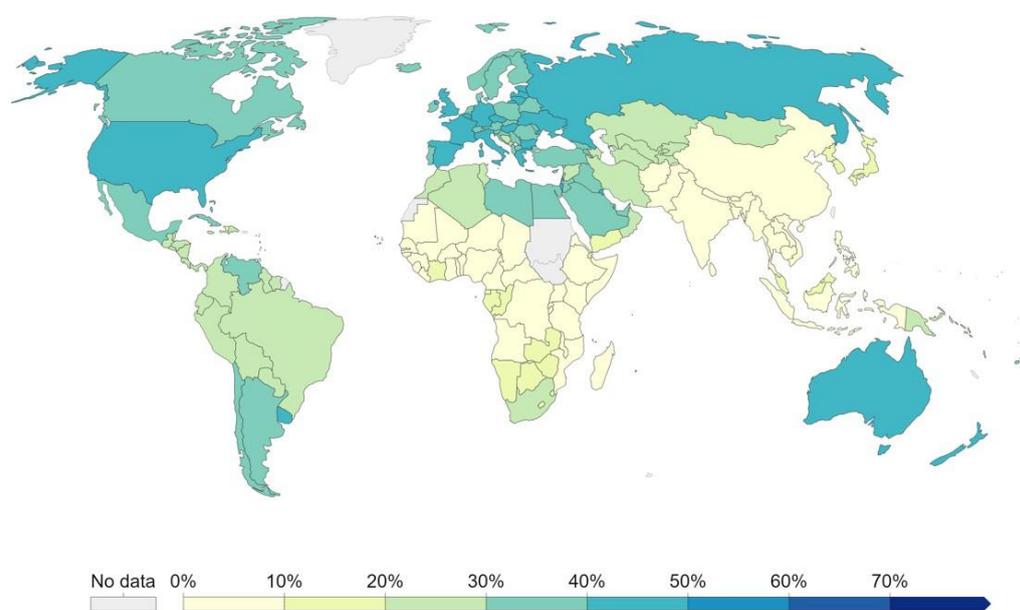
SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.2 OBESIDADE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS | 13 |
| 1.3 OBESIDADE: ASPECTOS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS | 14 |
| 1.4 ALTERAÇÕES DO SRAA NA OBESIDADE | 17 |
| 1.5 Ca²⁺-ATPase | 19 |
| 1.6 PKC: ESTRUTURA E FUNÇÃO | 22 |
| 2. OBJETIVO GERAL | 25 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 3. METODOLOGIA | 26 |
| 3.1 CASUÍSTICA | 26 |
| 3.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA | 26 |
| 3.3 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL (PA) | 27 |
| 3.4 COLETA DE SANGUE E ENSAIOS BIOQUÍMICOS | 27 |
| 3.5 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA Ca²⁺-ATPase | 28 |
| 3.6 ELETROFORESE E IMUNODETECÇÃO | 29 |
| 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 36 |
| 6. CONCLUSÕES | 40 |
| 7. REFERÊNCIAS | 41 |
| 8. ANEXO I – TCLE | 51 |

1- INTRODUÇÃO

A obesidade se tornou uma pandemia nos últimos anos, atingindo todas as faixas etárias, países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2016). Os números são alarmantes, ultrapassando 1 bilhão de pessoas no mundo (WHO, 2016). Nas últimas décadas, ocorreu uma transição nutricional e comportamental global, que levou a um aumento significativo do número de indivíduos com obesidade e sobrepeso, em 1975, 21,5% dos adultos apresentavam sobrepeso ou obesidade, dentre eles, 4,3% eram obesos (FIGURA 1). Em 2016, o número de indivíduos com sobrepeso era de aproximadamente 39% da população (1,9 bilhões), sendo 13,2% de obesos (650 milhões) (FIGURA 2).

FIGURA 1. Mapa da obesidade no mundo em 1975.

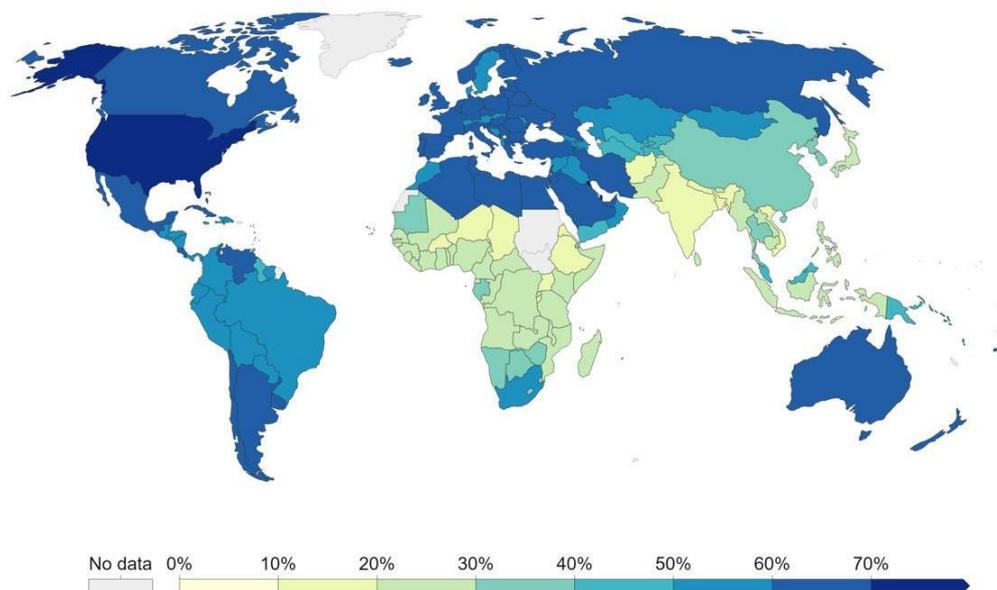


Source: WHO, Global Health Observatory

OurWorldInData.org/obesity • CC BY

O mapa mostra o percentual de indivíduos com sobrepeso no mundo em 1975. As cores em tons mais escuros representam percentuais mais altos. Fonte: <https://ourworldindata.org/obesity> (acessado em 2023).

FIGURA 2. Mapa da Obesidade no mundo em 2016.



Source: WHO, Global Health Observatory

OurWorldInData.org/obesity • CC BY

O mapa mostra o percentual de indivíduos com sobrepeso no mundo em 2016. As cores em tons mais escuros representam percentuais mais altos. Fonte: <https://ourworldindata.org/obesity> (acessado em 2023).

A tendência do aumento no número de obesos no decorrer dos anos no Brasil é semelhante ao que ocorre no mundo, nas últimas décadas a obesidade aumentou significativamente. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), divulgada pelo IBGE, a quantidade de indivíduos obesos adultos no Brasil mais que dobrou em 17 anos, passando de 12,2%, entre 2002 e 2003, para 26,8%, no ano de 2019. Nesse período, o percentual de indivíduos adultos com o sobrepeso passou de 43,3% para 61,7%, o que representa por volta de dois terços dos brasileiros. Essa estimativa foi realizada em comparação com as estimativas de 2002-2003 e 2018-2018 da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) (IBGE, 2019).

Segundo a Organização mundial da Saúde (WHO, 2022), a obesidade é caracterizada pelo aumento do tecido adiposo, estando associado a riscos para a saúde devido à sua relação com complicações metabólicas. O tecido adiposo é um órgão endócrino que se desregula significativamente na obesidade, com

isso a liberação de adipocinas se altera levando a modificações na saciedade, metabolismo e na atividade simpática. Estas alterações geram doenças metabólicas como diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças cardíacas, entre outras (Magkos et al., 2016). O aumento da ativação simpática e do Sistema Renina Aldosterona (SRAA) são as principais causas da hipertensão arterial, pois ocorrerá por consequência o aumento da reabsorção renal de sódio e aumento da contratilidade do músculo liso dos vasos (HALL et al., 2019).

A partir da observação dos muitos e graves problemas de saúde gerados pela obesidade, é importante encontrar novos biomarcadores para as alterações e comorbidades geradas por ela. Existem diversos tipos de biomarcadores, localizados em diferentes áreas do organismo. Entretanto, para utilização de biomarcadores menos invasivos, geralmente, o sangue periférico é o material mais utilizado (WIJK, 2005).

Os eritrócitos são células altamente sensíveis a modificações iônicas, vários estudos vêm buscando uma correlação entre as modificações no transporte de Na^+ e Ca^{2+} nesta célula em diversas comorbidades, dentre eles podemos destacar a hipertensão arterial. Essas células são constituintes integrais do sangue e transportam O_2 , CO_2 e metabólitos entre os órgãos, por isso, sua análise pode contribuir para um melhor entendimento do estado metabólico sistêmico (GOLIK et al., 1996; TOSUKHOWONG et al., 1996; ZIOBRO et al., 2013; TRINDADE, 2020).

Os transportadores ativos primários de sódio e cálcio estão alterados em diferentes órgãos na obesidade, entre eles podemos destacar o rim e o coração (LUZES et al., 2021; HERDY, 2022). Alguns trabalhos mostram a redução da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ de eritrócitos na hipertensão arterial e obesidade, porém, os mecanismos que levam a essa diminuição não estão claros (SUHAIL, 2010). Estas ATPases são responsáveis, em parte, por manter o equilíbrio iônico e o volume do eritrócito. A $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ é a maior responsável pelo controle das concentrações intracelulares do íon Ca^{2+} , que é um importante mensageiro celular, modulando a atividade de várias kinases e por consequência todo metabolismo celular (REPSOLD & JOUBERT, 2018).

Em células renais, os componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), em especial os receptores de Angiotensina II (Ang II), proteínas kinases C e A, apresentam modificações em sua atividade e quantidade (LUZES et al., 2021). Estas modificações são alguns dos principais fatores que levam ao aumento da pressão arterial em animais obesos (LUZES et al., 2021). Alterações semelhantes podem possivelmente estar ocorrendo nos eritrócitos de indivíduos obesos, causando modificações na atividade da Ca^{2+} -ATPase, no metabolismo e na atividade de proteínas kinases.

1.2- OBESIDADE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A obesidade é classificada de acordo com o índice de massa corporal (IMC), que é dado pelo peso (em kg) dividido pela altura² (em metros), os indivíduos que apresentam esse índice acima de 24,9 são considerados com sobrepeso e acima de 29,9, obesos (WHO, 2020). A obesidade e o sobrepeso são caracterizados, não só pelo aumento do IMC, como também pelo aumento da gordura abdominal de um indivíduo (MAGKOS et al. 2016). Com o desenvolvimento da doença, comorbidades osteoarticulares e fisiológicas podem aparecer, ocorrendo com mais ênfase no decorrer do envelhecimento (SOLÁ et al., 2007; ANDOLFI et al., 2018; SANTOS et al., 2021). As principais causas que levam ao excesso de peso e a obesidade são uma alimentação hipercalórica e a falta de atividade física (IBGE, 2020).

A obesidade pode gerar altos custos aos sistemas de saúde, além de ser um fator de risco conhecido para uma série de condições relacionadas a morbidade e mortalidade como câncer, diabetes, doenças cardíacas, entre outras (BAHIA et al., 2012; ASSARI et al., 2019). Nos Estados Unidos em 2007, de todos os cânceres, 6% foram atribuídos a obesidade, sendo 4% em homens e 7% em mulheres (POLEDNAK, 2008).

De acordo com BAHIA et al. (2012), com dados coletados entre 2008 e 2010, os custos totais estimados em um ano com as doenças relacionadas ao sobrepeso e a obesidade são de US\$ 2,1 bilhões, sendo US\$ 1,4 bilhão (68,4%

dos custos totais) devido as internações e US\$ 679 milhões devido a procedimentos ambulatoriais, ou seja, cerca de 10% desses custos são relacionados aos indivíduos com sobrepeso e obesidade.

Os indivíduos obesos podem apresentar disfunções na musculatura respiratória, devido a restrição causada pela sobrecarga na musculatura, por causa da gordura acumulada na região torácica e abdominal, acarretando diminuição de mobilidade torácica (GIBSON et al., 2000). Mobilidade essa que leva a alterações no sistema respiratório, como fraqueza muscular expiratória, gerado pelo aumento do tecido adiposo e a limitação da musculatura nesta região, reduzindo a complacência pulmonar e perdendo o recuo elástico, que pode ser influenciado tanto pelo envelhecimento (OYARZUN et al., 2009) como pela obesidade, acarretando na calcificação nas articulações dessa região e redução dos espaços intervertebrais (SGARIBOLDI et al., 2015).

Com o aumento da gordura abdominal, vários órgãos são afetados de forma pontual, dentre eles está o fígado. Os depósitos de gordura hepática aumentam significativamente, sendo um indicador importante para fatores de risco, entre eles estão a resistência à insulina, intolerância à glicose, níveis elevados de lipídios no sangue e doenças cardiovasculares (FRAYN et al., 1992).

1.3 - OBESIDADE: ASPECTOS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

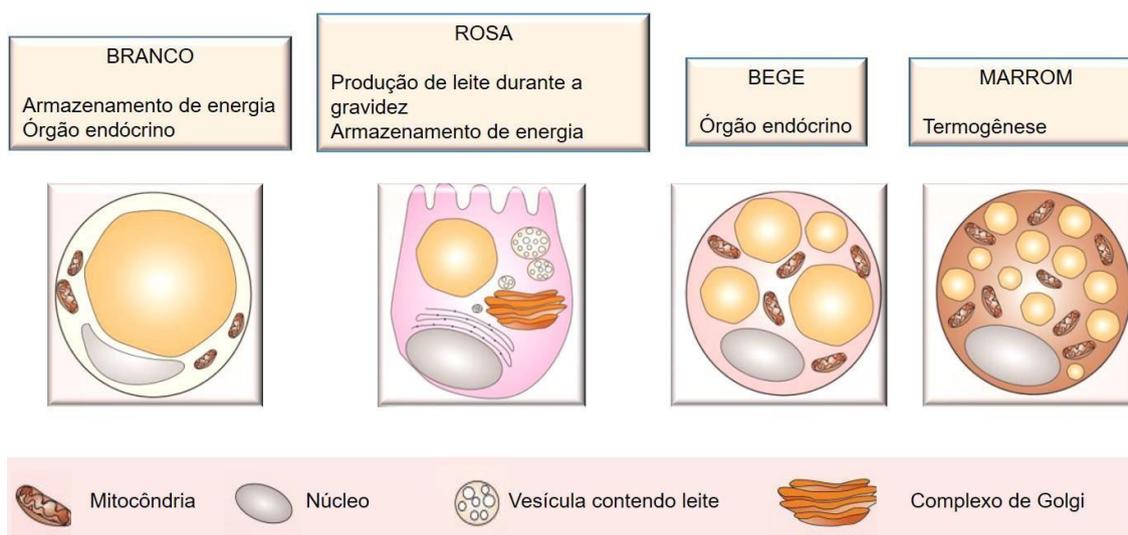
O tecido adiposo é formado por vários tipos de células, entre eles estão os pré-adipócitos, adipócitos, fibroblastos, células endoteliais vasculares e células do sistema imune (HILL et al., 2014). Os adipócitos ficam alocados de forma justaposta, com pouca substância extracelular entre elas e frouxamente amarradas.

O tecido adiposo possui muitos tipos de células imunes, dentre elas podemos destacar os macrófagos (SELL et al., 2010). Estas células possuem um papel importante na regulação da inflamação e do metabolismo no tecido adiposo. Os Macrófagos presentes neste local secretam citocinas inflamatórias

e óxido nítrico que induzem a produção de HIF1-alfa e quando em situação de hipóxia dos adipócitos, se gera uma alça de amplificação dos mecanismos inflamatórios (HILL et al., 2014).

Existem quatro tipos de adipócitos: o branco, o bege, o marrom e o rosa (FIGURA 3). O adipócito branco é uma célula geralmente oval, que apresenta um grande bloco de armazenamento de triglicerídeos que ocupa praticamente todo citosol. Apresenta uma pequena quantidade de mitocôndrias, indicando uma pequena capacidade de oxidação de substratos energéticos, dentre eles os lipídios (CANNON & NEDERGAARD, 2004). O tecido adiposo marrom apresenta várias gotículas de gordura e uma grande quantidade de mitocôndrias, sua principal função é a termogênese. O tecido adiposo bege apresenta características morfofisiológicas de transição entre tecido adiposo branco e o marrom, apresentando algumas gotículas de gordura e uma quantidade intermediária de mitocôndrias. O tecido adiposo rosa é responsável pela produção de leite durante a gravidez e a amamentação e armazenamento de lipídios (CORRÊA et al., 2019). O aparecimento da obesidade está associado principalmente à hipertrofia do tecido adiposo branco e suas modificações na secreção de adipocinas (SILVERTHORN, 2017; POEKES et al 2015).

FIGURA 3. Tipos de adipócitos.

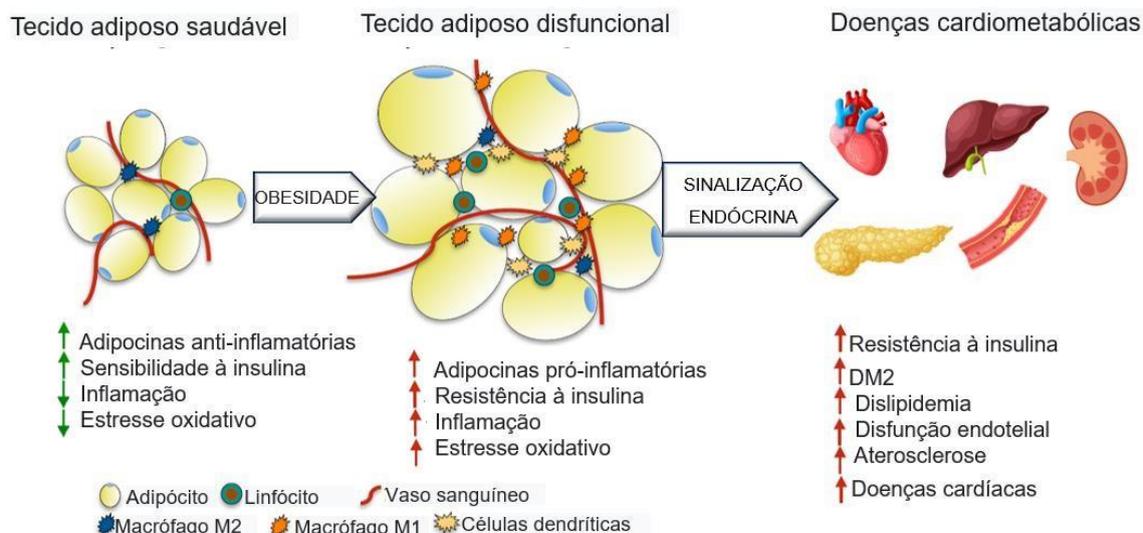


Existem quatro tipos de adipócitos: branco, rosa, bege e marrom. Eles apresentam diferenças anatômicas e metabólicas. Adaptado de CORRÊA et al., 2019.

Com a hipertrofia do adipócito branco, ocorre um aumento significativo da liberação de leptina que, em condições fisiológicas, exerce função de reduzir o apetite e aumentar o metabolismo basal. Entretanto, com a hiperleptinemia, ocorre a diminuição de sua sensibilidade no núcleo arqueado no hipotálamo (local responsável pela saciedade), porém nas áreas hipotalâmicas ventromedial e dorsomedial, que levam ao aumento da atividade simpática, não ocorrem alterações, levando o indivíduo a ter sua saciedade reduzida e atividade simpática aumentada (AKANJI, 2020; DE COURTEN et al., 1997; CORRÊA et al., 2019).

A leptina é uma citocina pró-inflamatória chave no aparecimento das comorbidades da obesidade, ela ativa monócitos, leucócitos e macrófagos para produzir IL-6, TNF α e IL-12. Esse aumentando na liberação de sinalizadores pró-inflamatórios causa um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e respostas migratórias em monócitos e macrófagos. Promove também o aumento da atividade do sistema nervoso simpático que tem como consequência o aumento no débito cardíaco e da resistência vascular periférica, levando ao aumento da pressão arterial (FEIJÓO-BANDÍN et al., 2020).

A inflamação é uma característica presente em indivíduos obesos. Em condições normais, os adipócitos brancos liberam citocinas anti-inflamatórias como a adiponectina, interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento beta (TGF- β), entre outros, que levam a um efeito cardioprotetivo. Porém, a secreção alterada de fatores derivados do tecido adiposo, devido à sua disfunção, afeta não apenas o próprio tecido adiposo, como também outros fatores metabólicos. Citocinas pró-inflamatórias, liberadas pelo adipócito hipertrófiado, como TNF α , IL6, IL1 β , resistina, MCP1 apresentam um potencialmente papel aterogênico (FIGURA 4) (BAYS, 2014; FEIJÓO-BANDÍN et al., 2020).

FIGURA 4. Alterações do tecido adiposo branco na obesidade.

Na obesidade, ocorre a hipertrofia dos adipócitos e infiltração de células imunes que vão levar a produção irregular de adipocinas. O tecido adiposo disfuncional leva a um estado de inflamação crônica de baixo grau devido à produção alterada de adipocinas/citocinas, que são secretadas na corrente sanguínea e atingem outros tecidos, afetando sua biologia de maneira parácrina ou endócrina. Adaptado de Fonte: FEIJÓO-BANDÍN et al., 2020.

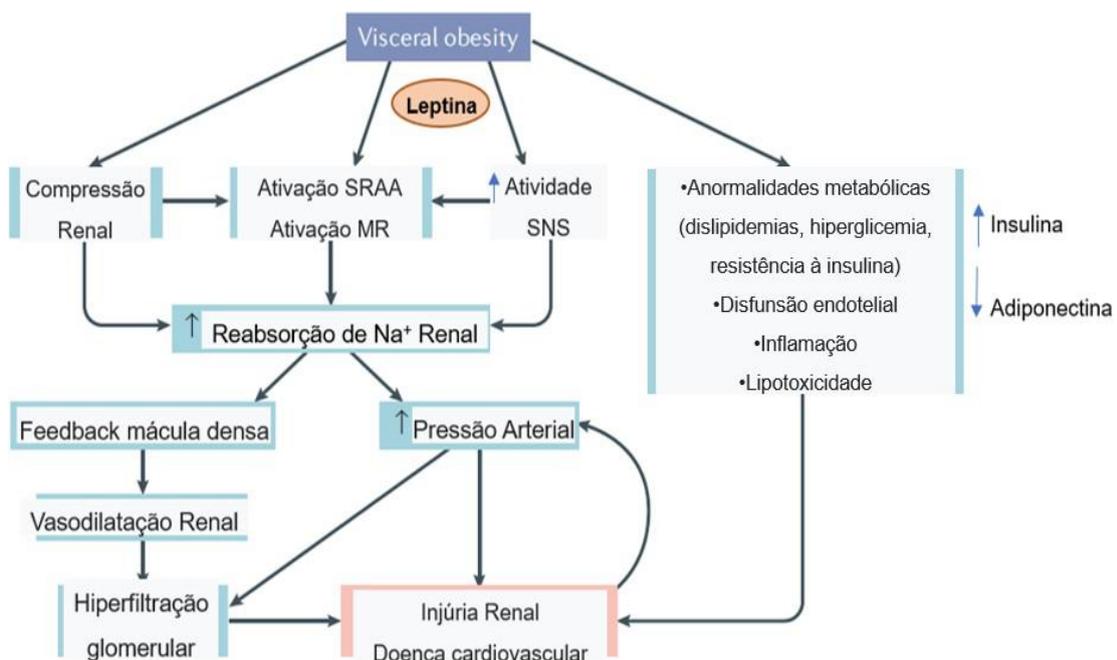
1.4- ALTERAÇÕES DO SRAA NA OBESIDADE

O SRAA é um dos mais relevantes sistemas hormonais do organismo por controlar o balanço eletrolítico, os volumes dos líquidos corporais e a pressão arterial (HALL et al., 2019). Este sistema é composto por diversas enzimas e vários peptídeos, que podem ser ou não bioativos. Este sistema pode ser encontrado de forma sistêmica ou local. De forma sistêmica o SRAA se inicia com a liberação de renina pelo rim, que reage com o angiotensinogênio, uma α 2-globulina produzida no fígado, formando um decapeptídeo com poucas ações fisiológicas, a angiotensina I (Ang I). Este é convertido pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo fisiologicamente ativo, a angiotensina II (Ang II). A ECA existente na superfície luminal do endotélio vascular, sendo muito abundante no endotélio pulmonar. A ECA renal (particularmente a do endotélio das arteríolas aferente e eferente) pode produzir Ang II suficiente para exercer efeitos vasculares locais. Portanto, o rim recebe Ang II de duas fontes: de origem sistêmica, que chega da circulação geral, principalmente da região

pulmonar, e de origem local, formada a partir da conversão renal da Ang I sistêmica. A Ang II estimula a produção de aldosterona pelo córtex da glândula suprarrenal (BELO et al., 2014).

A Ang II, pode promover vários efeitos no organismo, os principais são vasoconstrição, proliferação/hipertrofia celular e aumento da reabsorção renal de sódio (BELO et al., 2014; ZINGERMAN et al., 2015). Este peptídeo está diretamente relacionado ao aumento da pressão arterial sistêmica, contribuindo para a homeostase cardiovascular e pressão arterial em situações em que a secreção de renina está elevada (HALL et al., 2019). O aparecimento da hipertensão arterial associada a obesidade é em grande parte atribuído à hiperatividade do SRAA. O aumento da atividade simpática leva a uma ativação deste sistema, levando o obeso a ter grande probabilidade de ser hipertenso e de apresentar um status inflamatório de baixa intensidade constitutivo (FIGURA 5) (MORALES et al., 2009; HALL et al., 2019).

FIGURA 5. Mecanismos da hipertensão arterial associada a obesidade e suas comorbidades.



A obesidade visceral causa o aumento da atividade simpática, aumento da atividade do SRAA e compressão renal, estes fatores levam ao aumento reabsorção renal de Na⁺ e o aumento da

pressão arterial. Estes fatores mais as alterações metabólicas promovem injúria renal e doenças cardiovasculares. Adaptado de HALL et al., 2019.

As anormalidades metabólicas causadas pela obesidade interagem sinergicamente com a hipertensão arterial, causando lesão renal e doenças cardiovasculares. O aumento da atividade simpática estimula a reabsorção tubular renal de sódio direta e indiretamente, estimulando a liberação de renina, que ativa o SRAA. A compressão renal também pode aumentar a reabsorção de sódio por reduzir a perfusão no órgão e estimular a liberação de renina. Esta ativação leva ao aumento da formação de angiotensina II e aldosterona, que estimulam a reabsorção tubular renal de sódio. Mecanismos independentes da aldosterona também podem contribuir para a ativação do receptor de mineralocorticoide (MR) tubular renal e aumento da reabsorção de sódio. O aumento da reabsorção renal de sódio leva à vasodilatação renal compensatória que, em combinação com o aumento da pressão arterial, inicialmente causa aumento da pressão hidrostática glomerular e hiperfiltração glomerular, o que pode exacerbar ainda mais a lesão renal (HALL et al., 2019).

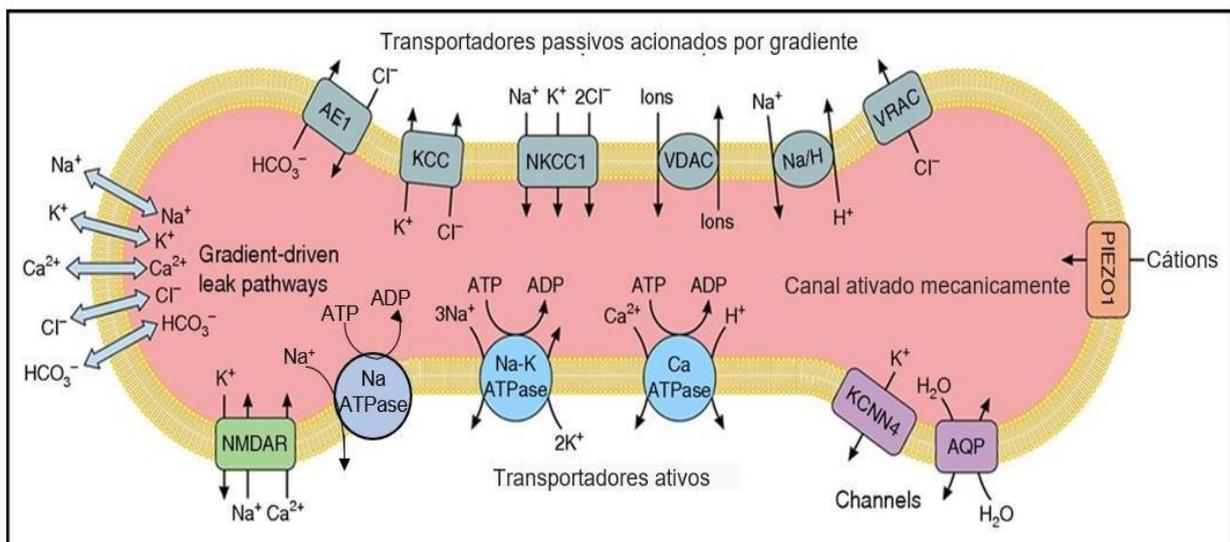
1.5- Ca²⁺-ATPase

O íon Ca²⁺ é uma molécula sinalizadora universal, sendo responsável por regular funções que vão desde a embriogênese até a morte celular. Alterações tênues nas concentrações intracelulares de cálcio, estão relacionadas a diversas patologias, que vão da insuficiência cardíaca até o câncer (KARLSTAD et al., 2012). O cálcio é armazenado na maioria das células, nos retículos endoplasmático (RE) e sarcoplasmático (RS) e nas mitocôndrias (através de canais aniônicos) (LYTTON et al., 1992).

Os eritrócitos não apresentam retículos, sendo a concentração do Ca²⁺ intracelular controlada pela atividade de canais de Ca²⁺ e pela Ca²⁺-ATPase que se encontram na membrana plasmática (FIGURA 6). Esta ATPase vai bombear Ca²⁺ contra seu gradiente eletroquímico, para o meio externo da célula, reduzindo sua concentração intracelular (MAURYA et al., 2013). O Ca²⁺ pode se ligar a diferentes proteínas, modulando sua atividade e/ou sinalizando para

diversas funções celulares. Um destes exemplos é a ativação da PKC, que está envolvida, dentre outras funções, na modulação do transporte iônico e contração muscular (BERRIDGE et al., 2000). A bomba de cálcio do retículo endossarcoplasmático (SERCA) bombeia cálcio para o retículo endoplasmático e sarcoplasmático (LYTTON et al., 1992). É uma ATPase que desempenha um papel na sinalização e na homeostase do cálcio intracelular (FISHER et al., 2021), sendo regulada pela calmodulina (CaM), proteínas quinases A e C (COLINA et al., 2002). Já a da membrana plasmática (PMCA) tem alta afinidade por cálcio e baixa capacidade de transporte, apresentando um importante papel no ajuste fino das concentrações intracelulares de cálcio (DONNET et al., 1994; REDDY et al., 1999; CORRADI et al., 2021). Essa bomba é eficaz na regulação fina das concentrações de Ca^{2+} intracelular, transportando Ca^{2+} para o meio externo, mantendo o Ca^{2+} citosólico em baixas concentrações (SORIN et al., 1997; DÜRR et al., 1998).

FIGURA 6. Modelo de transporte iônico no eritrócito.



Os eritrócitos apresentam uma grande gama de transportadores iônicos que incluem transportadores passivos e transportadores ativos. As ATPases encontradas no eritrócito são: a Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase e a Na^{+} -ATPase. Adaptado de Gallagher (2017).

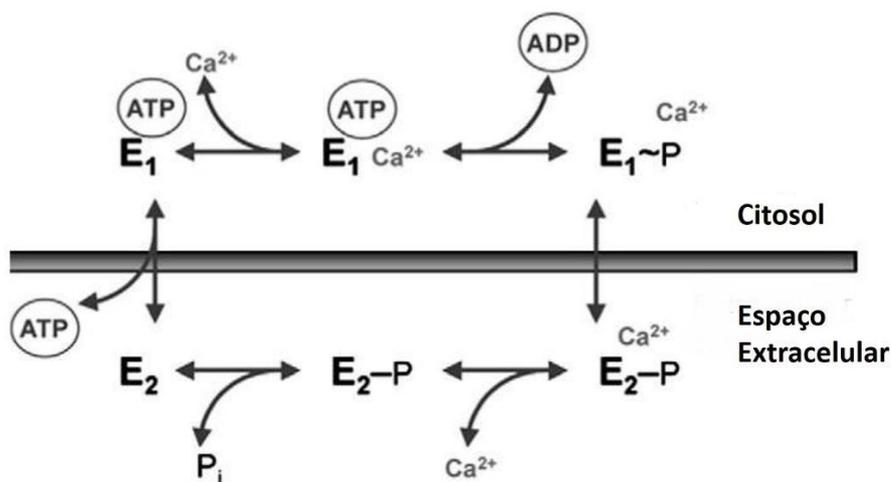
Outras proteínas como os trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ (NCKX) utilizam o gradiente eletroquímico de Na^+ , por meio da membrana plasmática para trocar um íon Ca^{2+} por três íons de Na^+ ou cotransporte de um Ca^{2+} com um íon K^+ para fora da célula para quatro íons Na^+ na célula (GUERINI et al., 2005). Esses trocadores com baixa afinidade e alta capacidade podem realizar ajustes rápidos na concentração de Ca^{2+} intracelular e, com isso, complementar o transporte feito pela PMCA para liberação de cálcio para fora da célula (BRINI et al., 2011).

Alterações nas concentrações Ca^{2+} estão relacionadas a uma gama diversificada de doenças, como por exemplo, a insuficiência cardíaca (MAKAREWICH et al., 2018). Havendo uma sobrecarga de Ca^{2+} no meio intracelular que ocorre em sua grande maioria através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, por meio do acúmulo de Na^+ intracelular, levando assim a uma lesão miocárdica (ZAID et al., 2002; PANDEY et al., 2013). Em músculo cardíaco, a atividade da SERCA pode ser modulada por fosfolambam (PLB) e PKA. Quando se forma o complexo PLB-SERCA, ocorre inibição da mesma. Entretanto, com a fosforilação de PLB por PKA, esse complexo se desfaz e SERCA é ativada (MAKAREWICH et al., 2018; FISHER et al., 2021). A PKA tem o importante papel de fosforilar a PLB, aumentando assim, a afinidade pelo Ca^{2+} (REDDY et al., 1999). A calmodulina quando associada ao Ca^{2+} , possui a capacidade de auxiliar em determinadas vias de fosforilação como no caso da CaMK. Quando a calmodulina está associada ao Ca^{2+} se liga à CaMK e as proteínas autoinibitórias ligadas a ela, se desligam permitindo que a CaMK se ative por autofosforilação revertendo a inibição de PLB (DOBREV et al., 2010).

O processo de transporte de uma Ca^{2+} -ATPase é baseado no esquema Albers-Post, ou seja, E_1 (ligado a Ca^{2+}) – E_2 (sem de Ca^{2+}) (POST et al., 1972), sendo um modelo do ciclo catalítico de ATPases do tipo P (acoplam o transporte de íons e a hidrólise de ATP) (VANDECAETSBECK et al., 2009). Neste modelo, a ATPase possui dois estados conformacionais, o E_1 e E_2 , com distintas afinidades para os íons transportados e com sítios de ligação dos íons para o lado do citoplasma ou extracelular. No decorrer do ciclo de catálise, a ATPase passa por reorganizações estruturais e transições entre os estados de E_1 e E_2

para assim efetuar o transporte do íon (ANDERSON et al., 2015; 2016). O ciclo se inicia na conformação E_1 , com ativação enzimática inicial pela ligação do íon Ca^{2+} do citosol, seguido de sua autofosforilação com ATP, formando um estado fosforilado de alta energia $E_1\sim P$. Uma transição conformacional do estado $E_1\sim P$ para o intermediário de fosfoenzima de energia menor $E_2\text{-}P$ que favorece a passagem de íons Ca^{2+} através da membrana e sua liberação para o meio extracelular com troca de prótons. A desfosforilação da fosfoenzima $E_2\text{-}P$ é seguida pela transferência de prótons para o lado citosólico, levando a transição conformacional de E_2 para E_1 , completando o ciclo de catálise e de transporte (FIGURA 7) (TOYOSHIMA et al., 2008; KREBS, 2022).

FIGURA 7. Ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase de membrana.



O ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase de membrana se inicia na conformação E_1 , com a ligação do ATP e Ca^{2+} , ocorre a hidrólise do ATP e a enzima forma um estado fosforilado de alta energia ($E_1\sim P$), que favorece a saída de cálcio para o meio extracelular. A partir daí é formado o estado $E_2\text{-}P$, de baixa energia e o Ca^{2+} e o fosfato são liberados (Retirado de Krebs, 2022).

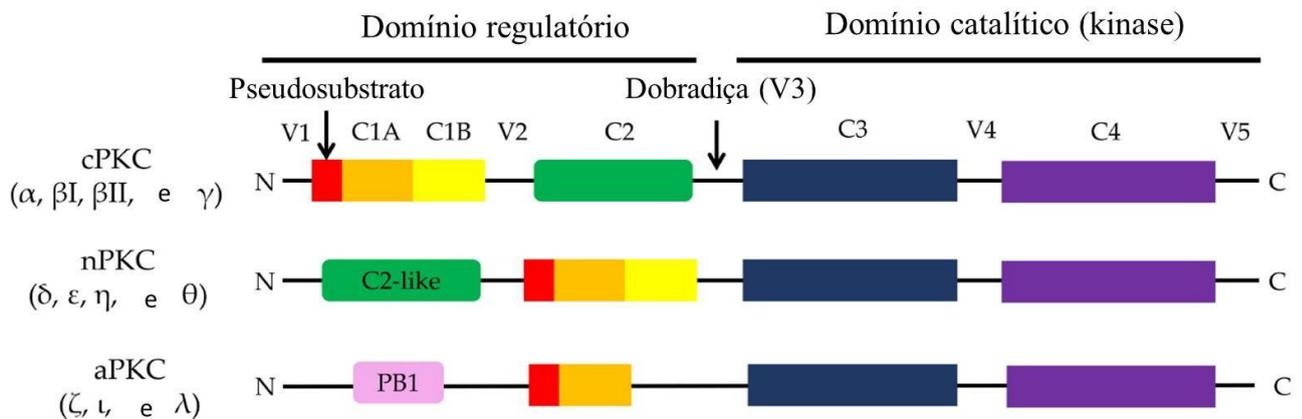
1.6 - PKC: ESTRUTURA E FUNÇÃO

As proteínas kinase dependente de cálcio (PKC) constituem uma família de serina/treonina kinases dependentes de fosfolípídeos que são divididas em

três subfamílias com base em sua estrutura e ativação: convencionais ou clássicas (cPKCs; α , β I, β II e γ), noveis (nPKCs; δ , ϵ , η e θ) e atípicas (aPKCs; ζ , ι e λ) (FIGURA 8) (KAWANO et al., 2021). O grupo das cPKC são ativadas por diacilglicerol (DAG), que se liga no domínio C1 e por Ca^{2+} que se liga no domínio C2 (FIGURA 8). As isoformas do grupo das nPKC são ativadas por DAG, de forma semelhante às cPKCs, porém não dependem de Ca^{2+} para serem ativadas. O grupo das aPKCs não dependem de Ca^{2+} ou DAG e podem ser ativadas por lipídios como ácido araquidônico, ceramida e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (SINGH et al., 2017).

As PKCs são proteínas kinases envolvidas em diversas funções celulares que controlam a transdução de sinais, podem alterar a proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, invasão, migração e apoptose (SINGH et al., 2021). A existência de uma PKC foi descrita pela primeira vez em 1977 por INOUE e Colaboradores (INOUE et al., 1977). Eles verificaram que ocorria fosforilação de histonas de cérebro de ratos na ausência de AMPc (ativador da PKA) e na presença de Ca^{2+} . Hoje está bem estabelecido, como mencionado anteriormente, que existem diferentes isoformas de PKCs e que sua ativação pode ocorrer de diferentes formas. Elas estão envolvidas em diferentes vias de sinalização ativadas por diferentes hormônios, dentre eles, está a Ang II (ROSSE et al., 2010; RINGVOLD & KHALIL, 2017).

A atividade das diferentes isoformas de PKC podem ser alteradas por diversos fatores, estes incluem modificação de fosforilação e ou interação com outras proteínas (JAKEN & PARKER, 2000; ROSSE et al., 2010). Como pode ser visto na Figura 8, as PKCs possuem grandes diferenças estruturais em seus domínios regulatórios, porém seus domínios catalíticos são bem conservados, permitindo que a ativação das diferentes isoformas ocorra de forma específica (espacial ou temporalmente), permitindo assim uma ativação sincronizada em locais diferentes no interior da célula (ROSSE et al., 2010).

FIGURA 8. Estrutura e isoformas de PKC.

O domínio regulatório de todas as PKCs inclui um domínio C1 com um motivo do pseudosubstrato. Adicionalmente, cPKCs (clássicas), nPKC (novel) e aPKCs (atípicas) têm um domínio C2 que se liga ao Ca²⁺, um domínio semelhante a C2 que não pode se ligar a Ca²⁺ e um PB1 domínio na região regulatória, respectivamente. Os domínios C3 e C4 de todas as PKCs se ligam ao ATP e ao substrato. Reproduzido de KAWANO et al., 2021.

Em várias patologias e em diferentes tecidos, tanto a atividade quanto a quantidade de PKCs podem estar alteradas (SILVA et al., 2014; SINGH et al., 2017). Assim, tornando as PKCs alvo de estudo, tanto para a aquisição de novos biomarcadores quanto para desvendar e controlar mecanismos de patologias como a obesidade e a hipertensão arterial.

As isoformas das diferentes famílias de PKC podem variar em diferentes células, no eritrócito são encontradas as isoformas ι , μ , α e ζ (GOVEKAR & ZINGDE, 2001). Apesar de apresentar 4 isoformas, apenas a α se encontra tanto no citosol quanto na membrana do eritrócito. Essa isoforma apresenta um papel importante no controle da estabilidade do citoesqueleto do eritrócito, sendo essencial para manter a estrutura desta célula (de OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, a PKC pode fosforilar a Ca²⁺-ATPase de membrana de eritrócito, promovendo o aumento de sua atividade (WANG et al., 1991).

2 - OBJETIVO GERAL

Verificar possíveis alterações na atividade da Ca^{2+} -ATPase e na quantidade de PKC α nas membranas de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso e utilizar estes parâmetros como possíveis biomarcadores das modificações metabólicas geradas pela obesidade.

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar as variáveis antropométricas dos indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Determinar o perfil bioquímico dos indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Verificar a atividade da ATPase transportadora de Ca^{2+} de eritrócitos de indivíduos com sobrepeso, obesos e eutróficos;
- Comparar a quantidade de PKC α s nas membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

3 – METODOLOGIA

3.1 - CASUÍSTICA

A amostra foi constituída por funcionários e estudantes da Unigranrio, classificados de acordo com o IMC em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. Estes indivíduos participaram de forma voluntária e foram incluídos ou não, de acordo com critérios de inclusão e exclusão (listados abaixo). Os indivíduos selecionados foram informados sobre o projeto e concordaram em participar do estudo. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (todos os procedimentos realizados nesta dissertação foram aprovados pelo Comitê de Ética da Unigranrio - CAAE - 07963219.5.0000.5283). Foram incluídos 40 indivíduos e distribuídos de acordo com o IMC (12 eutróficos, 16 sobrepesos e 12 obesos).

Os Critérios de Inclusão para esse estudo foram: Indivíduos adultos de 18 a 50 anos de idade, sem distinção de sexo e etnia; ser capaz de ler, compreender e assinar o TCLE.

Foram excluídos os participantes que apresentavam: Hipertensão arterial, DM2, nefropatias, endocrinopatias, neoplasias, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doenças hematológicas, doenças psiquiátricas e intestinais; indivíduos que utilizavam fármacos que interferem no peso corporal, no metabolismo de carboidratos e lipídeos, hipotensores, gestantes e lactantes e indivíduos que fazem uso de substâncias ilícitas.

3.2 – AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

O peso corporal dos indivíduos foi aferido em balança antropométrica e a altura medida em um estadiômetro. A partir destas medidas, foi calculado o IMC para classificação e inclusão nos respectivos grupos.

A relação da circunferência da cintura (CC) com a do quadril (CQ) foi calculado a partir das medidas realizadas com fita métrica metálica, graduada em centímetros, com o indivíduo de pé. A CC e a CQ foram medidas, respectivamente, no ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal e na maior circunferência das nádegas.

3.3 - DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL (PA)

A PA foi aferida pelo método oscilométrico, utilizando um monitor automático da marca OMRON, que possui manguitos adequados à circunferência do braço dos voluntários. Os registros foram realizados três vezes (com intervalos de 3 min), com os voluntários sentados, após 5 min de repouso. Foram descartados valores que apresentaram diferenças acima de 10 mmHg na PA sistólica e 5 mmHg na PA diastólica.

3.4 – COLETA DE SANGUE E ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Foram coletados 25 ml de sangue periférico após 12h de jejum, para realização das análises bioquímicas (10 ml) e para obtenção das membranas de eritrócitos para medir a atividade da Ca^{2+} ATPase (15 ml).

As análises bioquímicas foram realizadas em parceria com o LABORAFE (Laboratório de Análises Clínicas da Unigranrio). Dentre as análises bioquímicas foram avaliadas:

- Glicemia de Jejum: pelo método enzimático, amostra coletada em tubos sem anticoagulantes, centrifugadas imediatamente após a coleta. Valores expressos em mg/dL e baseados nos valores de referência fixados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2017), em que: normoglicemia < 99 mg/dL, pré-diabetes: ≥ 100 , < 126 mg/dL diabetes estabelecido \geq ;

- Insulina: determinada pelo método de quimioluminescência, valores expressos em mcUI/mL, os valores de referência para insulinemia ideal estão entre: 1,90 a 23 mcUI/mL;
- Índice de resistência à insulina: determinado pela aplicação da fórmula do HOMA-IR (homeostasis model assessment- insulin resistance), em que a resistência é determinada pelo produto da insulinemia ($\mu\text{U/mL}$) e pela glicemia em jejum (mg/dL), dividido por 22,5. A RI é determinada pelo HOMA-IR $\geq 2,71$, de acordo com o observado na amostra da população brasileira de origem multiétnica.
- Perfil lipídico: composto por colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C) e triglicerídeos (TG), determinados pelo método enzimático colorimétrico. O LDL – colesterol (LDL-C) foi estimado pela fórmula de Friedwald. Os valores de referência adotados foram baseados nas Novas Metas de Colesterol da Diretriz de Dislipidemia da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2017) para adultos com idade > 20 anos, onde os valores de referência são: CT < 190 mg/dL, HDL-c > 40 mg/dL, triglicerídeos < 150 mg/dL. Os valores do LDL colesterol variam de acordo com o risco cardiovascular estimado, em que: < 130 mg/dL risco baixo, < 100 mg/dL risco intermediário, < 70 mg/dL risco alto, < 50 mg/dL risco muito alto.

3.5 – OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS DE ERITRÓCITOS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA Ca^{2+} -ATPase

As membranas de eritrócitos para o estudo da atividade da Ca^{2+} -ATPase e comparação das quantidades de PKC foram obtidas como descrito por Namazi et al., (2015). Foram coletados 15 ml de sangue periférico em tubos contendo EDTA e centrifugados em centrífuga clínica por 10 min a $2500 \times g$, para separar as células sanguíneas do plasma. Após separar os eritrócitos, eles foram hemolisados em uma solução contendo 10 mM de TrisHCl e 1 mM de EDTA (pH 7,4). Após a hemólise dos eritrócitos, as membranas foram precipitadas com uma centrifugação a $12.000 \times g$ por 30 min. Depois de precipitadas, as

membranas foram lavadas 3 vezes em uma solução contendo TrisHCl (10 mM, pH 7,4) para retirar a hemoglobina. Após a última centrifugação, as membranas foram resuspendidas em 1 ml de sacarose (250 mM) e armazenadas em freezer a -80°C. A concentração de proteínas contidas nas membranas foi medida a partir do método de Lowry (1951).

A atividade da Ca²⁺-ATPase foi mensurada a partir da quantificação do fosfato inorgânico liberado após a hidrólise do ATP (SILVA et al., 2014). A reação foi iniciada com a adição de 5 mM de ATP e ocorreu em meio contendo: HEPES-Tris (50 mM, pH 7.0), EDTA (200 µM), MgCl₂ (5 mM), NaCl (120 mM), ouabaína (2 mM). A atividade foi calculada a partir do delta entre a atividade na presença de 200 µM de cálcio livre (calculado a partir do programa Mcalc) e na presença de 2 mM de EGTA (quelante de Ca²⁺, essa quantidade é suficiente para quelar todo cálcio livre). Após 60 min, a reação de hidrólise do ATP foi parada pela adição de uma solução contendo carvão ativado e HCl (0,1 M).

3.6 - ELETROFORESE E IMUNODETECÇÃO

Para comparar a proporção de PKCs entre as membranas de eritrócitos dos indivíduos dos diferentes grupos, as proteínas foram separadas por peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com SDS, sendo colocado em cada poço 100 µg de proteína total. Após a separação das proteínas por peso molecular no gel, as mesmas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Essa membrana ficou imersa, durante 1 h, em leite desnatado (5 % em TBSt). Essa incubação é realizada para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo primário (anticorpo policlonal - PKCα (H-7), número de catálogo sc-8393 (Santa Cruz Biotechnology)) com outras sequências de aminoácidos semelhantes em outras proteínas. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 h com anticorpo primário (PKCα) em diluição de 1:500 e após, foi lavada com TBSt (3 vezes por 5 min) e incubada com o anticorpo secundário (anti-Rabbit - número de catálogo: #31460 (Thermo Fisher Scientific)) (1:2500) por 1 h. Em uma câmara escura, a membrana foi incubada com ECL (substrato para a peroxidase acoplada ao anticorpo secundário), levando a produção de quimioluminescência nos locais onde estão localizados o anticorpo para PKCα.

Em contato o filme (Amersham Hyperfilm ECL – número de catálogo: 28906837), no local onde o anticorpo se localiza, ocorre a formação de uma banda escura, com intensidade dependente da quantidade de proteína. As bandas formadas, foram quantificadas a partir do Software ImageJ (versão 1.8.0).

3.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos e experimentais obtidos foram analisados com auxílio do pacote estatístico IBM-SPSS (versão 22, IBM Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As diferenças entre os grupos foram testadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Para verificar a correlação entre as atividades da Ca^{+2} -ATPase e as variáveis que caracterizam a obesidade e suas comorbidades, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Foram consideradas significativas, as diferenças que apresentassem $p < 0,05$. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão.

4 – RESULTADOS

A amostra do presente trabalho foi composta por 40 indivíduos, que foram classificados como eutróficos (n = 12), sobrepesos (n = 16) e obesos (n = 12) de acordo com o IMC. Na Tabela 1, são mostrados os parâmetros antropométricos e as médias das aferições da pressão arterial. Podemos verificar nesta tabela, que não existem diferenças significativas na PA sistólica (controle = $114,4 \pm 3,6$; sobrepeso = $112,8 \pm 1,6$; obeso = $122,2 \pm 4,0$ mmHg) e diastólica (controle = $72,3 \pm 3,5$; sobrepeso = $72,1 \pm 2,0$; obeso = $77,0 \pm 1,6$ mmHg) entre os grupos. Na Tabela 2, são mostrados os dados bioquímicos, obtidos a partir do plasma dos indivíduos que foram distribuídos nos três grupos. Podemos verificar nesta tabela, que os indivíduos obesos apresentaram um aumento significativo da insulina em relação aos indivíduos eutróficos (controle = $9,4 \pm 4,4$; sobrepeso = $11,9 \pm 2,3$; obeso = $17,6 \pm 2,7$ mcU/mL), como também, uma redução do HDL colesterol no grupo obeso em relação aos grupos eutrófico e sobrepeso (controle = $60,9 \pm 4,3$; sobrepeso = $54,9 \pm 3,4$; obeso = $44,0 \pm 2,5$ mg/dL).

Na Figura 9, podemos observar uma diminuição da atividade Ca^{2+} -ATPásica no grupo obeso em relação aos grupos eutrófico e sobrepeso (eutróficos = $28,8 \pm 4,6$; sobrepesos = $14,6 \pm 2,2$; obeso = $8,7 \pm 1,9$ nmol $P_i \times mg^{-1} \times h^{-1}$). Estes resultados mostram que a atividade da Ca^{2+} -ATPásica reduz a partir do aumento do IMC. Esta afirmação é comprovada na Figura 10, onde podemos observar uma forte correlação negativa entre o IMC e a atividade da Ca^{2+} -ATPase, pelo coeficiente de correlação de *Pearson* ($r = - 0,60$). Enquanto na Figura 11, se vê uma correlação leve entre a RCQ e a atividade da Ca^{2+} -ATPase ($r = - 0,16$).

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos.

| | Controle | Sobrepeso | Obeso |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| n | 12 | 16 | 12 |
| Sexo F/M | 10/2 | 11/5 | 7/5 |
| Peso corporal (kg) | $58,9 \pm 3,5^a$ | $77,5 \pm 2,1^b$ | $126,5 \pm 17,0^c$ |

| | | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Estatura (m) | 1,65 ± 0,02^a | 1,68 ± 0,02^a | 1,74 ± 0,03^b |
| Idade | 23 ± 1 | 26 ± 2 | 28 ± 5 |
| IMC (kg/m²) | 21,3 ± 0,8^a | 27,4 ± 0,4^b | 39,7 ± 4,4^c |
| Relação cintura/quadril (cm/cm) | 0,77 ± 0,02^a | 0,79 ± 0,02^a | 0,98 ± 0,04^b |
| PA sistólica (mm Hg) | 114,4 ± 3,6^a | 112,8 ± 1,6^a | 122,2 ± 4,0^a |
| PA diastólica (mm Hg) | 72,3 ± 3,5^a | 72,1 ± 2,0^a | 77,0 ± 1,6^a |

Dados demográficos e clínicos dos grupos controle, sobrepeso e obeso. Os resultados são mostrados como média e desvio padrão. As Letras diferentes representam diferença significativa em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

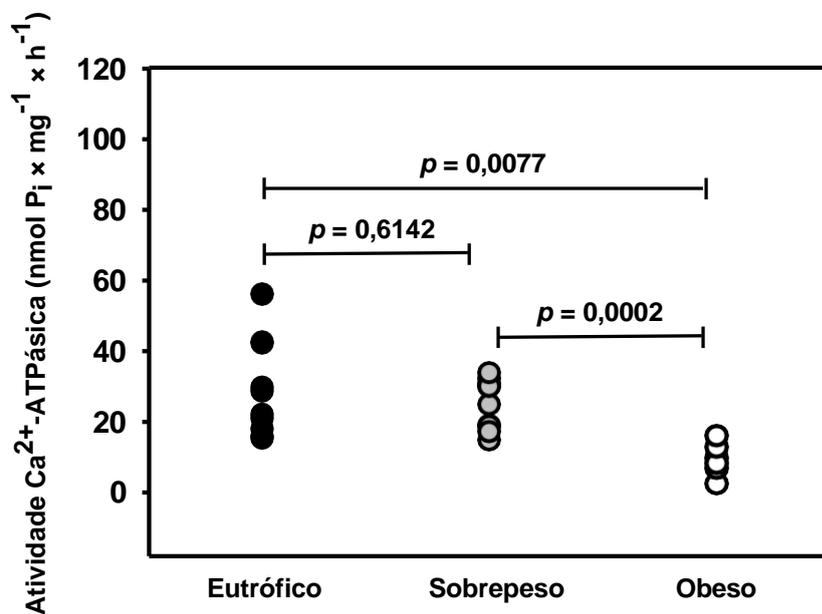
Tabela 2. Dados bioquímicos.

| | Controle | Sobrepeso | Obeso |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| N | 12 | 16 | 12 |
| Glicose (mg/dL) | 96,7 ± 5,2^a | 96,1 ± 1,3^a | 91,8 ± 2,7^a |
| Insulina (mcU/mL) | 9,4 ± 4,4^a | 11,9 ± 2,3^{ab} | 17,6 ± 2,7^b |
| HOMA-IR | 2,11 ± 0,36^a | 2,80 ± 0,54^a | 3,80 ± 0,52^b |
| TG (mg/dL) | 93,4 ± 13,5^a | 89,4 ± 9,2^a | 141,2 ± 20,5^a |
| CT (mg/dL) | 190,1 ± 11,1^a | 202,8 ± 16,0^a | 212,5 ± 12,7^a |
| HDL (mg/dL) | 60,9 ± 4,3^a | 54,9 ± 3,4^a | 44,0 ± 2,5^b |
| LDL (mg/dL) | 110,6 ± 10,1^a | 130,0 ± 16,0^a | 140,3 ± 11,6^a |
| Na⁺ Plasmático (mEq/L) | 139,9 ± 0,3^a | 141,1 ± 0,9^a | 140,5 ± 1,0^a |
| K⁺ Plasmático (mEq/L) | 4,4 ± 0,1^a | 4,4 ± 0,2^a | 4,5 ± 0,1^a |

Dados bioquímicos dos grupos controle, sobrepeso e obeso. Foram mensurados a glicose sanguínea, insulina, triglicédeos (TG), colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), sódio plasmático. A partir do colesterol total e do HDL, foi calculado a lipoproteína de baixa densidade. Com os resultados da mensuração de glicemia e insulinemia foi calculado o HOMA-IR (Modelo de Avaliação da Homeostase). Os resultados são mostrados como média e

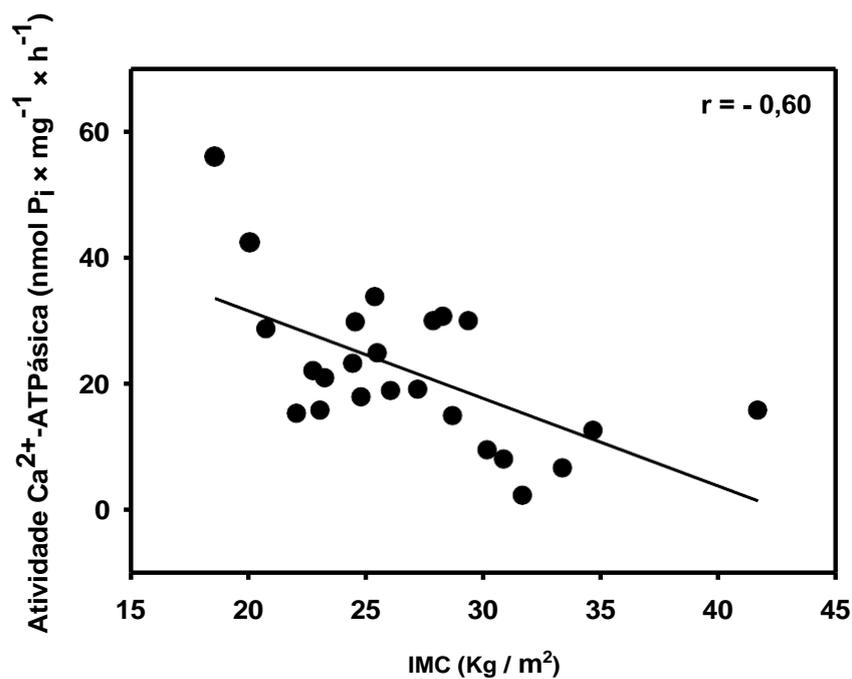
desvio padrão. As Letras diferentes representam diferença significativa em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

Figura 9: Atividade da Ca^{2+} -ATPase em membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.



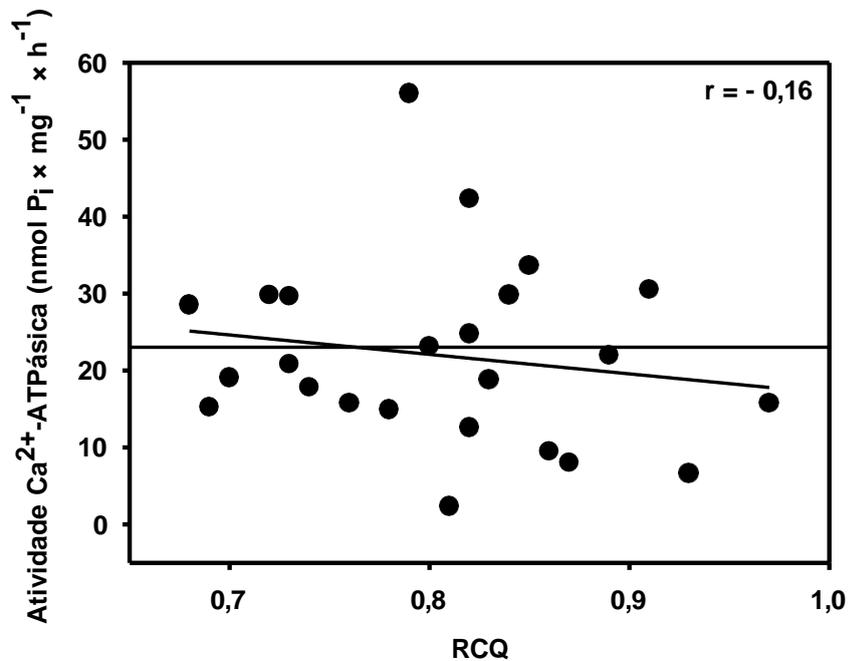
Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão ($n = 12-16$). Os valores de p são mostrados na figura e considerados significativos quando menores que 0,05.

Figura 10: Correlação entre a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membranas de eritrócitos e o IMC.



A correlação foi dada a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ($n = 40$).

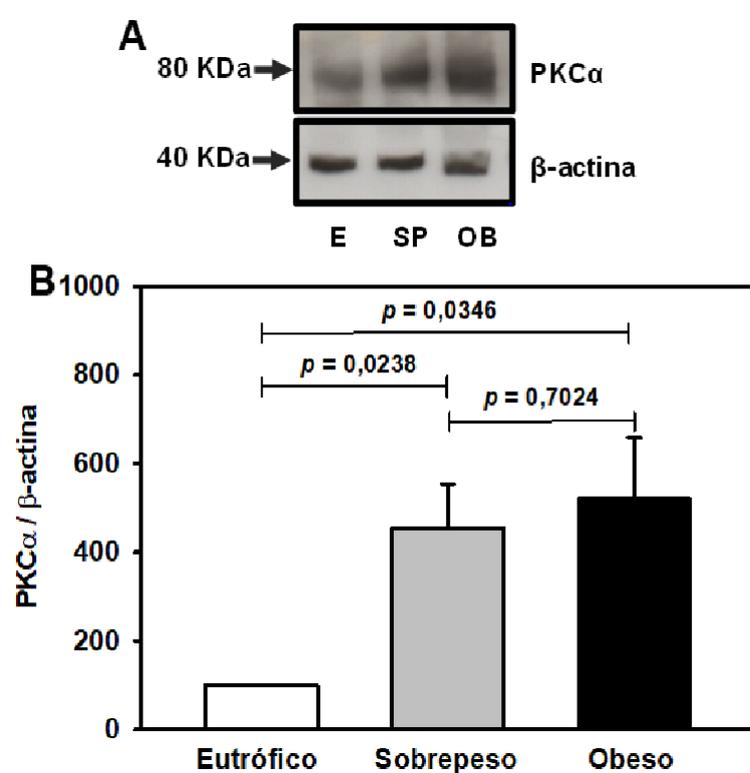
Figura 11: Correlação entre a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membranas de eritrócitos com o RCQ.



A correlação foi dada a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ($n = 40$).

Os resultados mostrados na Figura 12 apresentam os *imunoblottings* para PKC α (A) e suas quantificações (B). No painel A, podemos identificar um aumento da quantidade de PKC α nos grupos obeso e sobrepeso em relação ao grupo eutrófico. A Figura 12B mostra a quantificação das imunodeteccões de PKC α , mostrando um aumento de aproximadamente 6 vezes do grupo obeso em relação ao controle ($n = 3$).

Figura 12: Aumento do número de cópias de PKC α na obesidade e sobrepeso.



O Painel A, mostra uma imunodeteção da PKC α , representativa da média dos experimentos. A β -actina foi utilizada como controle de carregamento para quantificação das imunodeteções (Painel B). Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão ($n = 3$) (Painel B). Os valores de p são mostrados no gráfico e considerados significativos quando menores que 0,05.

5 – DISCUSSÃO

Nos dias atuais, a obesidade se tornou uma pandemia, resultando em gastos exorbitantes pelos sistemas de saúde pública (BAHIA et al., 2012; HALL et al., 2019; WHO 2022). Esses gastos são aumentados exponencialmente quando contabilizamos os tratamentos para as comorbidades atreladas a obesidade (BAHIA et al., 2012). As principais comorbidades são a DM2, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e renais (HALL et al., 2020).

Este trabalho teve como principal objetivo encontrar modificações na atividade da Ca^{2+} -ATPase e na quantidade de PKC α em membranas de eritrócitos de indivíduos com sobrepeso e obesidade. Estes parâmetros seriam importantes alvos a serem investigados para descoberta de novos biomarcadores, pois com as modificações hormonais e metabólicas geradas pelo sobrepeso e a obesidade, ocorrem mudanças no controle hidroeletrolítico sistêmico e conseqüentemente no eritrócito. Por isso, detectar modificações nos estágios iniciais da obesidade e suas comorbidades associadas, como a hipertensão arterial, são de extrema importância para realização de tratamento preventivo e controle da doença (CHOE et al., 2016).

Para classificar os indivíduos que participaram do estudo, em relação ao peso corporal, foi utilizado o IMC. Entretanto, essa medida não mostra a localização específica de uma possível acumulação do tecido adiposo e esse é um fator de extrema importância, pois o acúmulo deste tecido na região abdominal é um dos maiores indicativos para as modificações deletérias causadas pela obesidade e suas comorbidades (FARB & GOKCE, 2015). Estes fatores nos levaram a utilizar como método complementar o RCQ, pois é uma medida que expressa com maior confiabilidade a adiposidade na região abdominal, que indica o acúmulo de gordura visceral. Valores elevados de RCQ estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e outras comorbidades (VALDEZ, 1991; MICHEL et al., 2023). Na Tabela 1, podemos verificar que os indivíduos obesos apresentaram um aumento significativo na RCQ em relação ao grupo eutrófico (Eutróficos = $0,77 \pm 0,02$; Obesos $0,98 \pm 0,04$ cm/cm). Em homens, este índice acima de 0,90 e mulheres acima de 0,85 cm indica um alto risco de complicações metabólicas e

doenças cardiovasculares (WHO, 2008). Os resultados mostram tanto um aumento do IMC quando RCQ, indicando que os indivíduos do grupo de obesos apresentam risco metabólico e cardiovascular aumentados.

Uma das comorbidades mais vistas na obesidade é a hipertensão arterial, no Brasil, ela atinge em torno de 55% dos obesos. Quando separamos estes dados por idade, verificamos que os percentuais são bem diferentes, os jovens com idade entre 18 e 24 anos, atingem um percentual de aproximadamente 30%, enquanto os idosos (com 65 ou mais anos) apresentam um percentual de aproximadamente 60% (VIGITEL, 2019). Os componentes principais da obesidade que levam ao desenvolvimento da hipertensão arterial são o aumento da atividade simpática e da ativação do SRAA, pois levam ao aumento da reabsorção renal de sódio e aumento da contratilidade dos vasos (JIANG et al., 2016). Apesar da grande probabilidade do desenvolvimento de hipertensão arterial, os indivíduos obesos e com sobrepeso não apresentaram aumento significativo da pressão arterial em relação aos indivíduos eutróficos (Tabela 1), este fato indicaria uma fase inicial da doença, onde suas comorbidades ainda não se desenvolveram totalmente, visto que a idade avançada é outro fator chave para o desenvolvimento da hipertensão arterial (OLIVEROS et al., 2020).

Mesmo não apresentando alterações na pressão arterial, os indivíduos obesos e com sobrepeso apresentam alterações metabólicas e hormonais importantes. Na Tabela 2, podemos observar que os indivíduos obesos apresentaram redução de HDL-c, aumento das concentrações de insulina, que se reflete no aumento significativo do HOMA-IR. Estas modificações são marcadores importantes para inferir o possível desenvolvimento de doenças cardiovasculares, síndrome metabólica ou diabetes tipo 2 (ZORENA et al., 2020).

O aumento do HOMA-IR e a hiperinsulinemia, são os indicativos iniciais da falta de sensibilidade a insulina. Esta condição, tem como principal consequência o aumento da concentração de insulina para compensar a falta de sua sensibilidade. Os mecanismos que levam a falta de sensibilidade a insulina ainda não foram totalmente esclarecidos, mas podemos relacionar por exemplo,

a redução da oxidação de lipídios, de glicose e aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias (como a leptina) (ORMAZABAL et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, o SRAA é um importante sistema modulador do equilíbrio hidroeletrolítico e da pressão arterial e um de seus componentes mais importantes é a Ang II. Apesar de haverem vários peptídeos bioativos neste sistema, a Ang II, quando tem sua produção exacerbada, apresenta um papel de destaque na geração de várias patologias, como a hipertensão arterial, cardioremodelamento e doença renal crônica (Forrester et al., 2018). Outro fator importante é o desbalanço entre os receptores de Ang II, na obesidade e hipertensão arterial, em órgãos como rim e coração, na maioria dos trabalhos, é mostrado um aumento da quantidade de receptores AT₁ e redução de AT₂ (FORRESTER et al., 2018; HALL et al., 2019; BHULLAR & DHALLA, 2022). Com isso, ocorrerá o aumento da pressão arterial, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da inflamação e remodelamento tecidual. Classicamente, a principal via ligada ao AT₁R é a da PKC, esse achado é evidenciado principalmente em coração e rim (SILVA et al., 2014). Nos eritrócitos, as isoformas de PKC encontradas são a α e ζ , porém, apenas a isoforma α encontra-se na membrana ou é translocada para ela a partir de sua ativação por diacilglicerol (DAG) e Ca²⁺ (GOVEKAR & ZINGDE, 2001). A PKC pode modular a atividade da Ca²⁺-ATPase como também aumentar a estabilização entre citoesqueleto e a membrana do eritrócito (de OLIVEIRA et al., 2008).

Com o aumento do IMC, ocorreu uma diminuição gradativa da atividade da Ca²⁺-ATPase (FIGURA 8), essa diminuição vai causar, conseqüentemente, o aumento das concentrações intracelulares de Ca²⁺. Esse íon, é uma molécula de sinalização universal envolvida na regulação do ciclo celular, metabolismo, integridade estrutural, motilidade e volume do eritrócito (BOGDANOVA et al., 2013). Como outras células, os eritrócitos contam com sinalização dependente de Ca²⁺ para sua diferenciação. Os níveis intracelulares de Ca²⁺ nos eritrócitos circulantes participam não apenas do controle de propriedades biofísicas, como da composição lipídica da membrana, volume e propriedades reológicas, mas também parâmetros fisiológicos, como atividade metabólica, estado redox e

depuração celular (BERRIDGE et al., 2000). A Permeabilidade basal do Ca^{2+} é extremamente baixa na membrana dos eritrócitos humanos e a Ca^{2+} -ATPase é a principal moduladora de seus níveis intracelulares, mantendo seus níveis baixos no interior da célula (30 e 60 nM), enquanto no que no meio extracelular os níveis são de aproximadamente 1,8 mM. Então, a ativação da captação de Ca^{2+} e redução em sua extrusão tem um grande impacto em múltiplos processos, tornando o Ca^{2+} um regulador de máxima importância nos eritrócitos (BOGDANOVA et al., 2013). Com o mau funcionamento dos transportadores de Ca^{2+} e consequente acúmulo Ca^{2+} intracelular, pode entre várias modificações, promover a morte prematura da célula (REPSOLD & JOUBERT, 2018).

Estes resultados contribuem para o entendimento das modificações bioquímicas causadas pela obesidade e o sobrepeso nos eritrócitos. Entretanto, alguns experimentos devem ser realizados para esclarecer alguns pontos. O primeiro seria a realização de estudos funcionais de receptores AT_1 e AT_2 , com a utilização de antagonistas. Segundo ponto, mensuração da atividade da PKC e mensuração da atividade da Ca^{2+} -ATPase na presença do inibidor de PKC α . E o terceiro ponto seriam estudos funcionais dos eritrócitos dos indivíduos obesos e com sobrepeso com estresse osmótico.

6 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados, pode-se concluir que as alterações metabólicas e hormonais geradas pela obesidade e o sobrepeso modulam negativamente a atividade da Ca^{2+} -ATPase. O aumento da quantidade de PKC α pode estar relacionados a um possível aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelular. Outros experimentos envolvendo os componentes do SRAA e suas vias de sinalização intracelulares devem ser realizados para um melhor entendimento da modulação da Ca^{2+} -ATPase na obesidade. Possivelmente as alterações na atividade da Ca^{2+} -ATPase em eritrócitos, em conjunto com os parâmetros antropométricos, podem ser utilizadas como biomarcadores da obesidade e suas comorbidades.

7- REFERÊNCIAS

ANDERSON DM, Anderson KM, Chang CL, Makarewich CA, Nelson BR, McAnally JR, Kasaragod P, Shelton JM, Liou J, Bassel-Duby R, Olson EN. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*. 2015 Feb 12;160 (4): 595-606.

ANDERSON DM, Makarewich CA, Anderson KM, Shelton JM, Bezprozvannaya S, Bassel-Duby R, Olson EN. Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. *Sci Signal*. 2016 Dec 6;9(457): ra119.

ANDOLFI C, Fisichella PM. Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018 Aug;28 (8): 919-924.

ASSARI S, Bazargan M. Baseline Obesity Increases 25-Year Risk of Mortality due to Cerebrovascular Disease: Role of Race. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019; 16 (19): 3705.

BAHIA L, Coutinho ES, Barufaldi LA, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2012; 12: 440. Published 2012 Jun 18.

BAYS, H. Adiposopathy, "sick fat," Ockham's razor, and resolution of the obesity paradox. *Curr Atheroscler Rep*.; v. 16, p. 409, 2014.

BELO L, Nascimento H, Kohlova M, Bronze-da-Rocha E, Fernandes J, Costa E, Catarino C, Aires L, Mansilha HF, Rocha-Pereira P, Quintanilha A, Rêgo C, Santos-Silva A. Body fat percentage is a major determinant of total bilirubin independently of UGT1A1*28 polymorphism in young obese. *PLoS One*. 2014 Jun 5;9 (6): e98467.

BERRIDGE MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1 (1): 11-21.

BHULLAR SK, Dhalla NS. Angiotensin II-Induced Signal Transduction Mechanisms for Cardiac Hypertrophy. *Cells*. 2022; 11: 3336.

BOGDANOVA A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L. Calcium in Red Blood Cells—A Perilous Balance. *Int J Mol Sci.* 2013; 14: 9848- 9872.

BRINI M, Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3 (2): a004168. Published 2011 Feb 1.

CANNON B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; 84: 277 – 359.

CHOE, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. 2016. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7.

COLINA C, Cervino V, Benaim G. Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes. *Biochem J.* 2002 Feb 15;362 (Pt 1): 247-51.

CORRADI GR, Mazzitelli LR, Petrovich GD, de Tezanos Pinto F, Rochi L, Adamo HP. Plasma Membrane Ca^{2+} Pump PMCA4z Is More Active Than Splicing Variant PMCA4x. *Front Cell Neurosci.* 2021 Aug 26;15: 668371.

CORRÊA, L. H., et al. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, v. 8, p. 662, 2019.

DE COURTEN, M., et al. Hyperleptinaemia: the missing link in the metabolic syndrome? *Diabetic Med*; v. 14, p. 200-208, 1997.

DE OLIVEIRA S, Silva-Herdade S, Saldanha C. Modulation of erythrocyte deformability by PKC activity. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 39 (2008) 363–373.

DOBREV D, Wehrens XH. Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak, and atrial fibrillation. *Trends Cardiovasc Med.* 2010;20 (1): 30-34.

DONNET C, Caride AJ, Fernández HN, Rossi JP. Acetylation with succinimidyl acetate affects both the catalytic site and the regulation of the erythrocyte Ca²⁺ pump. *Biochem J.* 1994 Aug 15;302 (Pt 1) (Pt 1):133-40.

DÜRR G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK. The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell.* 1998 May;9 (5): 1149-62.

FARB, M. G., & Gokce, N. 2015. Visceral adiposopathy: a vascular perspective. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 21(2).

FEIJÓO-BANDÍN, S., et al. Adipokines and Inflammation: Focus on Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 20, p. 7711, 2020.

FISHER ME, Bovo E, Aguayo-Ortiz R, Cho EE, Pribadi MP, Dalton MP, Rathod N, Lemieux MJ, Espinoza-Fonseca LM, Robia SL, Zima AV, Young HS. Dwarf open reading frame (DWORF) is a direct activator of the sarcoplasmic reticulum calcium pump SERCA. *Elife.* 2021 Jun 2;10: e65545.

FORRESTER ST, George W. Booz, Curt D. Sigmund, Thomas M. Coffman, Tatsuo Kawai, Victor Rizzo, Rosario Scalia, Satoru Eguchi. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018; 98: 1627–1738.

FRAYN, K. N., Coppack S. W., and Potts J. L. 1992. Effect of diet on human adipose tissue metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 51:409–418.

GALLAGHER, P. G. 2017. Disorders of erythrocyte hydration. *Blood*, 130: 2699–2708.

GIBSON GJ. Obesity, respiratory function and breathlessness. *Thorax.* 2000; 55 Suppl 1(Suppl 1): S41-S44.

GOLIK, A., et al. Erythrocyte Na⁺, K⁺ and Ca²⁺, Mg (2⁺)-ATPase activities in hypertensives on angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Clin Biochem*; v, 29, n.3, p. 249-54, 1996.

GOVEKAR RB, Zingde SM. Protein kinase C isoforms in human erythrocytes. *Ann Hematol.* 80:531–534, 2001.

GUERINI D, Coletto L, Carafoli E. Exporting calcium from cells. *Cell Calcium.* 2005 Sep-Oct;38 (3-4): 281-9.

HALL, J. E, et al. Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links. *Nat Rev Nephrol.*; v. 15, p. 367–385, 2019.

HALL, J. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Wang, Z., & Hall, M. E. (2019). Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links. *Nature Reviews Nephrology.*

HERDY SP. ATPases de túbulos proximais renais ensaiadas "in vitro" na presença de Mg²⁺ e Ca²⁺: relação com alterações na reabsorção de Na⁺ e água na hipertensão arterial associada à obesidade. 2022. Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) - Universidade do Grande Rio.

HILL AA, Reid Bolus W, Hasty AH. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol Rev.* 2014 Nov;262 (1): 134-52.

IBGE – Pesquisa Nacional de Saúde – Acessado em: 8 de janeiro de 2020.

IBGE – Pesquisa Nacional de Saúde – publicado em 21/10/2020. Acessado em: 28 de dezembro de 2020.

INOUE, M.; Kishimoto, A.; Takai, Y.; Nishizuka, Y. 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem*, 252, 7610-6.

JAKEN, S.; Parker, P.J. 2000. Protein kinase C binding partners. *Bioessays*, 22, 245-54.

JIANG, S.-Z., Lu, W., Zong, X.-F., Ruan, H.-Y., & Liu, Y. 2016. Obesity and hypertension. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12 (4), 2395–2399.

KARLSTAD J, Sun Y, Singh BB. Ca (2+) signaling: an outlook on the characterization of Ca (2+) channels and their importance in cellular functions. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 740:143-157.

KAWANO T, Inokuchi J, Eto M, Murata M, Kang J. 2021. *Pharmaceutics*. 13: 1748.

KREBS J. 2022. Structure, Function and Regulation of the Plasma Membrane Calcium Pump in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 18; 23: 1027.

LU SC, Akanji AO. Leptin, Obesity, and Hypertension: A Review of Pathogenetic Mechanisms. *Metab Syndr Relat Disord*. 2020 Nov; 18 (9): 399-405.

LYTTON J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*. 1992 Jul 15;267 (20): 14483-9.

LUZES, R., et al. Angiotensin-(3–4) normalizes blood pressure, decreases Na⁺ and energy intake, but preserves urinary Na⁺ excretion in overweight hypertensive rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* Volume 1867, Issue 3, 1, 2021.

MAGKOS F, Fraterrigo G, Yoshino J, Luecking C, Kirbach K, Kelly SC, de Las Fuentes L, He S, Okunade AL, Patterson BW, Klein S. Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metab*. 2016 Apr 12;23 (4): 591-601.

MAKAREWICH CA, Munir AZ, Schiattarella GG, Bezprozvannaya S, Raguimova ON, Cho EE, Vidal AH, Robia SL, Bassel-Duby R, Olson EN. The DWORF micropeptide enhances contractility and prevents heart failure in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Elife*. 2018 Oct 9;7: e38319.

MAURYA PK, Prakash S. Decreased activity of Ca (++) -ATPase and Na (+) /K (+) -ATPase during aging in humans. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 May;170 (1):131-7.

MICHEL S, Linder N, Linder A, Eggebrecht T, Schaudinn A, Blüher M, Dietrich A, Denecke T, Busse H. 2023. Anthropometric estimators of abdominal fat volume in adults with overweight and obesity. *Int J Obes (Lond)*; 47: 306–312.

MORALES E, Huerta A, Gutiérrez E, Gutiérrez Solís E, Segura J, Praga M. Efecto antiproteinúrico del bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) en los pacientes obesos. ¿Cuál es la opción terapéutica más eficaz? [The antiproteinuric effect of the blockage of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in obese patients. Which treatment option is the most effective?]. *Nefrologia.* 2009;29 (5): 421-9. Spanish.

NAMAZI G, Jamshidi S, Ahmad R, Attar M, Sarrafzadegan N, Sadeghi M, Naderi C, Pourfarzam M. Increased membrane lipid peroxidation and decreased Na⁺/K⁺-ATPase activity in erythrocytes of patients with stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2015; 26 (3): 239-44.

OLIVEROS E, Patel H, Kyung S, Fugar S, Goldberg A, Madan N, Williams KA. Hypertension in older adults: Assessment, management, and challenges. *Clinical Cardiology.* 2020; 43:99–107.

Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., & Zuñiga, F. A. 2018. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1).

OYARZUN G, Manuel. Función respiratoria en la senectud. *Rev. méd. Chile*, Santiago, v. 137, n. 3, p. 411-418, marzo 2009. Acessado em: 23 de janeiro de 2021.

PANDEY KB, Jha R, Rizvi SI. Erythrocyte membrane transporters during human ageing: modulatory role of tea catechins. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013 Feb;40 (2): 83-9.

POEKES L, Lanthier N, Leclercq IA (2015) Brown adipose tissue: A potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 129:933–949.

POLEDNAK AP. Estimating the number of U.S. incident cancers attributable to obesity and the impact on temporal trends in incidence rates for obesity-related cancers. *Cancer Detect Prev.* 2008; 32 (3): 190-9.

POST RL, Hegyvary C, Kume S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem.* 1972 Oct 25;247 (20): 6530-40.

REDDY LG, Shi Y, Kutchai H, Filoteo AG, Penniston JT, Thomas DD. An autoinhibitory peptide from the erythrocyte Ca-ATPase aggregates and inhibits both muscle Ca-ATPase isoforms. *Biophys J.* 1999 Jun;76 (6): 3058-65.

REPSOLD L, Joubert AM. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *Biomed Res Int.* 2018 Jan 3; 2018: 9405617.

RINGVOLD HC & Khalil RA. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. *Adv Pharmacol.* 2017; 78: 203–301.

ROSSE, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J. M., Boeckeler, K., & Parker, P. J. 2010. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), 103–112.

SANTOS, Vanessa Ribeiro dos et al. Obesity, sarcopenia, sarcopenic obesity and reduced mobility in Brazilian older people aged 80 years and over. *Einstein (São Paulo), São Paulo*, v. 15, n. 4, p. 435-440, Dec. 2017.

SELL, H., and Eckel J. 2010. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13:366–370.

SGARIBOLDI, Dayla et al. Influence of age, anthropometric characteristics and body fat distribution in women's thoracic mobility. *Fisioter. Pesqui.*, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 342-347, dez. 2015.

SILVA, P. A., Monnerat-Cahli, G., Pereira-Acácio, A., Luzardo, R., Sampaio, L. S., Luna-Leite, M. A., ... Vieyra, A. (2014). Mechanisms Involving Ang II and MAPK/ERK1/2 Signaling Pathways Underlie Cardiac and Renal Alterations during Chronic Undernutrition. *PLoS ONE*, 9 (7), e100410.

SINGH R K, Kumar S, Tomar M S, Verma P K, Kumar A, Kumar S, Kumar N, Singh J P, Acharia A. *Daru*. 2021; 29 (2): 397–414. Putative role of natural products as Protein Kinase C modulator in different disease conditions.

SINGH R M., Cummings E, Pantos C, Singh J. Protein kinase C and cardiac dysfunction: a review. *Heart Fail Rev* (2017) 22:843–859.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. *Fisiología Humana: Uma Abordagem Integrada*. 7a. ed.; artmed editora LTDA, 2017.

SOLÁ E, Vayá A, Corella D, Santaolalia ML, España F, Estellés A, Hernández-Mijares A. Erythrocyte hyperaggregation in obesity: determining factors and weight loss influence. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Aug;15 (8): 2128-34.

SORIN A, Rosas G, Rao R. PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem*. 1997 Apr 11;272(15):9895-901.

SUHAIL M. Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res*. 2010 Feb;2 (1):1-17.

TOSUKHOWONG, P., et al., Hypokalemia, High Erythrocyte Na⁺ and Low Erythrocyte Na,K-ATPase in Relatives of Patients Dying from Sudden Unexplained Death Syndrome in North-East Thailand and in Survivors from Near-Fatal Attacks. *Am J Nephrol.*; v. 16, p. 369-374,1996.

TOYOSHIMA C. How Ca^{2+} -ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1793 (6):941-6.

TRINDADE, S. B. Avaliação dos transportadores ativos primários de sódio de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso. Dissertação. 2020. - Dissertação (Mestrado em Biotrans - Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional) - Universidade do Grande Rio.

VALDEZ R. A. Simple model-based index of abdominal adiposity. *J Clin Epidemiol*. 1991; 44 (9): 955-6.

VANDECAETSBECK I, Trekels M, De Maeyer M, Ceulemans H, Lescrinier E, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Structural basis for the high Ca^{2+} affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca^{2+} pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3; 106 (44):18533-8.

WANG KK, Wright LC, Machan CL, Allen BG, Conigrave AD, Roufogalis BD. Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes. *J Biol Chem*. 1991 15; 266 (14): 9078-85.

VAN WIJK R, van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*. 2005 Dec 15; 106 (13):4034-42.

VIGITEL - VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. 2019. Acessado em novembro de 2020.

WORLD Health Organization: Obesity and overweight - Acessado em: 8 de janeiro de 2020.

WORLD Health Organization: Obesity 2022 - Acessado em: 01 de dezembro de 2022.

ZAID MA, Sharma KK, Rizvi SI. Effect of (-) epicatechin in modulating calicum-atpase activity in normal and diabetic human erythrocytes. *Indian J Clin Biochem.* 2002 Jul;17(2):27-32.

ZINGERMAN B, Herman-Edelstein M, Erman A, et al. Effect of Acetazolamide on Obesity-Induced Glomerular Hyperfiltration: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One.* 2015;10(9): e0137163. Published 2015 Sep 14. doi:10.1371/journal.pone.0137163.

ZIOBRO, A., et al. Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic Syndrome. *Mol Cell Biochem.*, v. 378, p. 267–273, 2013.

ZORENA, K., Jachimowicz-Duda, O., Ślęzak, D., Robakowska, M., & Mrugacz, M. 2020. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (10), 3570.

ANEXO I



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Avaliação dos Transportadores Ativos Primários de Sódio e Cálcio e Conteúdo de Sódio Intra-eritrocitário em Pacientes Hipertensos, Obesos e Obesos Hipertensos**”. Você foi selecionado por ordem de chegada e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição (Unigranrio). Os objetivos deste estudo são estudar as associações entre as medidas antropométricas, sua massa corporal (peso), pressão arterial, conteúdo de sódio intra-eritrocitário e a atividade dos transportadores ativos primários de sódio localizados no eritrócito.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário sobre dados pessoais e de saúde geral, fornecer amostras de sangue, ser pesado e medido (altura e circunferência da cintura e do quadril). Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. O principal benefício relacionado com a sua participação é o melhor conhecimento de sua saúde no geral.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os resultados de seus exames serão confidenciais, ou seja, somente o pesquisador terá acesso a suas informações e serão utilizados somente para o presente estudo. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Paulo André da Silva no telefone (21) 26727776 ou no e-mail paulo.silva@unigranrio.edu.br.

Pesquisador Responsável: Paulo André da Silva

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br

Duque de Caxias, _____ de _____ de 20____.

Sujeito da pesquisa

ANEXO II



PROJETO DE PESQUISA - FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____ Data de Nascimento: _____
 / /

Endereço: _____
 Telefone: _____ Estado civil: _____ Profissão: _____

Questionário sociodemográfico

Sua cor ou raça é: () 1 - Branca () 2 - Preta () 3 - Amarela () 4 - Parda () 5 - Indígena

Sua renda familiar é: () 1. Menor de 1 salário mínimo () 2. de 1 a 2 salários mínimos () 3. de 1 a 2 salários mínimos () 4. de 2 a 3 salários mínimos () 5. mais de 3 salários mínimos

Nível de escolaridade: Sabe ler e escrever? () Sim () Não Qual é o curso mais elevado que cursou, no qual concluiu pelo menos uma série? _____

Questionário Médico

1. Nome do seu médico: _____ Telefone: _____

2. Data do último exame médico: _____

3- Você já foi hospitalizado? () sim () não () não sei

4- Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

5- Você está sob cuidados médicos? () sim () não () não sei

6- Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

7- Você tem ou já teve alguma das seguintes condições:

8- Doenças congênitas do coração? () sim () não () não sei

9- Doenças cardíacas (ex.: infarto, angina, derrame, pressão alta, pressão baixa?).

() sim () não () não sei

10- Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? () sim () não () não sei

11- Inchaço nos pés ou tornozelos? () sim () não () não sei

- 12- Dor, pressão ou mal estar no peito? ()sim () não () não sei
- 13- Febre reumática? ()sim () não () não sei
- 14- Endocardite bacteriana? ()sim () não () não sei
- 15- Sopros no coração? ()sim () não () não sei
- 16- Desmaios, convulsões ou epilepsia? ()sim () não () não sei
- 17- Dor de cabeça (2 ou mais vezes por semana)? ()sim () não () não sei
- 18- Tratamento nervoso? ()sim () não () não sei
- 19- Problemas pulmonares? (ex.: tuberculose , asma, enfisema, bronquite ?
()sim () não () não sei
- 20- Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? ()sim () não () não sei
- 21- Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorreia, AIDS)?
()sim () não () não sei
- 22- Artrite ou dores articulares? ()sim () não () não sei
- 23- Diabetes? ()sim () não () não sei
- 24- Demora na cicatrização dos ferimentos? ()sim () não () não sei
- 25- Você urina mais de seis vezes por dia ? ()sim () não () não sei
- 26- Você sente sede a maior parte do tempo? ()sim () não () não sei
- 27- Problemas sanguíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematêmese, hematúria, epistaxes)? ()sim () não () não sei
- 28- Úlceras ou outros problemas estomacais? ()sim () não () não sei
- 29- Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranquilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? ()sim () não () não sei
- 30- Você já sofreu transfusão sanguínea? ()sim () não () não sei
- 31- Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? ()sim () não () não sei
- 32- Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? ()sim () não () não sei
- 33- Você teve uma variação recente no apetite? ()sim () não () não sei
- 34- Você faz algum tipo de dieta ou restrição alimentar? ()sim () não () não sei
- 35- Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? ()sim () não () não sei
- 36- Histórico de câncer na família? ()sim () não () não sei
- 37- Em caso de resposta positiva, qual tipo de câncer? _____

38- Você pratica atividade física? () sim () não

39 - Em caso de resposta positiva, qual tipo de atividade e quantas vezes por semana?

Somente para mulher

40- Você já passou pela menopausa? () sim () não () não sei

41- Você está tomando algum hormônio? () sim () não () não sei

Observações : _____

Assinatura

____/____/____

Data

Exame Físico

Pressão Arterial

1ª medida : PAS _____

PAD _____

2ª medida : PAS _____ PAD

3ª medida : PAS _____ PAD

Peso: _____

Altura: _____

IMC: _____

() Eutrófico () Sobrepeso () Obeso I () Obeso II () Obeso III

Circunferência de Cintura: _____

Circunferencia de Quadril: _____

Relação Cintura – Quadril: _____