

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



SAMIRA FONTE ZANON DE SOUZA

**REDUÇÃO DA ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES ATIVOS PRIMÁRIOS DE
SÓDIO E ALTERAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA ALDOSTERONA DE ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS OBESOS E
COM SOBREPESO**

Duque de Caxias

2022

SAMIRA FONTE ZANON DE SOUZA

REDUÇÃO DA ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES ATIVOS PRIMÁRIOS DE
SÓDIO E ALTERAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA ALDOSTERONA DE ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS OBESOS E
COM SOBREPESO

Dissertação apresentada ao Programa de
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.

Duque de Caxias

2022

S729r Souza, Samira Fonte Zanon de.
Redução da atividade dos transportadores ativos primários de sódio e alteração dos componentes do sistema renina angiotensina aldosterona de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso / Samira Fonte Zanon de Souza. – Duque de Caxias, 2022.
56 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2022.
“Orientador: Prof. Dr. Paulo André da Silva”.
Referências: f. 44-49.

1. Medicina. 2. Obesidade. 3. Hipertensão arterial. 4. Eritrócitos. 5. Sistema renina-angiotensina. I. Silva, Paulo André da. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

SAMIRA FONTE ZANON DE SOUZA

REDUÇÃO DA ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES ATIVOS PRIMÁRIOS DE
SÓDIO E ALTERAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA ALDOSTERONA DE ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS OBESOS E
COM SOBREPESO

Dissertação apresentada ao Programa de
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.

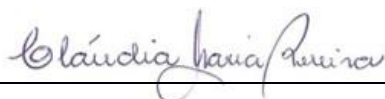
Aprovada em 31 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



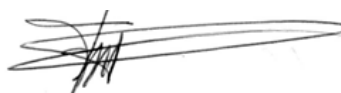
Prof. Dr. Paulo André da Silva - Orientador

Prof. Adjunto - Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO)



Prof^a. Dra. Cláudia Maria Pereira

Prof^a. Adjunta - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes

Prof. Associado – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)



Prof. Dr. Gilson Costa dos Santos Junior

Prof. Adjunto – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

RESUMO

Atualmente, a obesidade e o sobrepeso constituem um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, atingido um total de 1,9 bilhões de indivíduos, dos quais 650 milhões são obesos. A obesidade está atrelada ao aparecimento de várias comorbidades dentre elas podemos citar a hipertensão arterial e a diabetes mellitus. Os principais mecanismos relacionados a hipertensão associada a obesidade são o aumento da atividade do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) e o aumento da atividade simpática. Os eritrócitos são células altamente sensíveis às modificações das concentrações sanguíneas de sódio e potássio, que por sua vez são mantidas pelos transportadores destes cátions. O objetivo do trabalho é avaliar a atividade dos transportadores ativos primários de Na^+ (Na^+ -ATPase e Na^+ + K^+ -ATPase) e os componentes SRAA nas membranas de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso, com o intuito de utilizar estes parâmetros como biomarcadores de hipertensão arterial associado a obesidade. Os grupos foram formados por funcionários e estudantes da Unigranrio, que foram classificados, de acordo com o índice de massa corporal (IMC). A população do estudo foi formada 34 indivíduos, classificados pelo IMC e divididos em seus respectivos grupos. A determinação da atividade dos transportadores ativos primários de sódio (Na^+ -ATPase e a Na^+ + K^+ -ATPase) localizadas nas membranas dos eritrócitos foram mensuradas a partir da quantificação do fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do ATP. A quantidade de proteínas que compõe o SRAA foi mensurada a partir de eletroforese e imunodeteção. Como resultados, verificamos que existe uma redução significativa da atividade das ATPases transportadoras de Na^+ (Na^+ + K^+ -ATPase e Na^+ -ATPase) localizadas nas membranas dos eritrócitos dos indivíduos obesos e com sobrepeso em comparação com a dos eutróficos. Em relação aos componentes do SRAA, verificamos que ocorre um aumento do número de cópias de receptores AT_1 , de $\text{PKC}\alpha$ e de PKA. Podemos concluir que a atividade Na^+ + K^+ -ATPásica e Na^+ -ATPásica seriam importantes biomarcadores para as modificações ocorridas na obesidade e experimentos complementares devem ser realizados para esclarecer as modificações no SRAA dos indivíduos obesos.

Palavras-Chave: Obesidade, hipertensão arterial, transportadores ativos primários de Na^+ , eritrócitos, Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.

ABSTRACT

Obesity and overweight constitute one of the biggest public health problems in the world, affecting a total of 1,9 billion individuals, of which 650 million are obese. Obesity is linked to the appearance of several comorbidities among them we can mention hypertension and diabetes mellitus. The main mechanisms related to obesity-associated hypertension are increased activity of the Renin Angiotensin Aldosterone System (RAAS) and increased sympathetic activity. Erythrocytes are highly sensitive cells to changes in blood sodium and potassium concentrations, which in turn are maintained by the transporters of these cations. The objective of this work is to evaluate the activity of primary Na^+ transporters (Na^+ -ATPase and Na^+ + K^+ -ATPase) and RAAS components in the erythrocyte membranes of obese and overweight individuals, in order to use these parameters as biomarkers. of arterial hypertension associated with obesity. The groups were formed by Unigranrio employees and students, who were classified according to their body mass index (BMI). The study population consisted of 34 individuals, classified by BMI and divided into their respective groups. The determination of the activity of primary active sodium transporters (Na^+ -ATPase and Na^+ + K^+ -ATPase) located in erythrocyte membranes were measured from the quantification of inorganic phosphate released by ATP hydrolysis. The number of proteins that make up the RAAS was measured by electrophoresis and immunodetection. As a result, we found that there is a significant reduction in the sodium ATPase activity (Na^+ + K^+ -ATPase and Na^+ -ATPase) located in the erythrocyte membranes of obese and overweight individuals compared to eutrophic individuals. Regarding the RAAS components, we verified that there is an increase in the number of AT_1R , $\text{PKC}\alpha$ and PKA. We can conclude that Na^+ + K^+ -ATPase and Na^+ -ATPase activity would be important biomarkers for changes in obesity and complementary experiments should be performed to clarify the changes in the RAAS of obese individuals.

Keywords: Obesity, hypertension, Na^+ + K^+ -ATPase, Na^+ -ATPase erythrocytes, Renin Angiotensin Aldosterone System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa da obesidade no mundo.....	13
Figura 2 - Diferenças morfológicas e metabólicas entre os diferentes tipos de adipócitos.....	15
Figura 3 - Modificações anatômicas e funcionais do tecido adiposo branco na obesidade.....	16
Figura 4 - Principais mecanismos que geram a hipertensão arterial associada a obesidade.....	18
Figura 5. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona clássico.....	19
Figura 6 - Modelo de vias de transporte iônico no eritrócito humano.....	22
Figura 7- A atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPásica}$ de membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.....	30
Figura 8- A atividade $\text{Na}^+\text{-ATPásica}$ de membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.....	30
Figura 9- Correlação entre a atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPásica}$ de membranas de eritrócitos com o IMC.....	31
Figura 10- Correlação entre a atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPásica}$ de membranas de eritrócitos com a RCQ.....	32
Figura 11- Correlação entre a atividade $\text{Na}^+\text{-ATPásica}$ de membranas de eritrócitos com o IMC.....	32
Figura 12- Correlação entre a atividade $\text{Na}^+\text{-ATPásica}$ de membranas de eritrócitos com a RCQ.....	33
Figura 13- Aumento do número cópias de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPases}$ nas membranas de eritrócitos nos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso.....	34
Figura 14- Aumento de receptores AT_1 nas membranas de eritrócitos de eutróficos, pessoas com sobrepeso e obesos.....	35
Figura 15- Aumento de receptores AT_2 nas membranas de eritrócitos de eutróficos, pessoas com sobrepeso e obesos.....	36
Figura 16- Aumento de $\text{PKC}\alpha$ nas membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.....	37

Figura 17- Aumento de PKA nas membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos níveis de IMC em adultos	12
Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos.....	28
Tabela 3 - Dados bioquímicos.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	Angiotensina II
ATP	Adenosina Trifosfato
CC	Circunferência da Cintura
CQ	Circunferência do quadril
CT	Colesterol Total
DAS	Diâmetro Abdominal Sagital
DCNT	Doença Crônica Não Transmissível
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de Massa Corporal
MR	Mineralocorticoides
PA	Pressão Arterial
PKA	Proteína Kinase A
PKC	Proteína kinase C
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
TGF- β	Fator de Crescimento Beta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	OBESIDADE NO BRASIL E NO MUNDO	11
1.2	DISFUNÇÕES DO TECIDO ADIPOSEO	14
1.3	MECANISMO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL ASSOCIADA À OBESIDADE	17
1.3.1	Aumento da Reabsorção Renal de Na ⁺ na obesidade.....	17
1.3.2	O Papel do SRAA na Hipertensão Associada ao Excesso de Peso.....	17
1.4	MECANISMOS DE TRANSPORTE DE NA ⁺ NO ERITRÓCITO.....	20
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	METODOLOGIA	23
4.1	CASUÍSTICA.....	23
4.2	AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	24
4.3	DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL (PA)	24
4.4	COLETA DE SANGUE E ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	25
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ATPASES TRANSPORTADORAS DE SÓDIO.....	26
4.6	ELETROFORESE E IMUNODETECÇÃO.....	26
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	44
	ANEXOS I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	50
	ANEXO II - Ficha de Anamnese.....	52

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a obesidade e o sobrepeso constituem um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, atingido um total de 1,9 bilhões de indivíduos, dos quais 650 milhões são obesos (WHO, 2016). No Brasil, esse aumento significativo ocorreu de forma similar com o passar das décadas, nos últimos 20 anos, a proporção de obesos passou de 12,2 para 26,8% (ABESO, 2019).

A obesidade está atrelada a diversas outras patologias, como diabetes mellitus, diversos tipos de câncer, desordens musculoesqueléticas e doenças cardíacas, hipertensão arterial, dentre outras (WHO, 2021; BHASKARAN et al., 2018). Esta característica torna a obesidade uma patologia que gera grandes custos ao Sistema Único de Saúde (SUS). De acordo com Nilson e colaboradores (2019), os gastos nacionais com obesidade, hipertensão arterial e diabetes mellitus, são de 3,45 bilhões de reais.

Como mencionado anteriormente, a obesidade e o sobrepeso, estão intimamente associados a hipertensão arterial. Nos Estados Unidos, um terço dos obesos são hipertensos, em comparação a menos de um quinto da população eutrófica (SAYDAH et al., 2014). Uma das principais causas do aumento da prevalência de hipertensão arterial ocorrida nos últimos anos, se deve ao aumento significativo de indivíduos com sobrepeso e obesidade, que triplicou nos últimos 40 anos (WHO, 2016).

A associação entre obesidade e hipertensão arterial ocorre a partir do aumento significativo do tecido adiposo, que levará a um aumento concomitantemente da liberação de leptina. Uma das funções desta adipocina é o controle do metabolismo, gerando saciedade e aumentando a atividade simpática e consequentemente, aumento da atividade do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) (HALL et al., 2019). Este sistema, exerce várias funções no organismo, dentre elas podemos destacar o controle hidroeletrolítico, controle da pressão arterial, a contratilidade dos vasos sanguíneos e aumento da reabsorção de Na^+ renal (Campbell., 2014).

O SRAA é formado por diferentes tipos de receptores e diferentes peptídeos que ligados a seus receptores, vão promover diversas funções em diferentes tecidos, de acordo com o peptídeo, o receptor e o tecido que se encontram (PATEL et al., 2017). Dentre os peptídeos do SRAA, podemos destacar a Angiotensina II (Ang II), principal peptídeo deste sistema, pode promover vários efeitos em diferentes tecidos.

Entretanto, alguns de suas principais funções são o aumento da reabsorção renal de Na^+ e do aumento da contratilidade do músculo liso de vasos, e na obesidade a Ang II encontra-se aumentada (HALL et al., 2019). Outro hormônio deste sistema que encontra-se aumentado na obesidade é a aldosterona, este hormônio apresenta tanto efeitos gênicos quanto efeitos rápidos na ativação de vias intracelulares que vão culminar com o aumento da reabsorção de Na^+ em todo néfron. Estas alterações ocorrem pelo aumento do número de cópias e da ativação por fosforilação de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (LOU et al., 2016; SILVERTHORN, 2017).

Atualmente, estão sendo utilizados ou buscados biomarcadores para identificação de diferentes patologias em seus possíveis diversos estágios. Onde, doenças crônicas podem ser identificadas precocemente e seus efeitos deletérios prevenidos. No caso da hipertensão arterial associada à obesidade, o SRAA local, está alterado em vários órgãos como rim e coração, levando à diversas modificações sistêmicas (SILVA et al., 2014^a; LUZES et al., 2020).

Os eritrócitos são células altamente sensíveis a modificações nas concentrações de Na^+ plasmático e são de fácil acesso. Estas características nos levam a utilizar esta célula. Vários pesquisadores buscam uma correlação entre as modificações no transporte de Na^+ nos eritrócitos e diversas comorbidades como a hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e obesidade (GOLIK et al., 1996; TOSUKHOWONG et al., 1996; ZIOBRO, et al., 2013; TRINDADE, 2020). Vários estudos mostraram anormalidades no transporte de sódio em eritrócitos de indivíduos hipertensos e obesos (YOON et al., 1986; CANESSA et al., 1993; GOLIK et al., 1996). Entretanto, os resultados encontrados na literatura não mostram a atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ (insensível a ouabaína) em membranas de eritrócitos na hipertensão associada a obesidade, como também, não correlacionam a atividade destas ATPases com componentes da via de sinalização intracelular do SRAA.

1.1 OBESIDADE NO MUNDO E NO BRASIL

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT), caracterizada pelo excesso de gordura corporal, atinge homens e mulheres de todas as etnias e idades, reduzindo a qualidade de vida e aumentando as taxas de morbidade e mortalidade (OMS, 2006).

A obesidade pode ser definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal, sob a forma de tecido adiposo como consequência de balanço energético positivo, capaz de ocasionar prejuízo aos indivíduos (ENES, SLATER, 2010). A obesidade tornou-se tão comum que se transformar no mais grave problema de saúde pública do mundo, superando até mesmo a desnutrição e as doenças infecciosas (CARVALHO, 2000).

A obesidade é classificada de acordo com o índice de massa corporal (IMC), que é calculado a partir da divisão do peso corporal (em kg) dividido pela altura (em cm) ao quadrado, de acordo com a Organização Mundial da Saúde o indivíduo é considerado obeso quando apresenta um IMC maior ou igual a 30kg/m² e com sobrepeso quando apresenta o IMC na faixa de 25 a 29,9 kg/m² (WHO, 2017) (Quadro 1).

Tabela 1. Classificação dos níveis de IMC em adultos.

CLASSIFICAÇÃO	IMC
Abaixo do Peso	Abaixo 18,5
Peso Normal	18,5 - 24,9
Sobrepeso	25 - 29,9
Obesidade Grau I	30 - 34,9
Obesidade Grau II	35 - 39,9
Obesidade Grau III ou Mórbida	Maior ou Igual 40

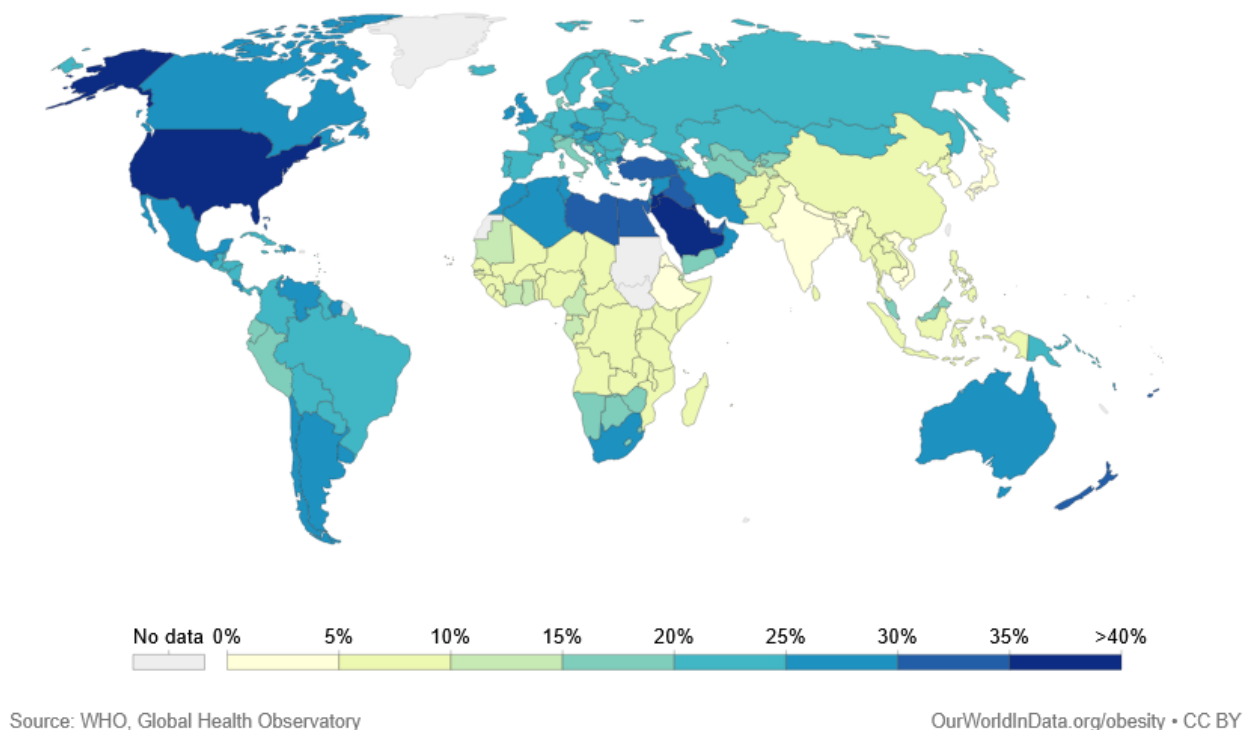
Fonte: WHO, 2017.

O excesso de peso acomete um grande percentual de brasileiros, afetando 16,8% dos homens e 24,4% das mulheres (FERREIRA et al., 2019). A prevalência de obesidade e hipertensão arterial cresce gradualmente na população adulta do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), atingindo 32,3% da população com obesidade (MALTA et al., 2016).

O número de pessoas com sobrepeso e obesidade no mundo aumentou de forma significativa, atingindo todas as classes sociais, idades e vários países de mundo (WHO, 2021) (Figura 1). O Brasil seguiu a tendência mundial, com uma quantidade de indivíduos com obesidade em aproximadamente 20% da população e de

sobrepeso atingindo mais de 50%. A obesidade atingia 12% da população, em 2006, que passou para 20% em 2018, enquanto o sobrepeso, que atingia 43% da população em 2008-2009, passou para 56% em 2018 (VIGITEL, 2018).

Figura 1. Mapa da obesidade no mundo



Estimativa de adultos obesos no mundo, são considerados obesos os indivíduos que apresentam o índice de massa corporal (IMC) > 30 (<https://ourworldindata.org/obesity>, 2021).

Essa comorbidade se tornou epidêmica no século XX, a partir da chamada transição nutricional, isto é, o surgimento de um novo perfil nutricional das populações, que a partir da classificação pelo IMC, caminha da diminuição da desnutrição e aumento da obesidade, levando a um novo problema de saúde pública (DUNCAN et al., 2004).

Um dos fatos cruciais que tornam a obesidade uma doença de extrema complexidade seria sua probabilidade de gerar outras comorbidades importantes como hipertensão arterial, diabetes mellitus, câncer, dislipidemias, desordens do sistema reprodutivo, entre outros. A obesidade ocorre a partir de diversos fatores, tais como os genéticos, psicossociais, cultural-nutricionais, metabólicos e endócrinos (SBP et al., 2008).

No Brasil, os custos estimados de doenças cardiovasculares aumentaram em 17% de 2010 a 2015, alcançando R\$ 37,1 bilhões no ano de 2015 (US\$ 9,6 bilhões), incluindo os custos estimados por morte prematura, os custos diretos com internações e as perdas de produtividade relacionados à doença (SIQUEIRA et al., 2017). Em 2011, os gastos hospitalares e ambulatoriais do SUS com obesidade chegaram a US\$ 269,6 milhões, dos quais quase 24% eram atribuíveis à obesidade mórbida (GONÇALVES, SILVA, 2018).

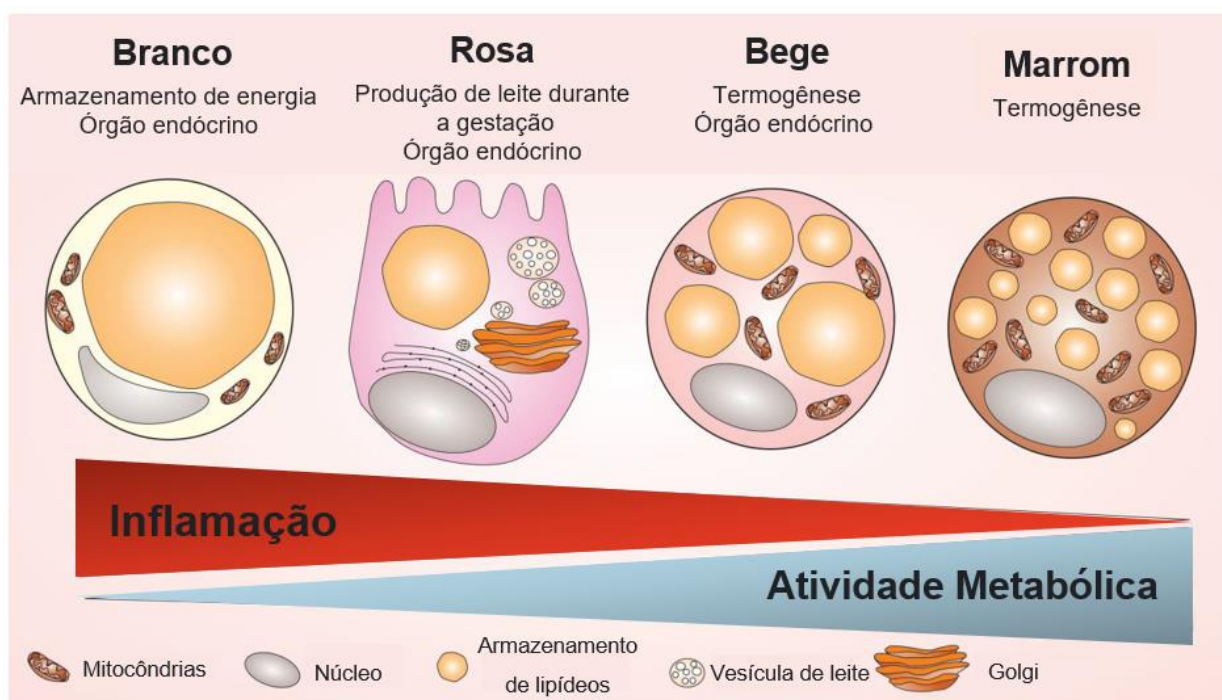
Em 2018, houve 1.829.779 internações por causas associadas à hipertensão arterial, ao diabetes e à obesidade no SUS. Isso corresponde a aproximadamente 16% do total de internações hospitalares no SUS no período, resultando em um custo total de R\$ 3,84 bilhões. Os custos ambulatoriais totais com as mesmas doenças no SUS somaram R\$ 166 milhões no ano de 2018, e os gastos do Programa Farmácia Popular com medicamentos para hipertensão, diabetes e asma totalizaram R\$ 2,31 bilhões. Os custos diretos atribuíveis a hipertensão arterial, diabetes e obesidade no Brasil totalizaram R\$ 3,45 bilhões, ou seja, US\$ 890 milhões, considerando gastos do SUS com hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos (NILSON, et al., 2019).

1.2 DISFUNÇÕES DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo pertence à classe dos tecidos conjuntivos e é composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células estromais e macrófagos. As principais funções do tecido adiposo corporal incluem o armazenamento energético, isolamento, isolamento térmico e apresentam também função imune e endócrina (ZORENA et al., 2020). É um tecido que pode variar muito de percentual na composição do peso corporal, mas normalmente um homem adulto deve apresentar em média 15-20% de tecido adiposo, enquanto as mulheres, o valor varia de 20 a 25% (ZORENA et al., 2020).

O tecido adiposo pode ser classificado, de acordo com sua morfofisiologia celular, em tecido adiposo branco, marrom, bege e rosa (FIGURA 2). Do ponto de vista fisiológico, todos os quatro tipos de células adiposas têm propriedades endócrinas.

Figura 2. Diferenças morfológicas e metabólicas entre os diferentes tipos de adipócitos.



Fonte: Corrêa et al., 2019.

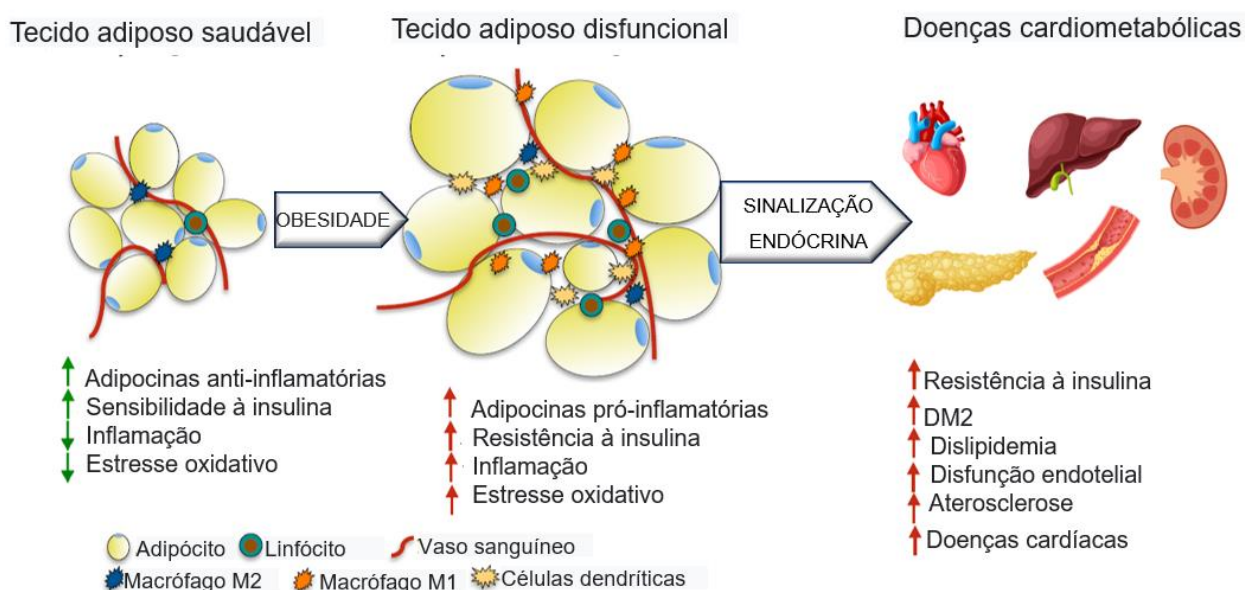
O adipócito branco possui uma única gota de gordura ocupando quase todo citosol, apresenta poucas mitocôndrias. Este adipócito tem um papel central na fisiopatologia da obesidade, pois a partir de sua hipertrofia, tem uma grande capacidade endócrina para promover modificações deletérias no organismo afetando o comportamento alimentar e o metabolismo (CORRÊA et al., 2019). O adipócito marrom, apresenta diversas pequenas gotículas de gordura distribuídas por todo citosol com uma grande quantidade de mitocôndrias, seu principal papel é a termogênese. O bege, possui características intermediárias entre as do branco e do marrom. Os adipócitos rosas, tem como principal função produzir os componentes do leite materno e também secretam leptina (BARTELT, HEEREN, 2014; CORRÊA et al., 2019).

Na obesidade, com a hipertrofia dos adipócitos brancos, ocorre um aumento significativo da liberação de leptina, um hormônio cuja principal função é reduzir o apetite e aumentar o gasto energético. Este hormônio aumenta a atividade do sistema nervoso simpático, com consequente aumento no débito cardíaco e da resistência vascular periférica, levando ao aumento da pressão arterial (DE COURTEN et al., 1997). A leptina tem um papel importante no metabolismo, pois regula o balanço

energético, por seu papel anorexígeno (ZORENA et al., 2020). Na obesidade os níveis de leptina estão muito aumentados. Entretanto, sua sensibilidade no núcleo arqueado no hipotálamo está reduzida (local responsável pela saciedade), porém nas áreas hipotálamicas ventromedial e dorsomedial, que levam ao aumento da atividade simpática, não se alteram, levando o indivíduo a ter sua saciedade reduzida e atividade simpática aumentada (LU, AKANJI, 2020).

A inflamação constante é outra característica dos 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, levando a um efeito cardioprotetivo (FEIJÓO-BANDÍN et al., 2020). Entretanto, com a hipertrofia do adipócito branco, principalmente os que estão localizados visceralmente, vão levar a alterações anatômicas e funcionais deste tecido. Como resultado do saldo calórico positivo em indivíduos geneticamente e ambientalmente suscetíveis, vão ocorrer respostas endócrinas e imunes desordenadas, que levam direta ou indiretamente para doenças metabólicas aumentando significativamente o risco de doenças cardiovasculares (BAYS, 2014; FEIJÓO-BANDÍN et al., 2020) (FIGURA 3).

Figura 3. Modificações anatômicas e funcionais do tecido adiposo branco na obesidade.



Com a hipertrofia do adipócito, o tecido vai apresentar modificação na liberação de adipocitocinas, causando resistência à insulina, aumento da inflamação e do estresse oxidativo. Estas modificações vão afetar o funcionamento de diversos órgãos. Fonte: FEIJÓO-BANDÍN et al., 2020.

1.3 MECANISMO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL ASSOCIADA À OBESIDADE

1.3.1 Aumento da Reabsorção Renal de Na⁺ na obesidade

A hipertensão arterial é uma das principais comorbidades causadas pela obesidade e um de seus principais mecanismos que levam à sua instauração é o aumento da reabsorção renal de sódio, com consequente expansão do volume plasmático. Os principais fatores que levam a hipertensão arterial na obesidade são o aumento da atividade simpática, a ativação do SRAA e a elevada pressão intra-renal resultante da obesidade abdominal (FRANCISCHETTI, GENELHU, 2007).

Na obesidade, a curva pressão natriurese está alterada. Em função disto, ocorre a elevação da pressão arterial para se manter o equilíbrio entre ingestão e excreção renal deste cátion (HALL et al., 2019). Neste processo, ocorre também a elevação da atividade simpática, que se leva ao aumento da resistência arteriolar periférica, mediada pelo ramo simpático eferente renal, que é um importante modulador do mecanismo de retenção de sódio (RUMANTIR et al., 1999).

Muitos estudos mostram a correlação entre aumento da gordura corporal e aumento na retenção de sódio. Este fato não é irreversível, pois com a redução da gordura corporal todos os efeitos deletérios causados pela grande adiposidade, incluindo aumento da atividade simpática, aumento da atividade do SRAA, aumento da retenção de Na⁺ e aumento da PA cessam (CHAGNAC et al., 2003; ENGELI et al., 2005; COHEN, 2018).

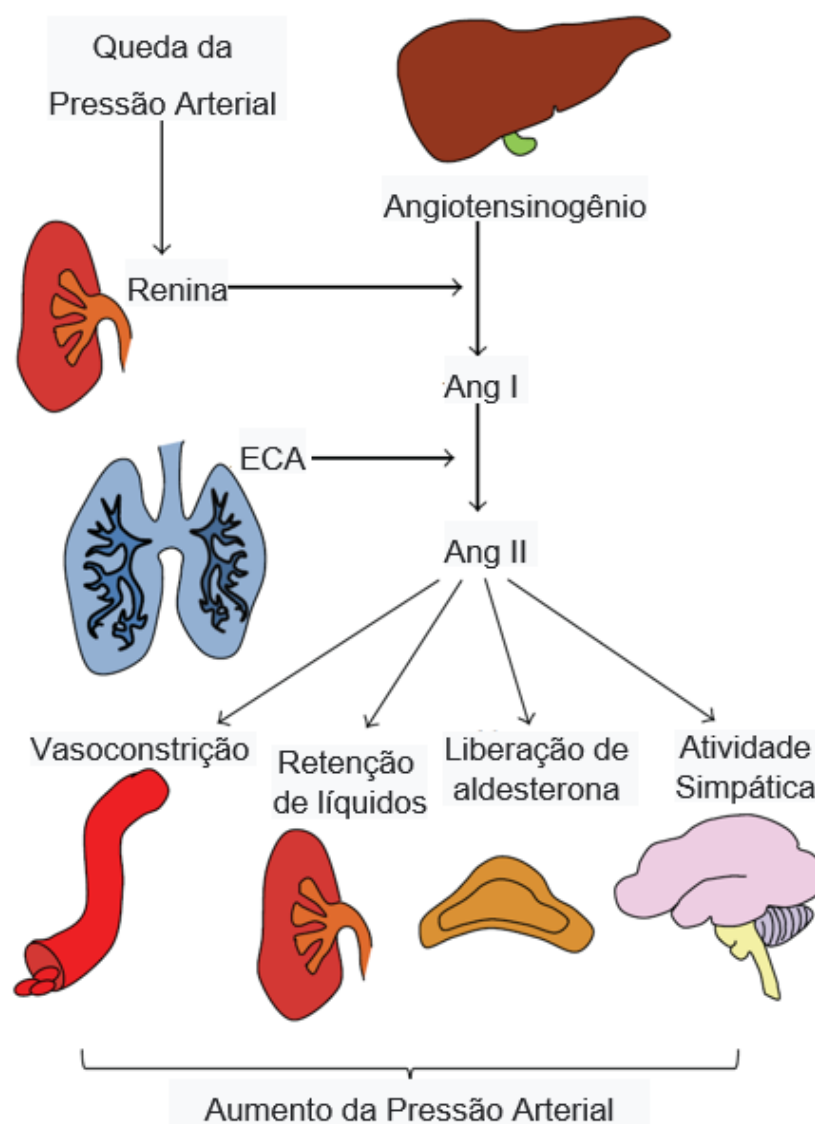
1.3.2 O Papel do SRAA na Hipertensão Associada ao Excesso de Peso

O SRAA tem um papel fundamental no controle hidroeletrolítico e da pressão arterial. Entretanto, na obesidade suas funções estão desreguladas, levando o indivíduo a um status hipertensivo e inflamatório (Figura 4) (PATEL et al., 2017). Em obesos hipertensos observa-se aumento do angiotensinogênio circulante, da atividade plasmática da renina e da enzima conversora da angiotensina (ECA) e da Ang II (UMEMURA et al., 1997). Com o aumento da atividade da renina e da ECA, a formação de Ang II também aumenta, este hormônio exerce um papel autócrino, parácrino e endócrino estimulando a reabsorção renal de sódio (HALL et al., 2019). Com o tratamento de inibidores de ECA e antagonistas do receptor de Angiotensina 1

A aldosterona participa da elevação da pressão arterial na obesidade a partir de sua ação nos receptores de mineralocorticoides (MR) localizados no rim, sistema vascular e cérebro (RAHMOUNI et al., 2005). No sobrepeso e na obesidade, a maioria dos indivíduos apresentam aumento de níveis plasmáticos de aldosterona pela estimulação da suprarrenal pela Ang II (GOODFRIEND, CALHOUN, 2004).

A aldosterona apresenta principalmente efeitos gênicos, levando a um aumento do número de cópias de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ no túbulo distal, gerando um aumento da reabsorção de sódio neste seguimento (HALL et al., 2019).

Figura 5. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona clássico.



Apesar da obesidade estar frequentemente associada a aumentos pequenos dos níveis plasmáticos de aldosterona, o bloqueio dos receptores mineralocorticoides (MCR) reduz de forma significativa a pressão arterial e reduz as lesões em órgãos como rim e coração. Em cães alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) para produzir obesidade, o antagonismo de MCR com eplerenone, reduziu a retenção de sódio, hiperfiltração glomerular e o desenvolvimento de hipertensão em aproximadamente 50% (DE PAULA et al., 2004). Em pacientes com obesidade e hipertensão, o antagonismo da MCR com a espironolactona reduziu a PA e a excreção urinária de albumina mesmo após bloqueio prolongado da formação de Ang II com inibidores da ECA (BOMBACK et al., 2009). Além disso, em pacientes com obesidade e hipertensão resistente ao tratamento que foram tratados com espironolactona, as reduções resultantes na PA não se correlacionaram com a concentração plasmática de aldosterona (DUDENBOSTEL, CALHOUN, 2017). Estes estudos indicam que o antagonismo do MCR é uma terapia importante para a hipertensão induzida pela obesidade e suas anormalidades cardiorrenais associadas, mesmo na ausência de hiperaldosteronismo.

Os MCR estão acoplados a uma proteína G (K-Ras2), que vão ativar inicialmente a quinase regulada por soro e glicocorticoides (SGK1) (ARROYO et al., 2011). Esta quinase vem sendo mostrada como um sensor de choque osmótico e inflamação em diversos tipos de célula, promovendo efeitos não genômicos rápidos (FIRESTONE et al., 2003; DATTILO et al., 2020). A SGK1, promove nos segmentos do néfron, um aumento da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (LOU et al., 2016). Embora já se conheça a ação da SGK1 sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e do EnaC na reabsorção distal de sódio, o papel da aldosterona na modulação da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e Na-ATPase em eritrócitos ainda não foram verificados.

1.4 MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Na^+ NO ERITRÓCITO

O eritrócito é uma célula altamente sensível as modificações hidroeletrólíticas do meio em que se encontram, necessitando de um ambiente altamente controlado para sua sobrevivência. Várias vias de sinalização podem controlar a homeostase de água e solutos nos eritrócitos, inclusive o SRAA, e alterações nestes fatores podem comprometer a integridade da célula, causando sua destruição prematura

(GUIMARÃES-NOBRE et al., 2021). Várias patologias, de cunho genético ou adquirido, podem modificar a hidratação de eritrócitos com diferentes fenótipos celulares que podem variar de eritrócitos desidratados a super-hidratados (GALLAGHER, 2017).

A preservação equilíbrio hidroeletrólítico é um processo dinâmico que envolve vários fatores, dentre deles podemos citar o conteúdo de íons, a concentração de hemoglobina, as vias de transporte de íons, a área de superfície da membrana, as interações complexas entre solutos e a condutância da membrana para ânions e cátions monovalentes (Figura 5) (BRUGNARA, 1997; HOFFMANN et al., 2009). Várias vias medeiam a homeostase de água e solutos nos eritrócitos, entretanto, o volume celular é controlado principalmente pelo conteúdo de Na^+ (BRUGNARA, 1997; HOFFMANN et al., 2009).

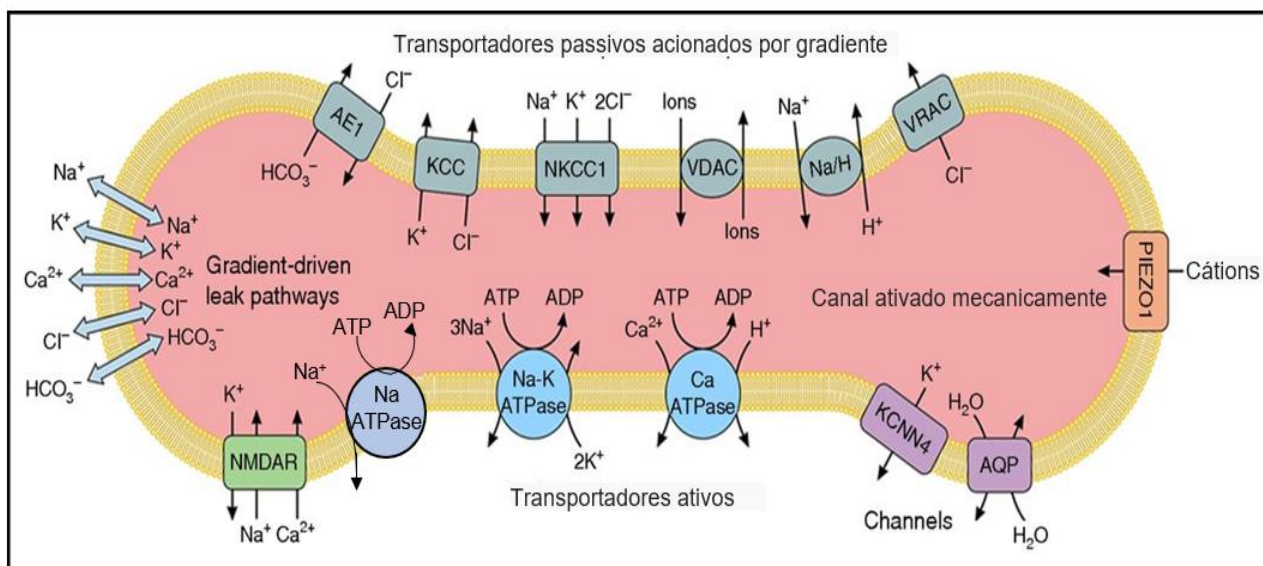
A concentração intracelular de potássio no eritrócito é alta ($\sim 140 \text{ mEq/dl}$) em comparação com a do plasma ($4\text{-}5 \text{ mEq/dl}$), enquanto a concentração de sódio é baixa ($\sim 10 \text{ mEq/dl}$), em comparação com a do plasma ($\sim 140 \text{ mEq/dl}$). Estes gradientes de concentração levam ao movimento passivo do sódio para dentro e do potássio para fora do eritrócitos. O ambiente interno com baixo teor de sódio e alto potássio do eritrócito é mantido pela $\text{Na}^+ + \text{K}^+ \text{-ATPase}$ (TOSTESON, HOFFMAN, 1960).

No estado estacionário, a permeabilidade iônica através da membrana eritrocitária é muito baixa, evitando a osmose e conseqüentemente alterações no volume celular. Eletro-difusões catiônicas passivas (vazamento) permitem que o potássio saia da célula e o sódio entre. No entanto, a célula tem capacidade limitada para responder a alterações nas concentrações de cátions monovalentes e, se excedido, o volume celular mudará também. Quando a difusão do sódio para o meio intracelular excede a difusão de potássio para meio fora extracelular, os eritrócitos incham. Quando a difusão de potássio para o meio extracelular excede a difusão de sódio para o meio intracelular, os eritrócitos murcham (BRUGNARA, 1997). Mudanças na permeabilidade da membrana são detectados pela mensuração do sódio e potássio intracelular, teor total de cátions, com índices de forma e hidratação dos eritrócitos e atividade dos transportadores iônicos localizados na membrana (STEWART, TURNER, 1999).

Em diferentes patologias, como hipertensão arterial e obesidade, os mecanismos de transporte localizados nas membranas dos eritrócitos se apresentam alterados, podendo ser estudados e futuramente utilizados como biomarcadores de

diferentes patologias. Vários trabalhos mostram modificações na atividade e no aumento de número de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ na obesidade e na hipertensão arterial, entretanto, as vias e sistemas que levam a esta alteração não foram elucidadas (GOLIK et al., 1996; JASENOVEC et al., 2021).

Figura 6. Modelo de vias de transporte iônico no eritrócito humano



Fonte: Gallagher 2017.

2 JUSTIFICATIVA

A Hipertensão Arterial e a obesidade são doenças que promovem uma alta mortalidade no Brasil e no Mundo, por isso é fundamental esclarecimento de seus mecanismos e o controle desta patologia. Como são doenças silenciosas, não apresentam sintomas significativos, até que os danos causados em órgãos se apresentem. As alterações no funcionamento destes órgãos podem ser irreversíveis e causam grande impacto na qualidade de vida dos acometidos. Com o tratamento precoce, os efeitos deletérios serão evitados e gastos e percalços reduzidos, a partir do controle do impacto desta doença para sociedade.

As alterações hormonais apresentadas na obesidade vão afetar o funcionamento de diversos órgãos e sistemas, por consequência, diversos mecanismos de homeostase. E entre eles podemos citar o balanço hidroeletrólítico e a pressão arterial, que são modulados pelo SRAA. O eritrócito é uma célula muito sensível a

modificações das concentrações de eletrólitos, por isso, as ATPases transportadoras de sódio seriam bons candidatos a biomarcadores para hipertensão arterial associada à obesidade assim como, componentes do SRAA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade dos transportadores ativos primários de Na^+ (Na^+ -ATPase e Na^+ + K^+ -ATPase) e os componentes do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona nas membranas de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os dados antropométricos e pressóricos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Determinar o perfil bioquímico (glicose, insulina, colesterol total, HDL- colesterol, LDL- colesterol, triglicerídeos, sódio e potássio plasmático) de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Verificar a atividade dos transportadores ativos primários de Na^+ (Na^+ -ATPase e Na^+ + K^+ -ATPase) nos eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso.
- Avaliar o número de cópias dos componentes do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, envolvidos na modulação das ATPases transportadoras de Na^+ (Receptores AT_1 e AT_2 , $\text{PKC}\alpha$, PKA), nos eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Os participantes foram recrutados na Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), entre alunos e funcionários. Estes participantes foram classificados

de acordo com o IMC. A participação foi voluntária, respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídos no estudo 34 indivíduos e distribuídos, respectivamente, pelos grupos de acordo com o IMC (12 eutróficos, 14 sobrepesos e 8 obesos).

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).

Os Critérios de Inclusão para esse estudo são: 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 lipídeo, hipotensores, gestantes e lactantes e indivíduos que fazem uso de substâncias ilícitas.

4.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

O peso corporal dos participantes foi aferido em balança antropométrica e a altura em um estadiômetro. A partir destas medidas, foi calculado o IMC e os indivíduos foram classificados em grupos (eutróficos, sobrepesos e obesos).

O índice da circunferência da cintura (CC) e 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 posterior das nádegas.

O diâmetro abdominal sagital (DAS) foi medido com um estadiômetro abdominal de haste móvel (caliper abdominal Trivium; Trivium Ind. e Com. Ltda; Universidade Federal de Viçosa). O indivíduo se mantém em decúbito dorsal em uma maca de superfície firme, e o DAS corresponderá à medida entre a maca e o limite abdominal superior no plano horizontal.

4.3 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL (PA)

A PA foi aferida pelo método oscilométrico, utilizando-se um monitor automático da marca OMRON. Os manguitos têm tamanho apropriado ao braço dos participantes e os registros são feitos com o indivíduo sentado. Após 5 min de repouso, serão realizadas três medidas sequenciais, com intervalos de 3 min, com vistas ao cálculo da média dos níveis pressóricos. Foram descartados valores que apresentarem diferenças acima de 10 mmHg na PA sistólica e 5 mmHg na PA diastólica.

4.4 COLETA DE SANGUE E ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Foram coletados aproximadamente 25 ml de sangue periférico após 12h de jejum para realização das análises bioquímicas. A partir dessa amostra, 15 ml foram utilizados para obtenção das membranas de eritrócitos para medir a atividade das ATPases transportadoras de Na⁺.

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), representando: normoglicemia < 99 mg/dL, pré-diabetes: ≥ 100 e < 126 mg/dL e diabetes estabelecido ≥ 126 mg/dL;

Insulina: determinada pelo método de quimioluminescência, valores expressos em mcUI/mL, em que 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), ao qual a resistência é determinada pelo produto da insulinemia (μ U/mL) e pela glicemia de 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 (GELONEZE, TAMBASCIA, 2006).

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 a risco cardiovascular estimado, em que: < 130 mg/dL baixo risco, < 100 mg/dL risco intermediário, < 70 mg/dL risco alto, < 50 mg/dL risco.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ATPASES TRANSPORTADORAS DE SÓDIO

As membranas plasmáticas de eritrócitos para a dosagem de atividade das ATPases transportadoras de sódio foram obtidas através da coleta de 15 ml de sangue em tubos contendo EDTA. O sangue foi centrifugado em uma centrífuga clínica por 10 min a $2.500 \times g$ 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 por uma centrifugação na ultracentrífuga a $12.000 \times g$ por 20 min. Após a precipitação das membranas, elas foram lavadas 3 vezes em uma solução contendo TrisHCl (10 mM, pH 7,4) e precipitadas novamente com a mesma centrifugação. Após a última centrifugação as membranas foram resuspendidas em sacarose (250 mM) e armazenadas em freezer a -80°C (NMAZI et al., 2015).

As atividades das ATPases foram medidas a partir da quantificação do fosfato inorgânico liberado resultante da hidrólise do ATP (SILVA et al., 2014). As atividades da $\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$ -ATPase e Na^{+} -ATPase foram calculadas a partir do delta entre a atividade na presença e na ausência de seu inibidor (no caso da $\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$ -ATPase utiliza-se a ouabaína e da Na^{+} -ATPase a furosemida) após 60 min de hidrólise do ATP.

4.6 ELETROFORESE E IMUNODETECÇÃO

As proteínas localizadas nas preparações de membranas dos eritrócitos foram separadas por peso molecular a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com SDS, foram colocados em cada poço 100 µg de proteína. Depois, as proteínas

foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo primário para a proteína de interesse (SILVA et al., 2014).

Para imunodeteção dos receptores de Ang II, Na⁺+K⁺-ATPase, PKC e PKA, foram usadas de forma geral diluições de 1:500 (para os anticorpos primários) e 1:2.500 (para o secundário), com exceção da β -actina onde foram usadas para o primário uma diluição de 1:5000 e secundário 1:10000. As proteínas e o padrão de peso molecular foram separados e transferidos para a membrana de nitrocelulose, coradas com vermelho de ponceau para determinação de peso molecular.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos e experimentais obtidos foram analisados com auxílio do pacote estatístico IBM-SPSS (versão 19, IBM Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Diferenças significativas nos parâmetros clínicos e experimentais entre os grupos foram avaliadas utilizando ANOVA de um fator seguida de um pós-teste de Tukey. Para verificar a correlação entre as atividades das ATPases transportadoras de Na⁺ e as variáveis que caracterizam a obesidade e suas comorbidades, foi utilizado o coeficiente de correlação de *Pearson*. Os resultados são mostrados como média e erro padrão.

5 RESULTADOS

A amostra do presente trabalho foi composta por 34 indivíduos, que foram classificados como eutróficos (n = 12), sobrepesos (n = 14) e obesos (n = 8) de acordo com IMC (Tabela 2). Na Tabela 2, podemos verificar que existe diferença significativa entre os três grupos nas variáveis peso corporal e IMC. Entretanto, na RCQ, só existe diferença significativa entre o grupo obeso, em relação aos grupos sobrepeso e eutrófico, não apresentando diferença entre os grupos sobrepeso e eutrófico.

Na Tabela 3, podemos verificar os parâmetros bioquímicos dos 3 grupos. Onde podemos constatar que não houve diferença estatística na concentração de glicose sanguínea entre os grupos. Porém, o grupo obeso apresentou um aumento significativo da insulina plasmática e do HOMA-IR, em relação ao grupo eutrófico. Em relação ao colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e LDL sanguíneos, não foram

encontradas diferenças estatísticas. Entretanto, o HDL se apresentou menor no grupo obeso, em relação aos grupos eutrófico e sobrepeso.

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos.

	Controle	Sobrepeso	Obeso
n	12	14	8
Sexo F/M	6/6	11/3	2/6
Peso corporal (kg)	57,9 ± 3,5^a	76,7 ± 2,1^b	124,3 ± 17,0^c
Estatura (m)	1,64 ± 0,02^a	1,67 ± 0,02^a	1,76 ± 0,03^b
Idade	23 ± 1	27 ± 1	29 ± 3
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

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

Na Figura 7, podemos verificar uma diminuição da atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPásica}$ a partir do aumento do IMC. Nos grupos sobrepeso e obeso, ocorreu uma significativa redução da atividade ATPásica em relação ao grupo eutrófico e do grupo obeso em relação ao sobrepeso ($n = 8\text{--}14$; eutróficos: $46,5 \pm 4,7$; sobrepesos: $25,5 \pm 2,8$; obeso: $14,1 \pm 3,4 \text{ nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$).

A atividade da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ apresenta um perfil semelhante ao da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, reduzindo sua atividade com o aumento do IMC. Na Figura 8, podemos verificar que a atividade $\text{Na}^+\text{-ATPásica}$ dos grupos sobrepeso e obeso são significativamente menores em relação ao grupo eutrófico, entretanto estes dois

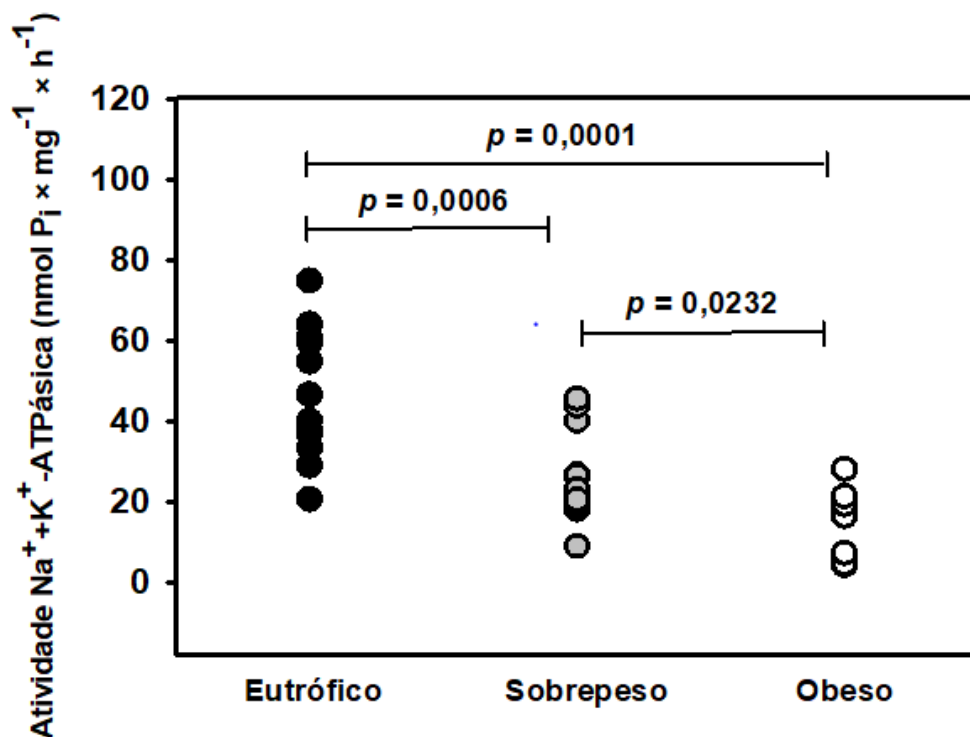
grupos não apresentam diferença entre eles ($n = 3-12$; eutróficos: $36,6 \pm 4,8$; sobrepesos: $15,4 \pm 2,2$; obeso: $8,7 \pm 2,1$ nmol Pi $\times$ mg⁻¹ $\times$ h⁻¹).

Tabela 3. Dados bioquímicos.

	Controle	Sobrepeso	Obeso
n	12	14	8
Glicose (mg/dL)	$96,7 \pm 1,7^a$	$96,1 \pm 1,3^a$	$91,8 \pm 2,7^a$
Insulina (mcU/mL)	$9,4 \pm 1,7^a$	$11,9 \pm 2,3^{ab}$	$17,6 \pm 2,7^b$
HOMA-IR	$2,11 \pm 0,36^a$	$2,80 \pm 0,54^a$	$3,80 \pm 0,52^b$
TG (mg/dL)	$93,4 \pm 13,5^a$	$89,4 \pm 9,2^a$	$141,2 \pm 20,5^a$
CT (mg/dL)	$190,1 \pm 11,1^a$	$202,8 \pm 16,0^a$	$212,5 \pm 12,7^a$
HDL (mg/dL)	$60,9 \pm 4,3^a$	$54,9 \pm 3,4^a$	$44,0 \pm 2,5^b$
LDL (mg/dL)	$110,6 \pm 10,1^a$	$130,0 \pm 16,0^a$	$140,3 \pm 11,6^a$
Na ⁺ Plasmático (mEq/L)	$139,9 \pm 0,3^a$	$141,1 \pm 0,9^a$	$140,5 \pm 1,0^a$
K ⁺ Plasmático (mEq/L)	$4,4 \pm 0,1^a$	$4,4 \pm 0,2^a$	$4,5 \pm 0,1^a$

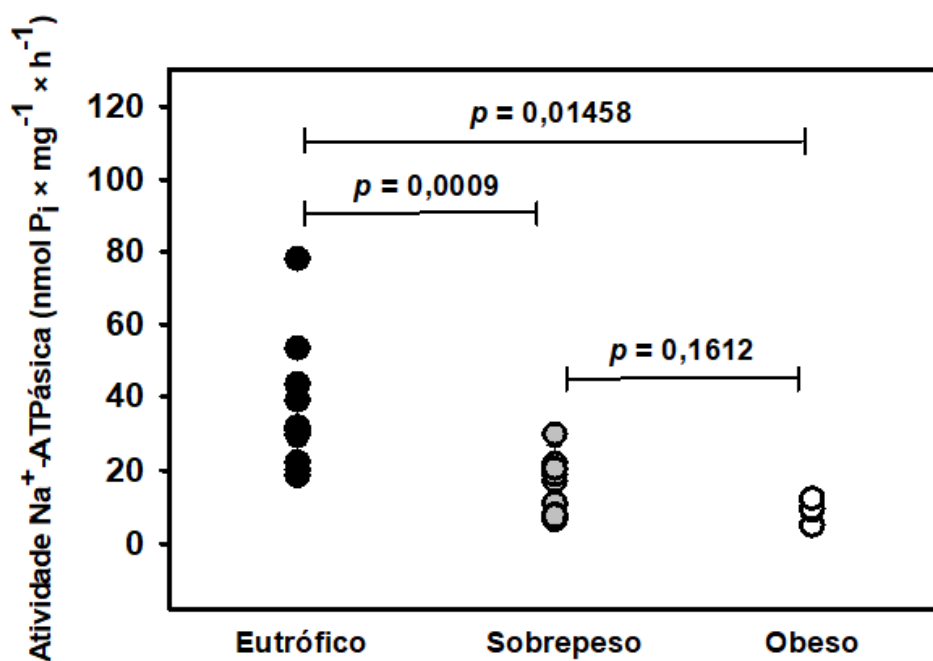
Letras diferentes representam diferença significativa em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

Figura 7. A atividade $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPásica de membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.



Os resultados são mostrados como média $\pm$ erro padrão ($n = 8-14$). Os valores de p são mostrados no gráfico e considerados significativos quando menores que 0,05.

Figura 8. A atividade Na^+ -ATPásica de membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.

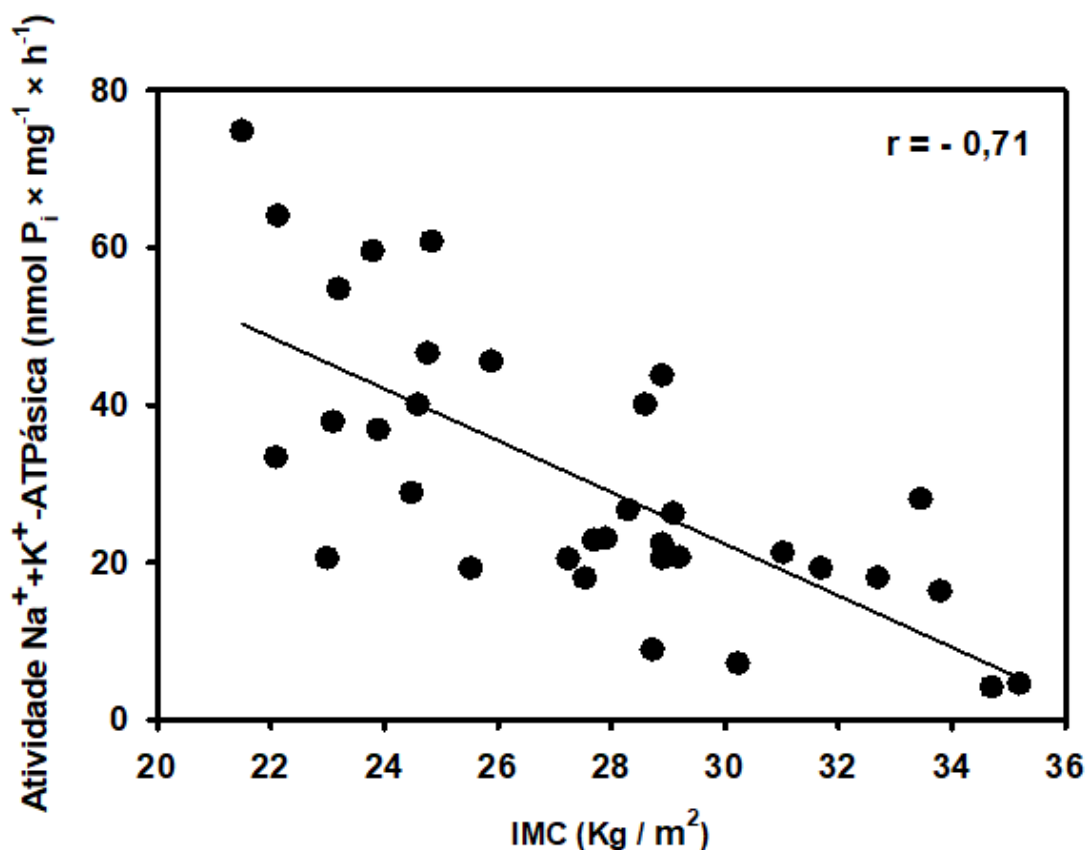


Os resultados são mostrados como média $\pm$ erro padrão ($n = 3-12$). Os valores de p são mostrados no gráfico e considerados significativos quando menores que 0,05.

Na Figura 9, podemos verificar uma forte correlação negativa entre o IMC e a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, pelo coeficiente de correlação de *Pearson* ($r = -0,71$). Enquanto na Figura 10, podemos ver uma correlação moderada entre a RCQ e a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ ($r = -0,62$).

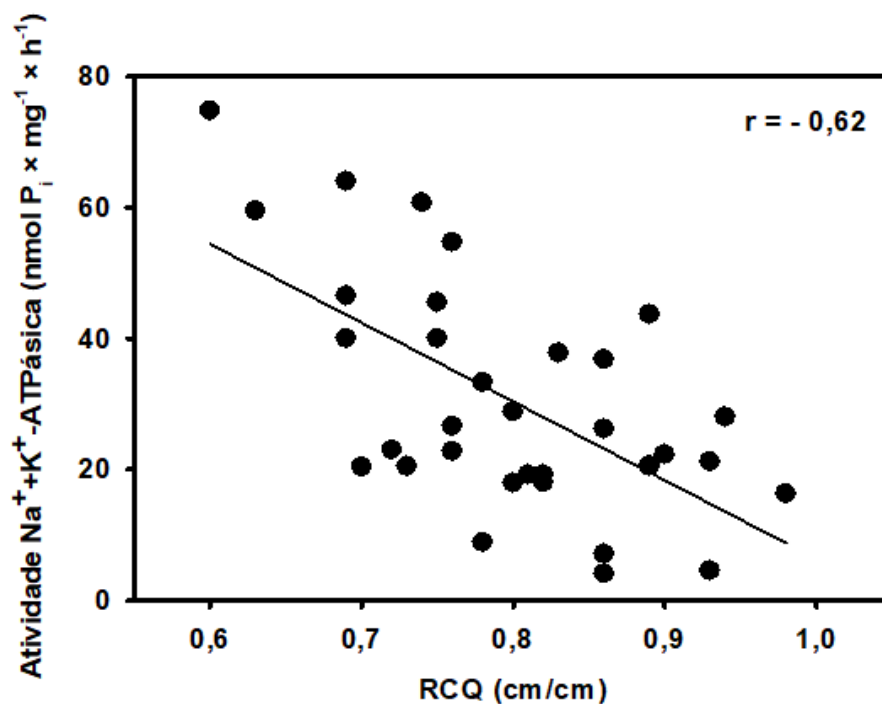
Nas Figuras 11 e 12, são mostradas as correlações entre a atividade de $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ e o IMC e a RCQ, respectivamente. A atividade $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, apresentou uma correlação negativa moderada entre o IMC ($r = -0,63$) e a RCQ ($r = -0,56$).

Figura 9. Correlação entre a atividade $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ de membranas de eritrócitos com o IMC.



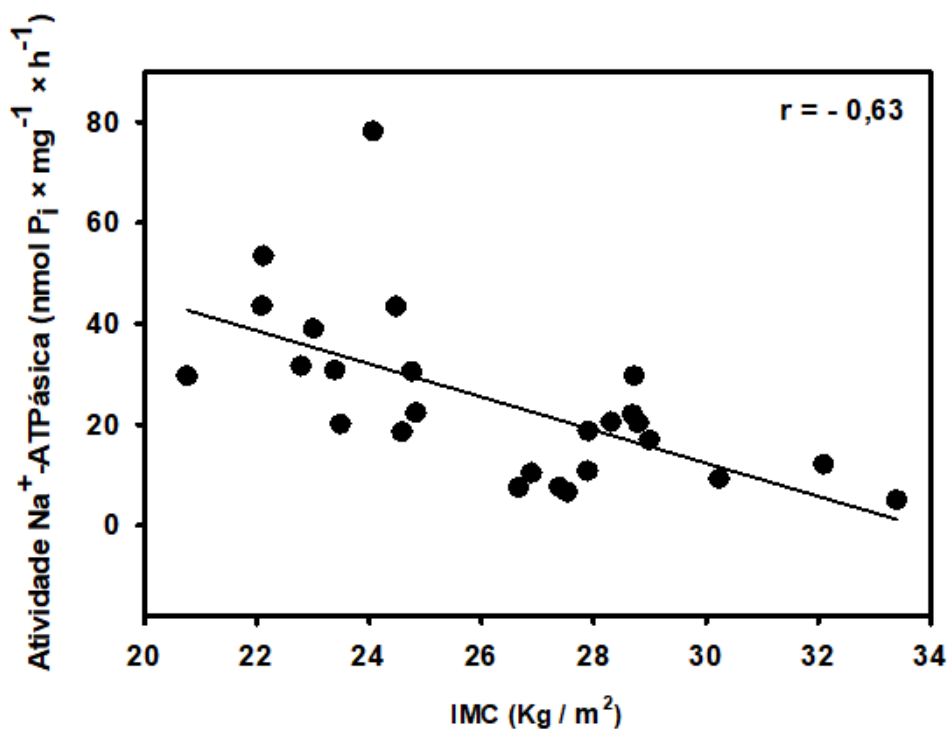
A correlação foi dada a partir do cálculo do coeficiente de correlação de *Pearson* ($n = 34$).

Figura 10. Correlação entre a atividade $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPásica de membranas de eritrócitos com a RCQ.



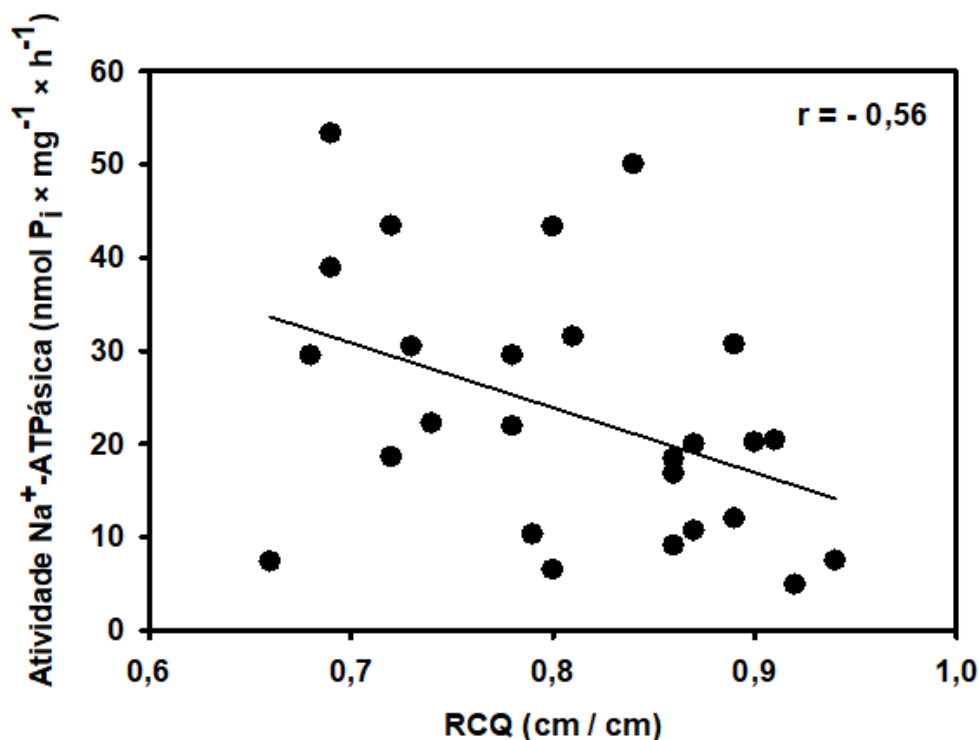
A correlação foi dada a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ($n = 34$).

Figura 11. Correlação entre a atividade Na^+ -ATPásica de membranas de eritrócitos com o IMC.



A correlação foi dada a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ($n = 26$).

Figura 12. Correlação entre a atividade Na^+ -ATPásica de membranas de eritrócitos com a RCQ.



A correlação foi dada a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ($n = 26$).

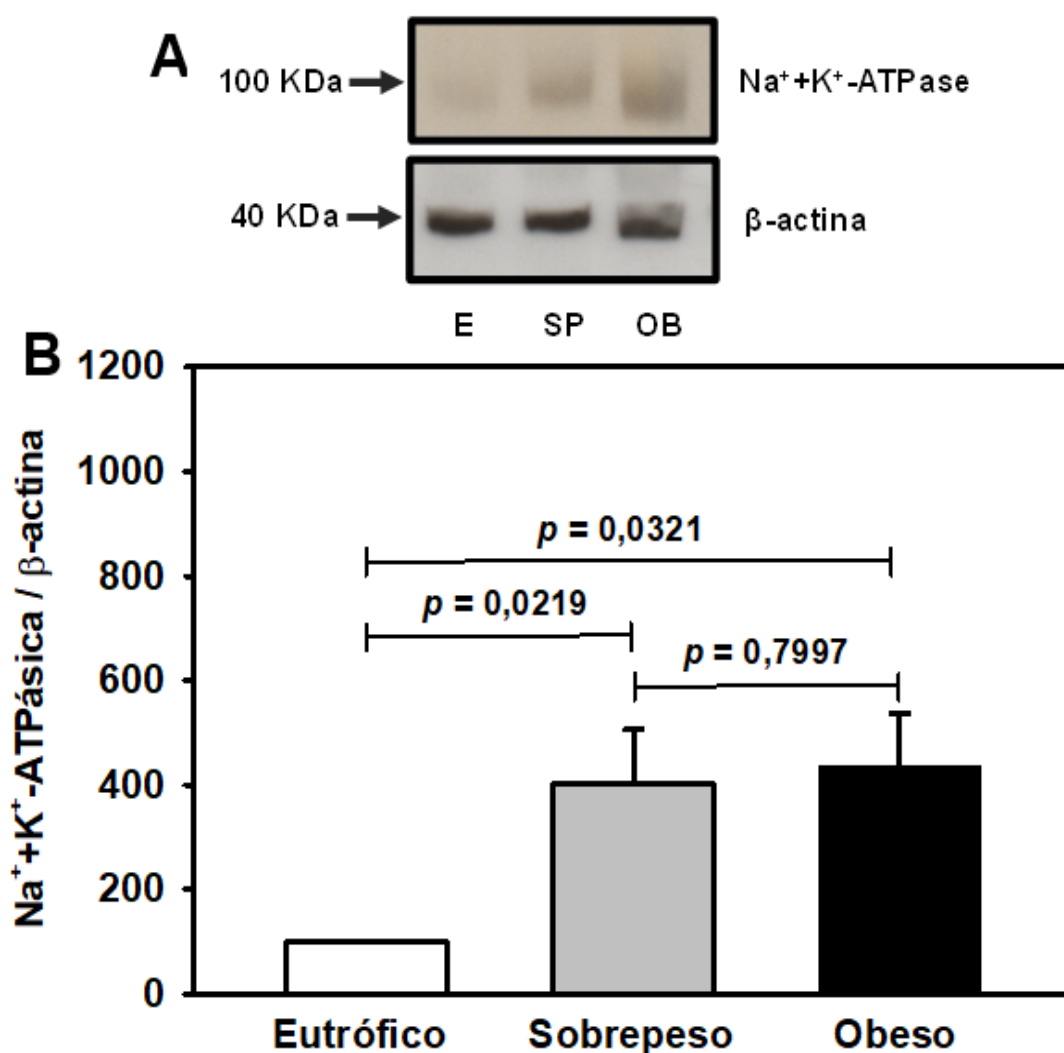
Os experimentos mostrados na Figura 13, tem como objetivo mostrar a quantidade de Na^+/K^+ -ATPase nas membranas de eritrócitos nos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso. Podemos verificar que ocorreu um aumento na quantidade de cópias de Na^+/K^+ -ATPase nas membranas de eritrócitos dos grupos sobrepeso e obesos em relação aos eutróficos (aumento de 3X). Entretanto, entre eles não ocorre diferença significativa.

Na Figura 14, podemos observar que a obesidade e o sobrepeso levam a um aumento na quantidade de receptores AT_1 (sobrepeso com aumento de 60% e obeso com aumento de 80% em relação ao grupo de eutróficos). Enquanto a quantidade de receptores AT_2 não é alterada de forma significativa pela obesidade e o sobrepeso (Figura 15).

Os experimentos mostrados nas Figuras 16 e 17 mostram a quantidade aumentada de proteínas kinases $\text{C}\alpha$ e A. Na Figura 16 podemos verificar que os indivíduos obesos e com sobrepeso apresentam um aumento significativo, de aproximadamente 4 a 5 vezes, na quantidade de cópias de $\text{PKC}\alpha$. Na Figura 16,

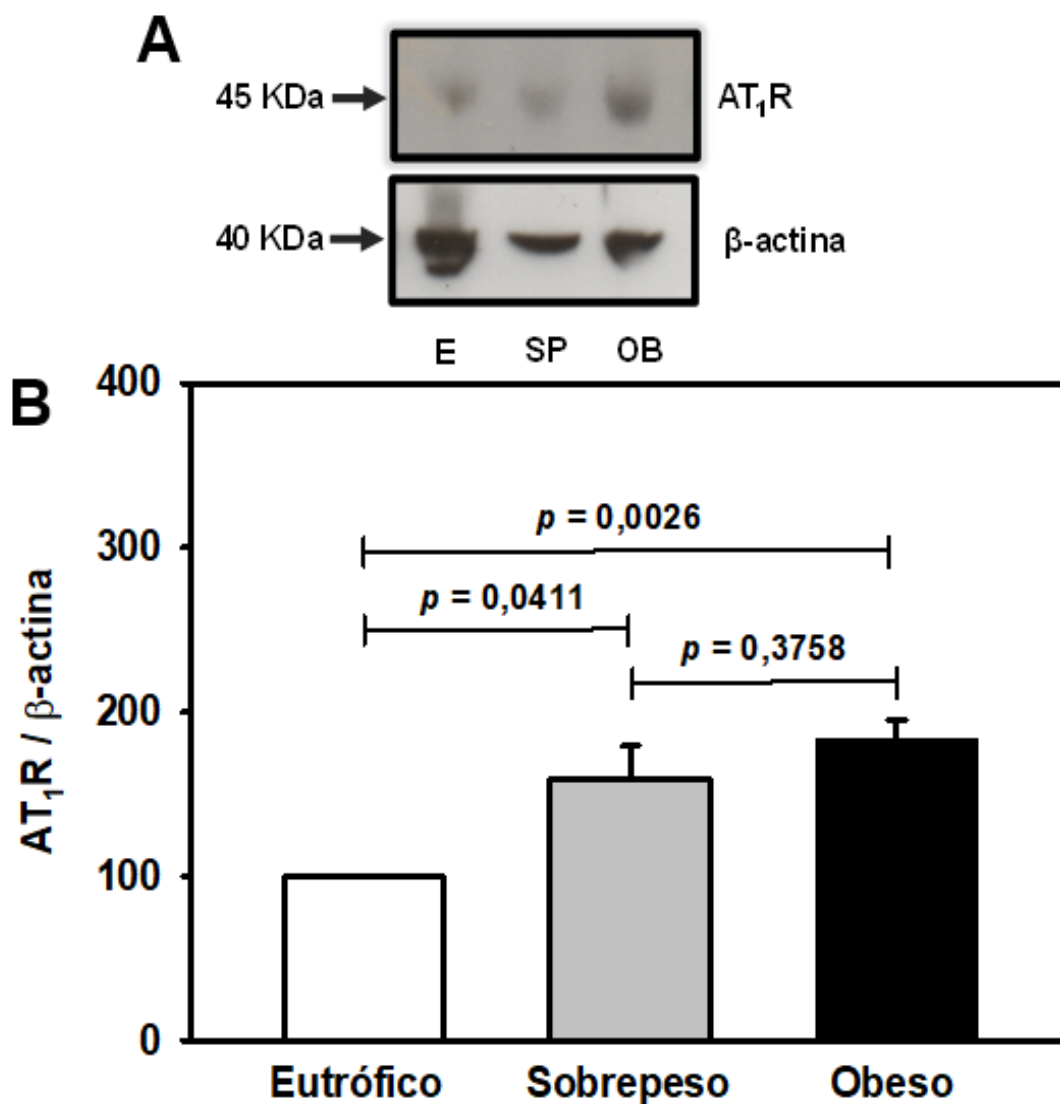
podemos observar que a quantidade de cópias de PKA aumentou significativamente no grupo de sobrepesos (100 %) e no grupo de obesos este aumento foi ainda mais expressivo (200 %).

Figura 13. Aumento do número cópias de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ nas membranas de eritrócitos nos grupos eutrófico, sobrepeso e obeso.



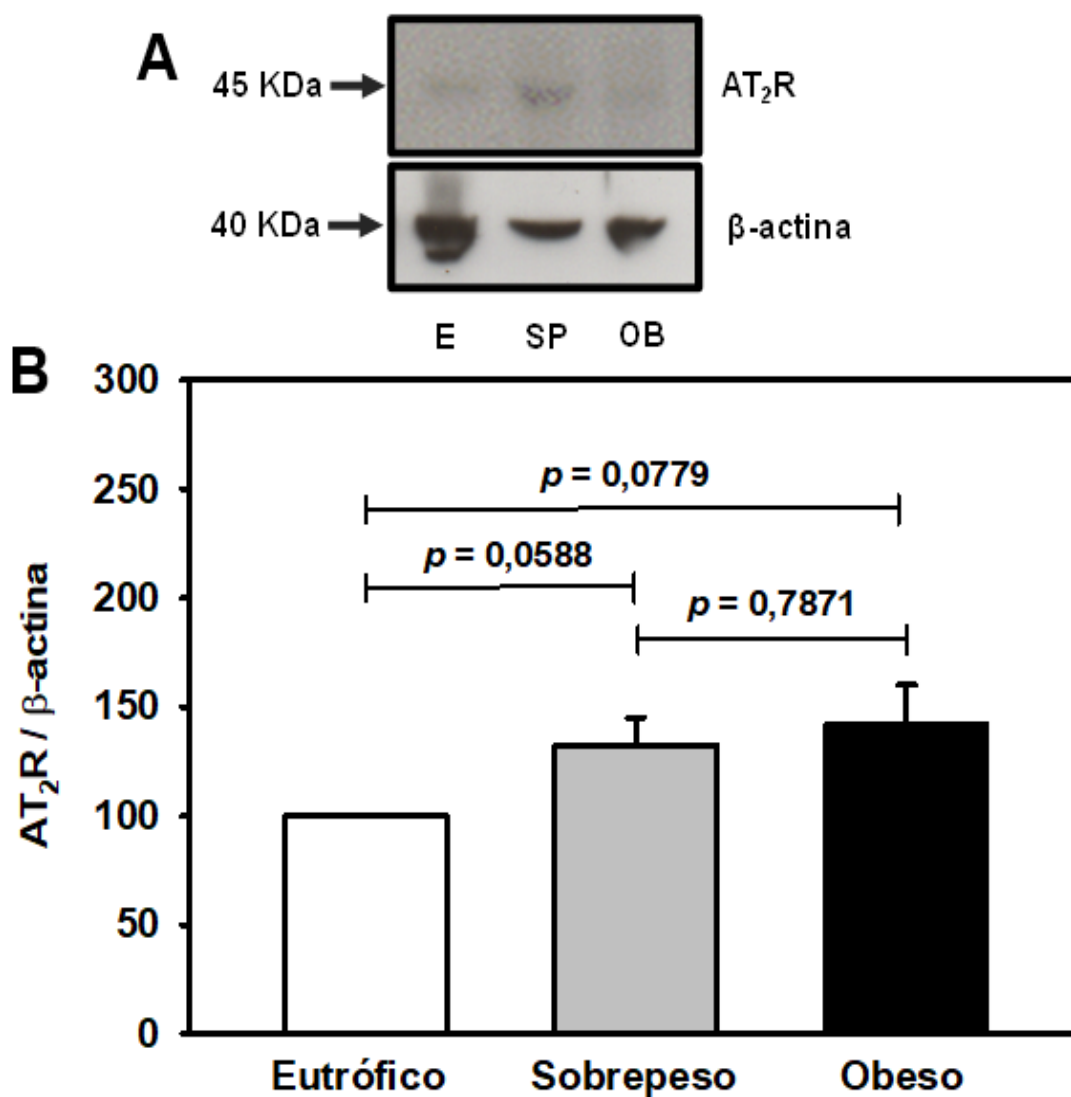
O painel A, mostra uma imunodeteccção da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ representativa da média dos experimentos. A $\beta\text{-actina}$ foi utilizada como controle de carregamento para quantificação das imunodeteccções. Os resultados são mostrados como média $\pm$ erro padrão ($n = 3$) (painel B). Os valores de p são mostrados no gráfico e considerados significativos quando menores que 0,05.

Figura 14. Aumento do número de cópias de receptores AT₁ nas membranas de eritrócitos de eutróficos, pessoas com sobrepeso e obesos.



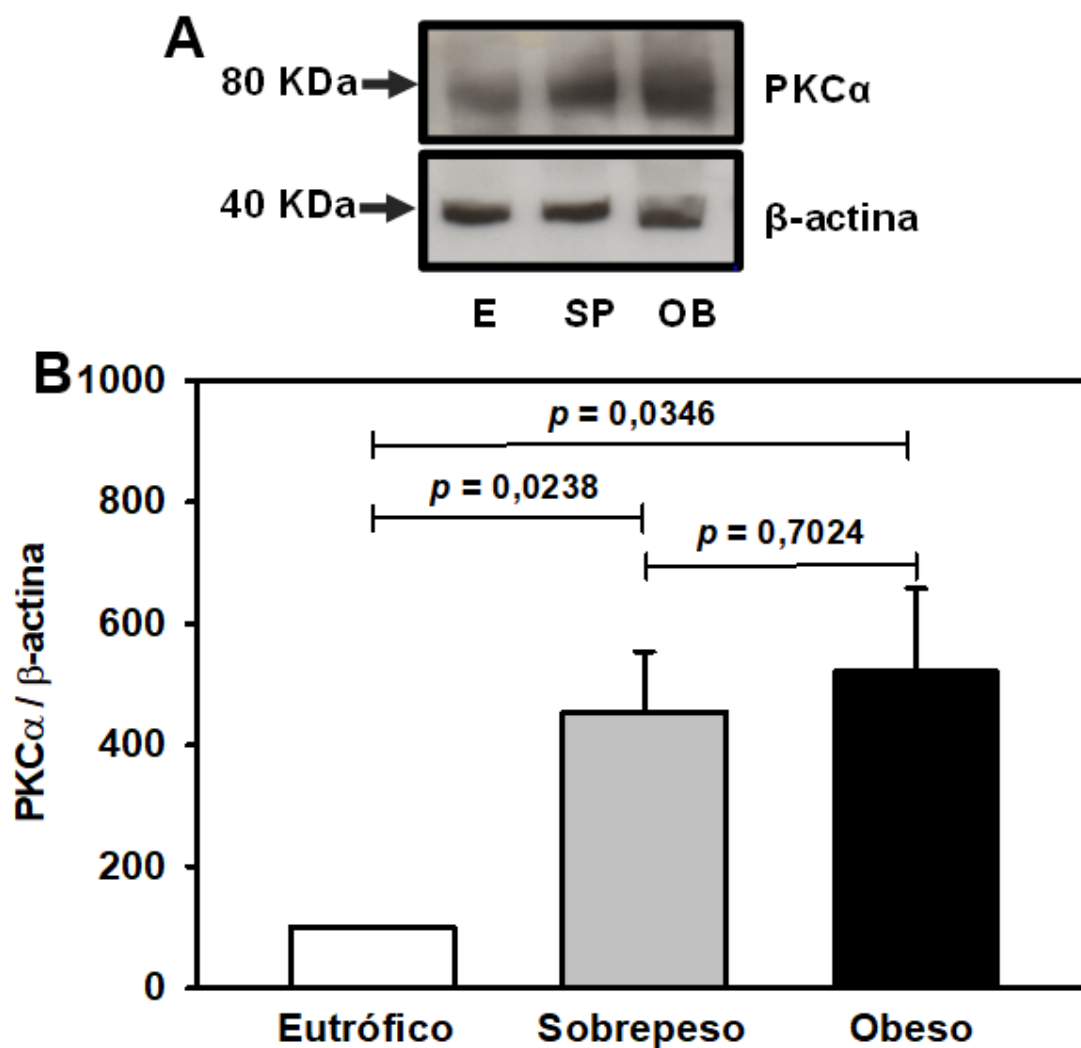
O painel A, mostra uma imunodeteção do receptor AT₁ representativa da média dos experimentos. A β-actina foi utilizada como controle de carregamento para quantificação das imunodeteções. Os resultados são mostrados como média ± erro padrão (n = 3) (painel B). Os valores de *p* são mostrados no gráfico e considerados significativos quando menores que 0,05.

Figura 15 Aumento do número de cópias de receptores AT₂ nas membranas de eritrócitos de eutróficos, pessoas com sobrepeso e obesos.



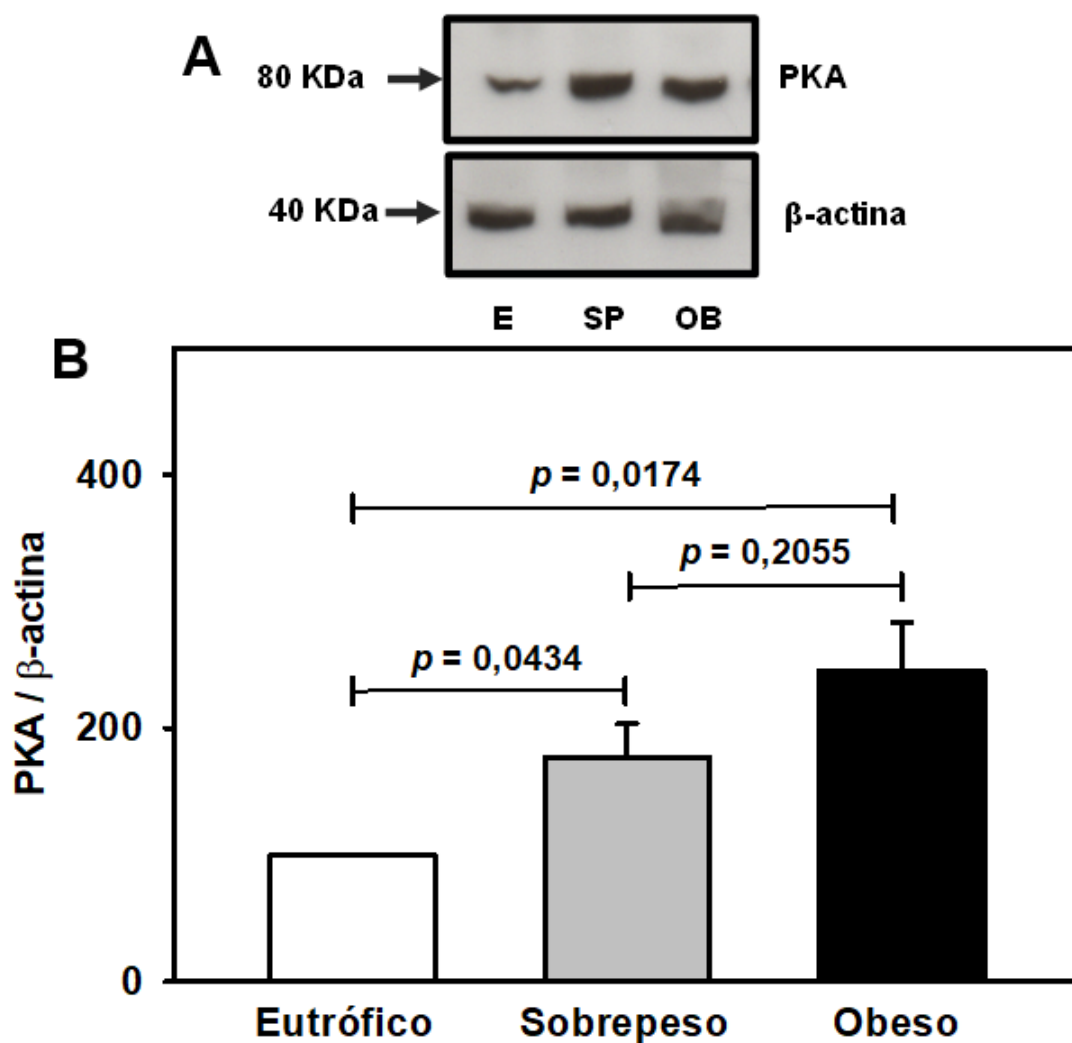
O painel A, mostra uma imunodeteção do receptor AT₂ representativa da média dos experimentos. A β-actina foi utilizada como controle de carregamento para quantificação das imunodeteções. Os resultados são mostrados como média ± erro padrão (n = 3) (painel B). Os valores de *p* são mostrados no gráfico e considerados significativos quando menores que 0,05.

Figura 16. Aumento do número de cópias de PKC α nas membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.



O painel A, mostra uma imunodeteção de PKC α representativa da média dos experimentos. A β -actina foi utilizada como controle de carregamento para quantificação das imunodeteções. 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.

Figura 17. Aumento do número de cópias de PKA nas membranas de eritrócitos de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos.



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

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a obesidade e o sobrepeso aumentaram de forma significativa no mundo, tornando-se um problema de saúde pública mundial. Devido ao alto custo

para tratamento da obesidade, que pode ocorrer de forma direta ou de suas comorbidades. Dentre as principais comorbidades podemos citar a DM2, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e renais, entre outras (HALL et al., 2020).

Este trabalho teve como principal objetivo verificar possíveis modificações na atividade das ATPases transportadoras de sódio de membranas de eritrócitos e nas vias ativadas por Ang II em indivíduos com sobrepeso e obesidade. Pois, devido as modificações metabólicas e hormonais geradas pela obesidade, vários eixos hormonais estão alterados, como também, ocorrem constantes alterações do equilíbrio hidroeletrolítico (CHOE et al., 2016). Com isso, os transportadores ativos primários de Na^+ e o SRAA seriam importantes alvos a serem investigados para descoberta de novos biomarcadores nesta condição, nos permitindo detectar alterações iniciais para um tratamento preventivo da doença, evitando suas consequências ou de suas comorbidades como, por exemplo, a hipertensão arterial.

A amostra utilizada foi composta por 34 indivíduos, classificados em três grupos a partir de seu IMC. A RCQ foi utilizada pois o IMC, apesar de ser utilizado mundialmente como parâmetro para classificar parâmetros de modificação de massa corporal, ele não indica a localização do tecido adiposo e o acúmulo de tecido adiposo visceral (gordura abdominal) é um fator de risco para as comorbidades causadas pela obesidade (FARB, GOKCE, 2015).

Na obesidade, a atividade simpática e os componentes do SRAA estão hiperativados, estes fatores estão associados ao aparecimento da hipertensão arterial associada a obesidade (JIANG et al., 2016). Apesar da grande probabilidade do desenvolvimento de hipertensão arterial, os indivíduos obesos e com sobrepeso apresentaram pressão arterial dentro da normalidade (Tabela 2), este fato indicaria uma fase inicial da doença, onde suas comorbidades ainda não se desenvolveram totalmente.

Apesar dos indivíduos obesos e com sobrepeso ainda não apresentarem hipertensão arterial, eles já apresentam alterações metabólicas e hormonais importantes, características desta doença. Podemos verificar este fato na Tabela 3, onde os indivíduos obesos apresentaram redução de HDL-c, aumento das concentrações de insulina e aumento significativo do HOMA-IR. Estas alterações são vistas em obesos e são padrões para inferir o possível desenvolvimento de doenças

cardiovasculares, síndrome metabólica ou diabetes tipo 2, por exemplo (ZORENA et al., 2020).

O aumento do HOMA-IR e o aparecimento da hiperinsulinemia, são indicativos iniciais da falta de sensibilidade a insulina, levando ao aumento de sua concentração com o intuito de compensar essa insensibilidade. Entretanto, devido a exacerbação de seus efeitos em tecidos que não foram afetados, podem ocorrer diversas outras modificações no organismo. Estes mecanismos que levam a falta de sensibilidade a insulina ainda não foram totalmente esclarecidos, mas podemos relacionar por exemplo, ao acúmulo de lipídios em vasos, efeito inibitório na oxidação de lipídios, de glicose e aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias (como a leptina) (STEPPAN et al., 2001; ORMAZABAL et al., 2018).

Em vários modelos experimentais, uma das características mais marcantes da hipertensão arterial associada a obesidade seria a hiperatividade do SRAA, aumento de reabsorção renal de Na^+ e aumento da contratilidade de vasos sanguíneos (HALL et al., 2020). Este sistema é o principal modulador do balanço hidroeletrolítico e da pressão arterial a longo prazo (HALL et al., 2020). O SRAA, além destas funções no rim, também modula muitas funções celulares e teciduais que podem abranger ativação do sistema imunológico, modulação da vasomotilidade, produção de radicais livres e aumento da atividade de transportadores ativos primários de sódio renais (HALL et al., 2020; LU, AKANJI, 2020).

No rim, as ATPases transportadoras de Na^+ , são moduladas pelos peptídeos gerados pelo SRAA. Estes peptídeos apresentam efeitos diversos sobre estas ATPases, podendo apresentar tanto efeitos de ativação, como é o caso da Ang II, quando efeitos inibitórios, causados pela Ang-(1-7) e Ang-(3-4) (DIAS et al., 2014; SILVA et al., 2014; FORRESTEN et al., 2018). A Ang II é o peptídeo mais estudado deste sistema, podendo se ligar a dois receptores, o AT_1 e o AT_2 . No caso dos transportadores ativos primários de sódio renais ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ e $\text{Na}^+\text{-ATPase}$), a Ang II quando ligada ao receptor AT_1 promove um efeito de ativação e quando ligada ao AT_2 um efeito inibitório.

Em diversos modelos que levam a hipertensão arterial, ocorre um desbalanço na quantidade de receptores AT_1 e AT_2 , essa alteração é traduzida pelo aumento da quantidade de receptor AT_1 e diminuição de AT_2 , levando então, a um status hipertensivo, pois ocorre um incremento na quantidade do receptor que leva ao aumento da reabsorção renal de Na^+ e aumento da contratilidade de vasos. Enquanto

seu receptor antagonista, o AT_2 , tem seu número de cópias reduzidas (LUZARDO et al., 2011; SILVA et al., 2014; LUZES et al., 2020). Nos eritrócitos, o papel da Ang II no transporte de Na^+ é pouco estudado, entretanto, sabe-se que o receptor AT_1 apresenta um papel importante na proteção por hemólise em ambientes hiposmóticos (GUIMARÃES-NOBRE et al., 2021). Esse fato indicaria uma possível ativação de transportadores de Na^+ no eritrócito.

Mostramos que os transportadores ativos primários de Na^+ no eritrócito estão significativamente reduzidos (Figuras 7 e 8). Alguns estudos mostram a redução da atividade da Na^+K^+ -ATPase em membranas de eritrócitos de indivíduos obesos e com hipertensão arterial (CHEN, LIN-SHIAU, 1988; AMAIDEN et al., 2014). Entretanto, a atividade da Na^+ -ATPase nunca foi mostrada nestes grupos. Semelhante ao que ocorreu com Na^+K^+ -ATPase, a atividade da Na^+ -ATPase também se mostrou reduzida nas membranas de eritrócitos dos indivíduos obesos e com sobrepeso. Este achado mostra que tanto a atividade da Na^+ -ATPase quanto a da Na^+K^+ -ATPase são bons indicativos de alterações promovidas pela obesidade, pois estas ATPases apresentam uma correlação inversa forte com IMC e com RCQ (Figuras 9-12).

A redução da atividade da Na^+K^+ -ATPase também ocorre em cardiomiócitos de ratos com hipertensão arterial, mostrando que outros órgãos podem ter a atividade das ATPases transportadoras de Na^+ alteradas de forma semelhante na hipertensão arterial (CLOUGH et al., 1985).

Um importante achado é que possivelmente está ocorrendo algum tipo de modulação regulatória da atividade da Na^+K^+ -ATPase (Figura 13), pois apesar da diminuição de sua atividade, sua quantidade está aumentada. Esta diminuição de atividade pode estar relacionada a fosforilações regulatórias anormais causadas pela obesidade e o sobrepeso (SILVA et al., 2014).

Na hipertensão arterial associada a obesidade e em outros modelos de hipertensão este mecanismo e de certa forma comum (DIAS et al., 2014, SILVA et al., 2015; LUZES et al., 2020). Entretanto, no eritrócito a função destas ATPases não é a mesma das encontradas no rim. No eritrócito, célula que esta suscetível a modificações iônicas constantes, estes transportados são responsáveis por manter o volume celular e o equilíbrio das concentrações de sódio para sobrevivência da célula (GALLAGHER, 2017).

Em relação aos receptores de Ang II, importantes moduladores das ATPases transportadoras de Na^+ , verificamos que os receptores AT_1 aumentam nas

membranas de eritrócitos em relação aos indivíduos eutróficos, característica de um perfil encontrado em diferentes órgãos e diferentes modelos experimentais de animais hipertensos (SIMON et al., 1989; LUZARDO et al., 2011; LUZES et al., 2021). É importante salientar que alguns experimentos funcionais com antagonistas destes receptores devem ser realizados futuramente para verificar a funcionalidade destes receptores. A quantidade de receptores AT_2 , não apresentou modificação significativa, sugerindo que as alterações podem ter seu foco principal nos receptores AT_1 .

No rim, a Ang II quando ligada ao receptor AT_1 , vai ativar uma via intracelular acoplada a uma PKC, que vai fosforilar as ATPases transportadoras de Na^+ , promovendo seu aumento de atividade (RANGEL et al., 2005). O papel destas ATPases no rim é promover a reabsorção de sódio, outros íons e nutrientes que também serão reabsorvidos a partir do gradiente de sódio. Em relação ao AT_2R , suas funções são antagônicas em relação ao receptor AT_1 , sendo acoplado a uma PKA. Em relação aos eritrócitos essa modulação é pouco conhecida.

Nas Figuras 16 e 17, verificamos que tanto a quantidade de $PKC\alpha$ como de PKA estão aumentadas. A $PKC\alpha$ está relacionada a via de AT_1 e a da PKA relacionada a de AT_2 . Neste caso devem ser realizados experimentos funcionais para mensurar a atividade destas kinases, pois a princípio o efeito prevalente seria o da PKA.

A atividade da Na^+ -ATPase foi verificada pela primeira vez em eritrócitos de indivíduos obesos. Em células renais e em cardiomiócitos, esta ATPase tem com papel principal o ajuste fino do transporte de sódio, tendo sua atividade menor do que a da Na^+K^+ -ATPase. Tanto sua atividade quando sua modulação por Ang II, são diferentes da Na^+K^+ -ATPase, ela apresenta uma modulação mais rápida por Ang II e a via intracelular também é diferente (APERIA et al., 1994). Mais estudos são necessários para mensurar a modulação das ATPases transportadoras de Na^+ de membranas de eritrócitos por Ang II e sua interação com a PKC e PKA na obesidade.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que a obesidade e o sobrepeso levam a modificações das atividades da Na^+K^+ -ATPase e da Na^+ -ATPase, como também de componentes do SRAA localizados nas membranas de eritrócitos. Estas modificações bioquímicas seriam um reflexo de alterações hormonais que

levariam a modificações na homeostase de sódio que consequentemente levariam a geração de hipertensão arterial associada a obesidade. Mais experimentos devem ser realizados para identificar os mecanismos alterados nestes eritrócitos e qual seriam suas verdadeiras funções. A redução na atividade da Na^+ -ATPase e a Na^+ + K^+ -ATPase de eritrócitos seriam importantes biomarcadores para sinalizar modificações iniciais que levariam a hipertensão arterial e a outras comorbidades associadas a obesidade.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMAIKEN, M. R., et al. Effects of detyrosinated tubulin on Na^+ , K^+ ATPase activity and erythrocyte function in hypertensive subjects. Elsevier., v. 589, p. 364–373, 2015.
- APERIA, A., et al. Activation/deactivation of renal Na^+ , K^+ -ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. The FASEB Journal., v. 8, n. 6, 1994.
- ARROYO, J. P., et al. Nedd4-2 modulates renal Na^+ - Cl^- cotransporter via the aldosterone-SGK1- Nedd4-2 pathway. Journal of the American Society of Nephrology., v. 22, n. 9, p. 1707-1719, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA. Consenso Latino-Americano em Obesidade. Documentos. C2. Copyright@2001 e Health Latin America Rio de Janeiro: ABESO, 2019.
- BARTELT, A., HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. Nat. Rev. Endocrinol.; v. 10, p. 24–36, 2014.
- BAYS, H. Adiposopathy, “sick fat,” Ockham’s razor, and resolution of the obesity paradox. Curr Atheroscler Rep.; v. 16, p. 409, 2014.
- BHASKARAN, K., et al., Association of BMI with overall and cause-specific mortality: a population-based cohort study of 3,6 million adults in the UK. Lancet Diabetes Endocrinol; v. 6, p. 944–53, 2018.
- BOMBACK, A. S., et al. Dual Blockade of the Renin– Angiotensin– Aldosterone System: Beyond the ACE Inhibitor and Angiotensin-II Receptor Blocker Combination. American Journal of Hypertension, v. 22, n. 10, p. 1032–1040, 2009.
- BRUGNARA, C. Erythrocyte membrane transport physiology. Curr Opin Hematol.; v. 4, p. 122-127, 1997.
- CAMPBELL, D.J. Clinical Relevance of Local Renin Angiotensin Systems. Front Endocrinol (Lausanne). v. 5, p. 113-115, 2014.
- CANESSA, M., et al. The $\alpha 1$ Na^+ - K^+ pump of the Dahl salt-sensitive rat exhibits altered Na^+ modulation of K^+ transport in red blood cells. J. Membran Biol. V. 134, p. 107–122, 1993.
- CHAGNAC, A., et al. The Effects of Weight Loss on Renal Function in Patients with Severe Obesity. J Am Soc Nephrol, v. 14, p. 1480–1486, 2003.
- CHEN, C. C.; LIN-SHIAU, S. Y. (Na^+ - K^+) ATPase activity in erythrocyte membranes of spontaneously, one kidney-one wrapped, and deoxycorticosterone acetate-- NaCl hypertensive rats. Biochem Pharmacol., v. 37, n. 9, p. 1661-6, 1988.

CHOE, S. S., et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol.*, v. 7, 2016.

CLOUGH, D. L., et al. Myocardial (Na⁺,K⁺)-ATPase activity in Dahl salt-sensitive and resistant rats. *Clin Exp Hypertens.*; v. 7, p. 573-584, 1985.

COHEN, J. B. Hypertension In Obesity And The Impact Of Weight Loss. *Curr Cardiol Rep.*; v. 19, n. 10, p. 98, 2018.

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

DATTILO, V., et al. The emerging role of SGK1 (Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1) in major depressive disorder: hypothesis and mechanisms. *front. genet.*, v. 11, n. 11, 2020.

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

DE PAULA R.B., et al. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. *Hypertension*. v 43, p. 41-47, 2004.

DE SOUZA, A. M., et al. Angiotensin II And Angiotensin-(1–7) Inhibit The Inner Cortex Na⁺-ATPase Activity Through AT₂ Receptor. *Regulatory Peptides.*, V. 120, N. 1–3, P. 167-175, 2004.

DIAS J, et al. Ang-(3–4) inhibits renal Na⁺-ATPase in hypertensive rats through a mechanism that involves dissociation of Ang II receptors heterodimers and PKA. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014.

DUDENBOSTEL, T.; CALHOUN, D. A. Use of Aldosterone Antagonists for Treatment of Uncontrolled Resistant Hypertension. *American Journal of Hypertension*, v. 30, n. 2, p. 103–109, 2017).

DUNCAN, A. B. B.; et al. Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseadas em evidências. Porto Alegre. Artmed. 3. ed. 2004.

ENES, C. C.; SLATER, B. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. *Revista Brasileira Epidemiológica*. São Paulo, v.13, n.1, p. 163-171, 2010.

ENGELI, S., et al. Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension.*; v. 45, p. 356–362, 2005.

FARB, M. G.; GOKCE, N. Visceral adiposopathy: a vascular perspective. *Horm Mol Biol Clin Investig.*, v. 2, p. 125-36, 2015.

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

FERREIRA, A. P. S.; et al. Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Rev Bras Epidemiol.* 2019.

FIRESTONE, G. L. Importin- α Mediates the Regulated Nuclear Targeting of Serum- and Glucocorticoid-inducible Protein Kinase (Sgk) by Recognition of a Nuclear Localization Signal in the Kinase Central Domain. *Molecular Biology of the Cell*, v. 14, p. 1221–1239, 2003.

FRANCISCETTI, E. A., GENELHU, V. A. Obesity-hypertension: an ongoing pandemic. *Int J Clin Pract.*; v. 61, p. 269–80, 2007.

GALLAGHER, P. G. Blood First Edition Paper, prepublished online., 2017.

GELONEZE, B; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v.50, n. 2, 2006.

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.

GONÇALVES, G. M. R.; SILVA, E. N. D. Cost of chronic kidney disease attributable to diabetes from the perspective of the Brazilian Unified Health System. *PLoS One.*; v. 13, n. 10, 2018.

GOODFRIEND, T. L., CALHOUN, D. A. Resistant hypertension, obesity, sleeps apnea, and aldosterone: theory and therapy. *Hypertension.*; v. 43, p. 518–24, 2004.

GUIMARÃES-NOBRE, C. C., et al., Signaling Pathway in the Osmotic Resistance Induced by Angiotensin II AT₂ Receptor Activation in Human Erythrocytes. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, v. 10, n. 2, 2021.

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

HOFFMANN, E. K.; LAMBERT, I. H; PEDERSEN, S. F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.*; v. 89, p. 193-277, 2009.

JASENOVEC, T., et al. Angiotensin System Modulations in Spontaneously Hypertensive Rats and Consequences on Erythrocyte Properties; Action of MLN-4760 and Zofenopril. *Biomedicines*, v. 9, n. 1902, 2021.

JIANG S. Z. et al. Obesity and hypertension. *Experimental and Therapeutic Medicine*. v. 6, p. 2395-2399, 2016.

LOU, Y., et al. Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase 1 in Sodium Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1307; 2016.

LU, S. C.; AKANJI, A. O. Leptin, Obesity, and Hypertension: A Review of Pathogenetic Mechanisms. *Metab Syndr Relat Disord.*, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2020.

LUZARDO, R., et al. Metabolic Programming during Lactation Stimulates Renal Na⁺ Transport in the Adult Offspring Due to an Early Impact on Local Angiotensin II Pathways. *PLoS One.*, v. 6, n. 7, 2011.

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.*, v. 1867, n. 3, 2021.

LUZES, R., et al. angiotensin-(3–4) modulates angiotensin converting enzyme 2 (ace2) downregulation in proximal tubule cells due to overweight and undernutrition: implications regarding the severity of renal lesions in covid-19 infection. *BIORXIV*; 2020.

MALTA, D. C.; et al. Prevalence of high blood pressure measured in the Brazilian population, National Health Survey, 2013. *São Paulo Med J.*, v. 134, n. 2, p. 163–70, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel Brasil 2018 - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília: Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis; 2019.

NAMAZI, G., et al. Increased membrane lipid peroxidation and decreased Na⁺/K⁺-ATPase activity in erythrocytes of patients with stable coronary artery disease. *Coronary Artery Disease* v. 26, p. 239–244, 2015).

NILSON, E. A. F., et al. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 43, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesidade: Prevenindo e Controlando a Epidemia Global. São Paulo: Roca, 2006.

ORMAZABAL, V., et al. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, v. 17, n. 122, 2018.

PATEL, S., et al., Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy.*, v. 94, p. 317–325, 2017.

RAHMOUNI, K., et al. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension.*; v. 45, p. 9–14, 2005.

RANGEL, L. B., et al. PI - PLC beta is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. *Regul. Pept.*, v. 127, p. 177-182, 2005.

ROBLES, R. G., et al. Effects of captopril on sympathetic activity, lipid and carbohydrate metabolism in a model of obesity-induced hypertension in dogs. *Am J Hypertens.*; v. 6, p. 1009–105, 1993.

RUMANTIR, M. S., et al. Neural mechanisms in human obesity related hypertension. *J Hypertens.*; v. 17, p. 1125–33, 1999.

SAYDAH, S., et al. Trends in Cardiovascular Disease Risk Factors by Obesity Level in Adults in the United States, NHANES 1999-2010. *Obesity (Silver Spring)*., v. 22, n. 8, p. 1888–1895, 2014.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiro de Cardiologias., v. 107, n. 3, 2016.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018. São Paulo: Clannad; 2017. SEABRA, A.L.R.

SILVA, P. A., et al. Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. *PLOS ONE*, v. 9, n. 7, 2014.

SILVERTHORN, D. Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada, 7ª Edição, Artmed, 2017.

SIQUEIRA, A. S. E., et al. Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil. *Arq Bras Cardiol.*; v. 109, n. 1, p. 39-46, 2017.

SIMON, J. K., et al. Renal denervation alters forebrain hexokinase activity in neurogenic hypertensive rats. *American journal of physiology*. v. 256, n. 4, 1989.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDRIATRIA (SBP) e colaboradores. Obesidade na Infância e adolescente: Manual de Orientação. Departamento de Nutrologia, p. 116, 2008.

STEPPAN, C. M., et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, v. 409, p. 307–312, 2001.

STEWART G.W., TURNER E.J.H. The hereditary stomatocytoses and allied disorders: congenital disorders of erythrocyte membrane permeability to Na and K. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. v 12, p. 707-727, 1999.

TOSTESON, D. C.; HOFFMAN, J. F. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol.*; v. 44, p. 169-194, 1960.

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.

TRINDADE, S. B. Avaliação dos transportadores ativos primários de sódio de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso. Dissertação. 2020.

UMEMURA, S., et al. Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J. Hypertens*; v. 10, p. 629–33, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: prevent - ing and managing the global epidemic. Gene - va: World Health Organization, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tackling NCDs - "Best buys" and other recommended interventions for the prevention and control of noncommunicable diseases. Geneva: WHO; 2017.

YOON, Y., S., et al. Erythrocyte Na⁺-K⁺ ATPase Activity in the Genesis of Reducing Renal Mass in Hypertensive Rats. *Korean J Intern Med*. V. 1(2), p.185-193, 1986.

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

ZORENA, K., et al. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. *Int J Mol Sci.*; v.21, n. 10, p. 3570, 2020.

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 componentes do sistema renina angiotensina aldosterona de eritrócitos de indivíduos obesos e com sobrepeso”**. 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, ou com Samira Fonte Zanon de Souza (21) 983011346 ou e-mail samira_zanon@yahoo.com.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 salário mínimo () 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-Sopro 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: _____

Circunferência de Quadril: _____

Relação Cintura – Quadril: _____