

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAROLINE CURRY MARTINS

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA**

por

Caroline Curry Martins

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch
Co - orientadora: Margarete Dulce Bagatini

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA**
elaborada por

Caroline Curry Martins

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Vera Maria Melchior Morsch
(Presidente/Orientadora)

Prof. Dr. Rafael Noal Moresco/UFSM

Prof^ª. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal/UFSM

Santa Maria, 28 de agosto de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Luiz e Marta
Aos meus irmãos: Juliane e Eduardo

*Pelo amor, carinho, apoio,
compreensão, companheirismo e
dedicação durante toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho, tão importante para a minha vida só foi possível devido ao incentivo e cooperação de muitas pessoas especiais e, por isso, é fundamental lembrá-las e agradecê-las.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Luiz e Marta, por todo o amor, carinho e dedicação em mim depositados ao longo desses anos. A compreensão e o apoio recebidos de vocês foram fundamentais para que eu tenha acreditado no meu potencial e ido em busca dos meus objetivos. Agradeço infinitamente pela educação a mim concedida e por acreditarem na minha caminhada, incentivando e acompanhando meus passos... e o melhor de tudo: por terem feito isso tudo com muito amor! Obrigada por todo sacrifício feito para que eu chegasse até aqui, e, principalmente, por esse amor sem fim que nos une. Agradeço aos melhores pais, aos quais tenho um orgulho imenso, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim!

Agradeço, juntamente com meus pais, aos meus irmãos, Juliane e Eduardo, assim como às suas respectivas famílias, por todo companheirismo, amor e carinho a mim dedicados. Todos vocês constituem a minha força de vida. Graças a vocês, meus amores, sei que posso vencer qualquer dificuldade e ir muito além dos meus objetivos. Obrigada por acreditarem em mim, por apoiarem as minhas escolhas e por serem a melhor família que eu poderia ter. Amo muito todos vocês!

À professora Vera, minha orientadora, por confiar no meu potencial, apoiando e incentivando a realização deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, incentivos, atenção e dedicação. A vocês, Professoras Vera e Rosa, minha eterna gratidão pela oportunidade que me deram de ingressar no seu grupo de pesquisa, do qual tenho imenso orgulho de fazer parte.

A minha co-orientadora, Margarete, a qual me faltam palavras para decifrar todo o meu agradecimento. Muitíssimo obrigada pela dedicação sem fim, por todos os ensinamentos, pelo apoio, pela paciência e por todo o carinho a mim concedidos ao longo desses anos. Mais que uma co-orientadora, és uma grande amiga que faz parte da minha história de vida. Obrigada por ter me ensinado a amar a bioquímica, por todo auxílio e dedicação no meu trabalho, mas, acima de tudo, muito obrigada por todo carinho e cuidado com a tua pequena aqui. Quero que saibas que serei eternamente grata por tudo e sempre estarei à disposição para retribuir todo esse carinho e cultivar essa nossa amizade! Muito, mas muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora dessa dissertação, professor Rafael e professora Daniela, pela disponibilidade em avaliar esse trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o aprimoramento do mesmo.

As minhas “trombadinhas da apirase”, Déia, Dani, Juci, Robi, Fátima... e a todos os amigos e colegas que fazem ou que já fizeram parte do laboratório Enzitox, pelos momentos compartilhados, pela amizade e por todo o companheirismo durante a realização deste trabalho. Vocês são parte da minha história e agradeço a todos, de coração, por todo o carinho recebido. Muitíssimo obrigada!

A todos os pacientes, pela disponibilidade em participar deste trabalho, doando não apenas amostras biológicas, mas também experiências de vida. Meus desejos de muita saúde e fé a todos vocês!

A professora Daniela Lopes dos Santos e ao seu grupo de pesquisa, pela colaboração e parceria na realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos amigos de longa data, que mesmo que não nos vissemos sempre estiveram presentes durante minha caminhada, me apoiando e me proporcionando momentos de felicidade.

E a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

*“Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.”*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

AUTORA: CAROLINE CURRY MARTINS

ORIENTADORA: VERA MARIA MELCHORS MORSCH

CO-ORIENTADORA: MARGARETE DULCE BAGATINI

Data e local de Defesa: Santa Maria, 28 de agosto de 2012.

A Síndrome Metabólica (SMet) caracteriza-se pela presença de um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, hiperglicemia, dislipidemia e obesidade abdominal. Essa patologia tem sido amplamente discutida em virtude do impacto das doenças cardiovasculares (DCVs), já sendo uma preocupação em termos de saúde pública. Além dos fatores de riscos clássicos dessa síndrome, indica-se a presença de uma inflamação crônica de baixo grau nos seus portadores, a qual é considerada ponto chave no desenvolvimento de aterosclerose e de DCVs. Alguns marcadores inflamatórios têm sido utilizados com o intuito de diagnosticar pacientes assintomáticos sob risco cardiovascular, como os níveis de proteína C-reativa (PCR) e de ácido úrico, bem como a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Além disso, pesquisas têm demonstrado estreita relação dos sistemas purinérgico e colinérgico com o controle do processo inflamatório. O ATP tem sido considerado uma molécula pró-inflamatória, enquanto que a adenosina, produto final da hidrólise do ATP, parece desempenhar ações protetoras e anti-inflamatórias. A acetilcolina (ACh), por sua vez, desempenha funções anti-inflamatórias por inibir a secreção de citocinas pelas células imunes. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar, em soro e linfócitos de 20 pacientes com SMet, a atividade das enzimas nucleotídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP), adenosina desaminase (ADA), as quais controlam os níveis de ATP e adenosina extracelulares, assim como analisar a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), as quais controlam o nível extracelular de ACh, tendo em vista o efeito dos sistemas purinérgico e colinérgico nas ações inflamatórias dos pacientes com SMet. Os resultados obtidos demonstraram uma diminuição da atividade das enzimas NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com SMet. Por outro lado, observou-se um aumento na atividade da E-NPP e ADA em soro desses pacientes. Em adição, um aumento na atividade de ambas as colinesterases AChE e BuChE foi observado em linfócitos e soro, respectivamente. Além disso, os pacientes com SMet apresentaram níveis maiores de PCR e ácido úrico, bem como maior atividade da enzima MPO. Com isso, os resultados deste trabalho evidenciam a presença de um estado inflamatório nos pacientes com SMet tanto pelo aumento dos marcadores inflamatórios clássicos, quanto pela imunomodulação desencadeada pelos sistemas purinérgico e colinérgico. A menor atividade da NTPDase em linfócitos resulta em maior disponibilidade de ATP extracelular para estimular a inflamação, influenciando a atividade das demais enzimas purinérgicas. Da mesma forma, uma maior atividade das colinesterases resulta em menor disponibilidade de ACh extracelular, diminuindo o efeito colinérgico anti-inflamatório. Dessa forma, pode-se indicar que os sistemas purinérgico e colinérgico apresentam importantes efeitos na modulação do processo inflamatório presente na SMet, podendo ser úteis na clínica médica e no monitoramento da patologia.

Palavras-chave: Síndrome Metabólica, Ecto-nucleotidases, Colinesterases, Inflamação.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Biological Science: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria

ASSESSMENT OF PURINERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN INFLAMMATORY PROCESS OF METABOLIC SYNDROME PATIENTS

AUTOR: CAROLINE CURRY MARTINS

ADVISOR: VERA MARIA MELCHORS MORSCH

CO-ADVISOR: MARGARETE DULCE BAGATINI

Place and date of defense: Santa Maria, August, 28th, 2012.

Metabolic syndrome (MetS) is characterized by the presence of set cardiovascular risk factors such as hypertension, hyperglycemia, dyslipidemia and abdominal obesity. This pathology has been widely discussed due to the impact of cardiovascular disease (CVD), has been a concern for public health. In addition to the classic risk factors of this syndrome, has been indicated the presence of a low-grade chronic inflammation in their patients, which is considered a key point in the development of atherosclerosis and CVD. Some inflammatory markers has been used in order to diagnose cardiovascular asymptomatic patients at risk, as the levels of C-reactive protein (CRP) and uric acid and the activity of myeloperoxidase enzyme (MPO). In addition, studies have shown close relation of the purinergic and cholinergic systems in control of the inflammatory process. The ATP molecule has been considered a pro-inflammatory, while adenosine, which is the end product of ATP hydrolysis, appears to play protective action and anti-inflammatory. Acetylcholine (ACh), in turn, performs anti-inflammatory functions to inhibit secretion of cytokines by immune cells. In this context, the objective of this study was to investigate in serum and lymphocytes of 20 patients with MetS, the activity of the enzymes nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), ectonucleotideo pyrophosphatase / phosphodiesterases (E-NPP), adenosine deaminase (ADA), which control ATP and adenosine extracellular levels, and to analyze the activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes, which control the extracellular ACh level in order to effect the purinergic and cholinergic systems in patients with inflammatory action MetS. The results showed a decreased activity of the enzymes NTPDase and ADA in lymphocytes from patients with MetS. Moreover, we observed an increase in activity of the E-NPP and ADA in the serum of these patients. In addition, an increase in activity of both cholinesterase AChE and BuChE was observed in lymphocytes and serum, respectively. Finally, patients with MetS showed higher levels of CRP and uric acid as well as increased activity of MPO. Thus, the present results show the presence of an inflammatory state in patients with MetS by both the increase in inflammatory markers classics, and by immunomodulation triggered by purinergic and cholinergic systems. The lower activity of NTPDase in lymphocytes results in increased availability of extracellular ATP to stimulate inflammation and to influence the activity of other enzymes purinergic. Likewise, the high cholinesterase activities results in decreased availability of ACh extracellular, reducing the anti-inflammatory cholinergic effect. Thus, one may indicate that the purinergic and cholinergic systems have important effects in modulating the inflammatory process present in MetS, and the parameters mentioned in this research can useful in clinical medicine, to monitor the disease.

Keywords: Metabolic syndrome, Ecto-nucleotidases, cholinesterase, Inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

QUADRO 1 –	Classificação da Síndrome Metabólica conforme as três principais organizações internacionais.....	17
FIGURA 1 –	Esquema simplificado da inflamação do tecido adiposo na síndrome metabólica e seus efeitos.....	21
FIGURA 2 –	Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina e adenosina.....	27
FIGURA 3 –	Membros da família NTPDase.....	28
FIGURA 4 –	Desenho esquemático da via colinérgica anti-inflamatória.....	32
FIGURA 5 –	Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica.....	33

MANUSCRITO

FIGURE 1 –	NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrates and ADA activity (C) using adenosine as substrate in lymphocytes of control and MetS patients	68
FIGURE 2 –	E-NPP activity in serum of control and MetS patients.....	69
FIGURE 3 –	ADA activity in serum of control and MetS patients.....	70
FIGURE 4 –	AChE activity in lymphocytes of control and MetS patients	71
FIGURE 5 –	BuChE activity in serum of control and MetS patients.....	72

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABLE 1 –	Anthropometric and biochemical characteristics of the study population.....	65
TABLE 2 –	Inflammatory marker levels of the study population.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACh** – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ADA – Adenosina Desaminase
ADP – Adenosina Difosfato
AGL – Ácido Graxo Livre
AMP – Adenosina Monofosfato
ATP – Adenosina Trifosfato
BuChE – Butirilcolinesterase
CCK - Colecistoquinina
DCV – Doença Cardiovascular
DM2 – Diabetes *Mellitus* tipo 2
E-NPP – Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclica
HDL – Lipoproteína de alta densidade
IDF – *International Diabetes Federation*
IFN- γ - Interferon γ
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-2 – Interleucina 2
IL-6 – Interleucina 6
IMC – Índice de Massa Corporal
IP₃ - Inositol-1,4,5- trifosfato
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDLpd – Lipoproteína de baixa densidade pequena e densa
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1
MPO – Mieloperoxidase
NCEP –ATP III – *National Cholesterol Education Program– Adult Treatment Panel III*
NF- κ B - Fator Nuclear Kappa-B
NO – Óxido Nítrico
NTPDase – Ectonucleosídeo trifosfato-difosfodirolase
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAI-1 – Inibidor do ativador do plasminogênio – 1
PCR – Proteína C-Reativa

SMet – Síndrome Metabólica

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

UTP – Uridina Trifosfato

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação pelo Comitê de Ética	88
--	-----------

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	89
APÊNDICE B – Questionário para Anamnese.....	91

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	37
Objetivo geral.....	37
Objetivos específicos	37
APRESENTAÇÃO	38
MANUSCRITO - EFFECT OF PURINERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN INFLAMMATORY PROCESS OF METABOLIC SYNDROME PATIENTS	39
Abstract.....	41
Introdução.....	42
Material e métodos.....	45
Resultados	51
Discussão.....	52
Conclusão.....	57
Literatura citada - Referências bibliográficas.....	58
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	88
APÊNDICES	89

INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SMet) caracteriza-se pela presença de múltiplas anormalidades metabólicas, antropométricas e hemodinâmicas que aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (ALBERTI et al., 2005; STERN et al., 2004). Hipertensão, hiperglicemia, obesidade abdominal e dislipidemia, conhecidos como fatores de risco cardiovasculares, são as principais anormalidades que constituem essa patologia e associam-se frequentemente ao estilo de vida sedentário e à dieta hipercalórica (LOPES, 2007).

Numerosos estudos epidemiológicos evidenciam que cada fator de risco cardiovascular que compõe a SMet atua, individualmente, como um importante preditor de DCV (AFSANA et al., 2010; SONNENBERG et al., 2004). Entretanto, sugere-se que esses fatores são sinérgicos entre si e estão metabolicamente ligados, o que potencializa o risco cardiovascular encontrado na SMet (SADIKOT et al., 2010). A associação dos fatores de risco da SMet tem sido largamente discutida na clínica pelo impacto das DCV e pelo aumento mundial da sua incidência, sendo que a SMet já é considerada um problema de saúde pública.

Quando presente, a SMet está relacionada a uma mortalidade geral duas vezes maior e a uma mortalidade cardiovascular três vezes maior que na população normal (SBEM, 2010). O diagnóstico dos fatores de riscos que compreendem a SMet é essencial para orientar os indivíduos em risco, e, assim, auxiliar no desenvolvimento e implementação de políticas de intervenção na saúde pública, principalmente por esses fatores estarem distribuídos e inter-relacionados dentro de diferentes grupos. Isso é particularmente importante, já que atualmente os recursos para a saúde estão cada vez mais limitados e há a necessidade de se priorizar o tratamento para aqueles indivíduos que estão sob maior risco (FRANKS et al, 2007).

Embora não existam dados representativos da SMet na população brasileira, mundialmente a prevalência dessa patologia já é bem estabelecida, apresentando uma variação de 8% a 24% para homens e de 7% a 46,5% para mulheres (SIRDAH et al., 2011). Essa amplitude na prevalência deve-se às diferentes características das populações estudadas e, principalmente, ao vasto e não unânime conceito de SMet.

Três principais classificações da SMet têm sido propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III* (NCEP – ATP III) e *International Diabetes Federation* (IDF), respectivamente (Quadro 1). A primeira, OMS (1998), inclui a intolerância à glicose ou a resistência insulínica como componente essencial, agregando mais dois fatores de risco da SMet. A IDF (2006) e o NCEP-ATP III (NIH, 2001), por sua vez, consideram os mesmos critérios, sendo a IDF, a mais rigorosa. Apesar da existência de diferentes critérios de definição para a SMet, a classificação segundo NCEP – APT III (2001) é a de maior referência para o diagnóstico clínico e para muitas das pesquisas que envolvem essa patologia.

Fator/Condição	OMS	NCEP - ATP III	IDF
Circunferência Abdominal	-	Homem: > 102 cm Mulher: > 88 cm	Homem: ≥ 94 cm Mulher: ≥ 80 cm
HDL colesterol	Homem: < 35 mg/dL Mulher: < 39 mg/dL	Homem: <40 mg/dL** Mulher: < 50 mg/dL**	< 50 mg/dL**
Triglicérides	> 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL**	≥ 150 mg/dL**
Pressão Arterial	> 140/90 mmHg	Sistólica ≥ 130** ou Diastólica ≥ 85 mmHg**	Sistólica ≥ 130** ou Diastólica ≥ 85 mmHg**
Glicemia	-	≥ 110 mg/dL**	≥ 100 mg/dL**
Índice de Massa Corporal	> 30 Kg/m ² *	-	-
Albuminúria	> 20 µg/min	-	-
Intolerância à Glicose	Sim	-	-
Resistência Insulínica	Sim	-	-
Sujeito é considerado com Síndrome Metabólica se apresentar	Intolerância à glicose ou resistência insulínica mais dois outros fatores	Pelo menos três dos cinco fatores	Obesidade abdominal mais dois dos outros quatro fatores

Quadro 1 – Classificação da Síndrome Metabólica conforme as três principais organizações internacionais

FONTE: OMS, Organização Mundial da Saúde (1998); NCEP – ATP III, *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III* (2001); IDF, *International Diabetes Federation* (2006).

* ou relação cintura quadril > 0,85 para mulheres e > 0,90 para homens.

** ou tratamento específico.

A SMet na grande maioria dos casos estudados é composta por três dos fatores de risco cardiovasculares, em combinações variadas, na faixa de 45 a 65

anos para ambos os sexos (SIRDAH et al., 2011). Observa-se um aumento no número de fatores de risco presentes com o aumento da idade, atingindo entre 60 e 69 anos o maior percentual de pacientes com todos os fatores de risco para SMet (AZIZI et al., 2003).

Devido às características individuais de cada grupo de pesquisa, há muitas divergências em relação ao sexo predominante na SMet. Alguns estudos apontam uma maior prevalência em homens (GUIZE et al., 2007), outros nenhuma diferença de prevalência entre os sexos (FORD et al., 2002) e, com maior frequência, há aqueles que indicam uma maior prevalência em mulheres (AZIZI et al., 2003; SIRDAH et al., 2011). Segundo Janssen (2008), com a progressiva diminuição do estrogênio e aumento da testosterona na menopausa, com consequente alteração no metabolismo dos lipídeos, há maior tendência de mulheres desenvolverem a SMet.

Apesar das extensas pesquisas envolvendo a SMet, sua etiologia ainda necessita ser melhor esclarecida. Ao considerar que os fatores de risco cardiovasculares que compõe a SMet apresentam um alto grau de interação, um podendo contribuir para o estabelecimento do outro, busca-se identificar qual o principal fator de risco e qual a sequência de eventos na fisiopatologia da SMet.

Nesse sentido, várias hipóteses têm sido propostas com o intuito de elucidar o mecanismo do risco cardiovascular total que caracteriza a SMet. Cameron et al. (2008), ao utilizarem dados de três estudos de coorte, revelaram a importância da obesidade abdominal na SMet, indicando que a obesidade visceral desempenha papel central no desenvolvimento da patologia e parece preceder o aparecimento dos seus outros componentes.

De fato, o acúmulo excessivo de energia sob a forma de gordura no organismo estimula a atividade lipolítica dos adipócitos, resultando na liberação de grandes quantidades de ácidos graxos livres (AGLs) na circulação (AHIMA et al., 2000). O fluxo aumentado de AGLs no fígado diminui a captação hepática de insulina, inibindo sua ligação ao receptor e sua degradação, causando hiperinsulinemia (BRUNZELL et al., 1999).

Além disso, na obesidade os triglicérides são transferidos aceleradamente das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) para as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) em troca de ésteres de colesterol. Então, a lipase hepática, cuja atividade também está aumentada na

obesidade, hidrolisa as LDL e HDL, gerando lipoproteínas de baixa densidade pequena e densa (LDLpd), além de resultar em hipertrigliceridemia e diminuição da HDL₂, a subpopulação de HDL com maior atividade anti-aterogênica no plasma (BRUNZELL et al., 1999).

Associado à dislipidemia, a LDLpd produzida, além de ter maior facilidade de penetração na íntima vascular, também pode ser oxidada em microambientes da parede arterial (na ausência de antioxidantes plasmáticos) com posterior retorno da partícula modificada à circulação (YLA-HERTTUALA, et al., 1989). A LDLpd oxidada mostra-se pró-aterogênica, uma vez que os lipídios oxidados da partícula de LDLpd atuam como agressores ao endotélio vascular e a resposta compensatória ao dano altera sua homeostase, favorecendo o desenvolvimento da placa aterosclerótica (STEINBERG et al., 1989).

Lin et al. (2008), corroborando com a importância da obesidade encontrada por Cameron et al. (2008), sugeriram a ocorrência de um efeito sequencial na instalação da SMet: a partir da obesidade (identificada por meio do índice de massa corporal (IMC) ou pela circunferência da cintura), seguem-se a inflamação subclínica (definida pela proteína C-reativa - PCR), a resistência à insulina e a dislipidemia.

De fato, o tecido adiposo atua como um verdadeiro órgão endócrino, pois permite o estabelecimento de sua comunicação com o restante do organismo, mediante a síntese e liberação de moléculas ativas denominadas adipocinas (HONG et al., 2007). Estas, exibem papel chave na patogênese da SMet e do DM2 (MAYORGA et al., 2007), pois podem atuar no controle da ingestão de alimentos, equilíbrio energético e de glicose, peso corporal, metabolismo lipídico e inflamação.

Assim, para a aglomeração de fatores de risco cardiovasculares da SMet, a resistência insulínica era, inicialmente, considerada peça chave. Entretanto, as importantes funções biológicas das adipocinas liberadas pelo tecido adiposo vêm sendo enfatizadas e a circunferência da cintura tornou-se essencial no diagnóstico da SMet. Entre as principais adipocinas liberadas pelo tecido adiposo encontram-se a leptina, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a resistina, a interleucina - 6 (IL-6), a adiponectina e o inibidor do ativador do plasminogênio - 1 (PAI-1) (POULOS et al., 2010).

A leptina e a adiponectina são as adipocinas mais abundantes sintetizadas pelo tecido adiposo (WEISBERG et al., 2003). A leptina é um hormônio proteico que age no cérebro inibindo o apetite e estimulando o gasto de energia, além de exercer

outros efeitos na angiogênese, na resposta imune e no controle da pressão sanguínea (CAMPFIELD et al., 1995). Verificou-se que, aparentemente, a leptina possui efeitos específicos na função dos linfócitos-T, através da regulação da proliferação de células envolvidas na resposta imune, tanto inata quanto adquirida (MARTI et al., 2004), resultando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (LORD et al., 1998). Esses achados suportam a teoria de a leptina ser o elo entre o estado nutricional e a função celular imune, podendo representar um importante alvo da interação imunológica em diversas condições fisiopatológicas.

A adiponectina, por sua vez, está envolvida na resposta inflamatória e na regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório (RONTI et al., 2006). Apesar de ser o mais abundante fator produzido exclusivamente pelo tecido adiposo, ao contrário da grande maioria das adipocinas a concentração plasmática de adiponectina apresenta-se menor em obesos. Além disso, encontra-se grande correlação negativa entre a adiponectina e os marcadores inflamatórios (OUCHI et al., 2003).

Além das adipocinas já citadas, o TNF- α e a IL-6 também desempenham importantes funções relacionadas ao processo inflamatório no tecido adiposo. O TNF- α é um potente regulador interno do tecido adiposo, estando associado à produção de várias citocinas e adipocinas (COPPACK, 2001). Relaciona-se às respostas imunológicas, reações inflamatórias e neovascularização (LEE et al., 2003). Da mesma forma, a IL-6 desempenha atividade pró-inflamatória no tecido adiposo e em diversos órgãos, sendo amplamente secretada pelos adipócitos durante a obesidade (SETHI et al., 1999).

A presença de um estado crônico-inflamatório de baixo grau, o qual demonstra estreita relação com a obesidade, tem sido apontada como um dos principais responsáveis pela patogênese da SMet, embora a inflamação ainda não tenha sido contemplada em nenhum critério de diagnóstico (OKADA et al., 2010). Isso está associado a evidências científicas que incluem não somente a elevação de marcadores e citocinas inflamatórias nos pacientes com SMet, mas também a presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo dos mesmos (CANCELLO et al., 2006; YUDIKIN, 2003).

Acredita-se que com o ganho de peso e hipertrofia dos adipócitos haja compressão dos vasos sanguíneos no tecido adiposo, impedindo um suprimento adequado de oxigênio. Ocorreria, então, hipóxia local e morte de alguns adipócitos.

Esse quadro desencadeia a cascata da resposta inflamatória e também o processo de angiogênese para formação de novos vasos com a finalidade de melhorar o aporte sanguíneo no tecido adiposo. Portanto, a condição de hipóxia *per se* já é suficiente para estimular a quimiotaxia de macrófagos e induzir a expressão de genes pró-inflamatórios (LOLMÈDE et al., 2003; NEELS et al., 2006; WOOD et al., 2009) (Figura 1).

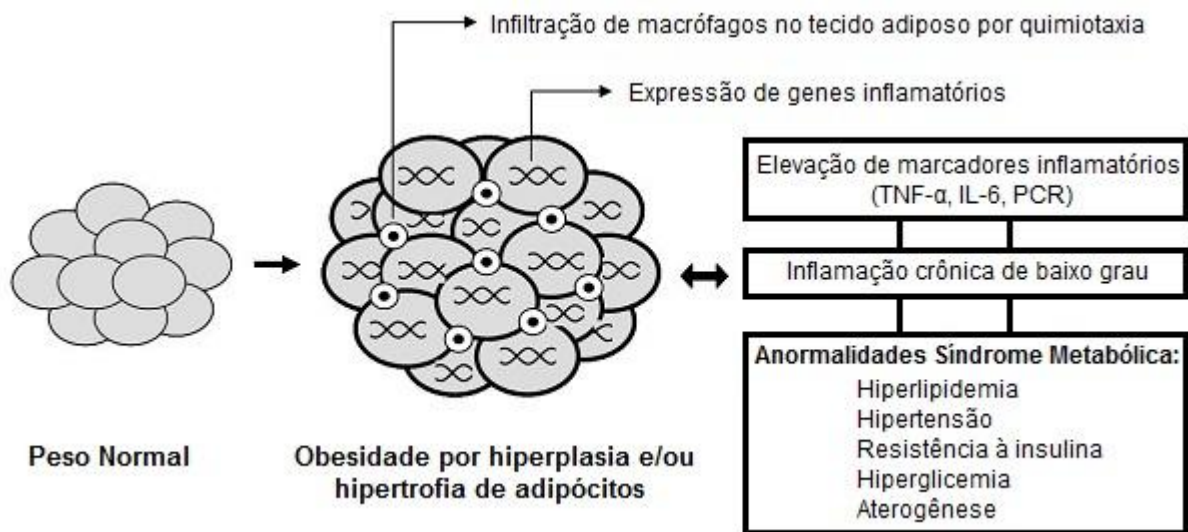


Figura 1 – Esquema simplificado da inflamação do tecido adiposo na síndrome metabólica e seus efeitos.

FONTE: Leite, LD, 2009.

A elevação dos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, PCR), observados na SMet, é proveniente da produção destes pelos macrófagos infiltrados e pelos próprios adipócitos estimulados em resposta à hipóxia consequente ao acúmulo de gordura. De igual modo, há também liberação de moléculas pró-inflamatórias em outros órgãos, muitas vezes com produção estimulada por fatores secretados pelo próprio tecido adiposo (KERSHAW et al., 2004; TRAYHURN et al., 2004).

As citocinas pró-inflamatórias liberadas tanto pelo tecido adiposo quanto pelas células do sistema imune, além de desencadear a inflamação em diversos tecidos, também são responsáveis por alterar a integridade do endotélio vascular. A inflamação modifica o estado normal de vasodilatação, quase sempre por uma diminuição na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), potencializando a ocorrência

dos fatores de risco cardiovasculares (VITA et al., 2002) . A disfunção endotelial propicia eventos pró-trombóticos, a diferenciação das células lisas vasculares e de macrófagos, tendo como consequência o início da doença aterosclerótica, a qual é considerada um risco cardiovascular oculto (BEHRENDT et al., 2002).

Uma vez estabelecida a placa de ateroma, o indivíduo torna-se suscetível ao desenvolvimento de graves consequências clínicas como angina, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, doenças cerebrovasculares, entre outras. Nesse sentido, os resultados da associação entre obesidade e processo inflamatório na SMet confere um possível mecanismo pelo qual essa patologia represente um alto risco cardiovascular (BAHIA et al., 2006). Dessa forma, considerando a importância da SMet, busca-se tratamentos eficazes para essa patologia com o intuito de se reduzir os fatores de risco e, assim, prevenir a ocorrência de eventos cardiovasculares.

O primeiro tratamento indicado é não medicamentoso, consistindo em mudança no estilo de vida que inclui a prática de exercícios físicos acompanhada de uma alimentação equilibrada e saudável (GRUNDY et al., 2004) . Entretanto, apesar do consenso acerca dos benefícios produzidos pela melhora no estilo de vida, os estudos epidemiológicos apontam elevado percentual de sedentarismo (FLORIDA, 2008; MOURA et al., 2008).

Assim, muitos pacientes com SMet necessitam de tratamento medicamentoso integrado (GRUNDY et al., 2004), abrangendo simultaneamente cada um dos seus fatores de risco (ISRAILI et al., 2007). Isso tem gerado discussões, já que atualmente cada fator de risco cardiovascular da SMet é tratado individualmente através do uso de hipolipemiantes, anti-hipertensivos e hipoglicemiantes. Portanto, desconsidera-se os riscos ocultos que podem existir pela associação dos fatores da SMet, como o processo inflamatório e a formação de placas de aterosclerose (SADIKOT et al., 2010).

Nesse sentido, além dos componentes que fazem parte dos critérios propostos para o diagnóstico da SMet, sugere-se a inclusão de outras condições clínicas e fisiopatológicas como: estados pró-inflamatórios, estados pró-trombóticos, fatores hormonais, hiperuricemia, entre outros (ALBERTI et al., 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2004), visando a identificação dos fatores de riscos ocultos e o diagnóstico dos pacientes assintomáticos com predisposição para DCV.

De fato, diversos marcadores inflamatórios têm sido utilizados para avaliar os riscos cardiovasculares, tendo em vista o aumento da prevalência das DCVs e a questão da triagem para a presença de doença clinicamente oculta (PIÑÓN et al., 2006). Entre os principais marcadores inflamatórios explorados, a PCR destaca-se como protagonista, sendo um dos marcadores com evidências que predizem o risco cardiovascular em indivíduos aparentemente saudáveis. Os níveis elevados de PCR indicam um prognóstico desfavorável, podendo refletir o papel da resposta inflamatória como promotora da placa de aterosclerose (BLAKE et al., 2003).

A PCR é uma proteína de fase aguda produzida nos hepatócitos em resposta ao estímulo de citocinas, em especial a IL-6, que induz a sua expressão e liberação na corrente sanguínea (TOSS et al., 1997). Ela possui habilidade de ligação e ativação do sistema complemento, promovendo deposição de C3b nos tecidos, o que poderia induzir à aterosclerose e potencializar a instabilidade da placa de ateroma. Além disso, a PCR é capaz de induzir a produção de fatores teciduais pró-trombóticos pelos macrófagos, promovendo conexão entre as vias inflamatórias e de coagulação (SCHNABEL et al., 2005). Isso porque o dano causado pelo acúmulo de LDL na íntima do endotélio vascular ativa a inflamação, recrutando macrófagos para o local de injúria. A PCR liberada pelo processo inflamatório estimula os macrófagos a fagocitar lipoproteínas circulantes, favorecendo o aparecimento de lesão vascular com conseqüente adesão plaquetária e formação de trombos (ROSS, 1999).

Demonstra-se uma correlação positiva entre os níveis de PCR e cada um dos fatores de risco cardiovasculares que constituem a SMet, tendo grande importância como informação prognóstica em termos de risco futuro para DCV (LIM et al., 2005). Níveis de PCR de até 1 mg/L são considerados normais, constituindo baixo risco cardiovascular. Entretanto, indivíduos que apresentem PCR no valor de 1 a 3 mg/L constituem o grupo de médio risco cardiovascular, enquanto que indivíduos com PCR acima de 3 mg/L representam o grupo com alto risco cardiovascular (RIDKER, 2001).

Além da PCR, a enzima mieloperoxidase (MPO) tem emergido na literatura como um importante marcador inflamatório e preditor de risco cardiovascular. Considerando a reação inflamatória como protagonista do processo aterosclerótico, aponta-se o papel da ativação neutrofílica nesse contexto (BIASUCCI et al., 1996). A ativação de neutrófilos resulta na liberação dos grânulos intracelulares, gerando dano endotelial e aumentando a atividade pró-coagulante. Sabe-se que a MPO é o

maior constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos e é imediatamente liberada após a sua ativação por diferentes agonistas (HANSSON et al., 2006). Dessa forma, acumulam-se evidências a fim de discutir o papel da MPO na promoção da aterogênese.

No organismo, a MPO é uma enzima utilizada como mecanismo de defesa devido a sua capacidade de formar radicais livres e oxidantes com propriedades antimicrobianas. Por outro lado, a MPO utiliza NO como substrato, gerando espécies reativas de nitrogênio e sendo catalisadora da peroxidação lipídica. A conversão do LDL em sua forma pró-aterogênica gera aumento da sua captação pelos macrófagos do endotélio vascular, formando as células espumosas que originam a placa de aterosclerose (NICHOLLS et al., 2004). Além disso, a MPO também é capaz de desencadear a produção de fatores pró-inflamatórios, expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas e ativação de metaloproteinases, promovendo desestabilização e ruptura da placa aterosclerótica (BALDUS et al., 2003).

Dessa forma, pode-se considerar a MPO como uma candidata para a predição de evento cardiovascular por ser liberada pelos leucócitos ativados, por estar elevada e cataliticamente ativa nas placas de ateroma vulneráveis e por ser relacionada a fatores que afetam o desenvolvimento e a estabilidade da placa aterosclerótica (BIASUCCI et al., 1996).

Apesar de a PCR e a enzima MPO estarem bem estabelecidas como marcadores inflamatórios relacionados ao risco cardiovascular, ainda há a necessidade de se desenvolver novos marcadores inflamatórios que possam agregar valor na identificação precoce de indivíduos sob risco cardiovascular. Nesse sentido, o ácido úrico tem recebido atenção especial. Acredita-se que o ácido úrico tenha estreita relação com o processo inflamatório por atuar na transcrição do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e na proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (KANELLIS et al., 2003), estimulando as células mononucleares humanas a produzir IL-6 e TNF- α (JOHNSON et al., 2003).

A associação entre hiperuricemia e DCV vem sendo observada há mais de século, demonstrando grande importância na fisiopatologia cardiovascular (JOHNSON, 2006). Entretanto, o mecanismo pelo qual o nível de ácido úrico eleva-se nos indivíduos sob risco cardiovascular ainda é obscuro. Sugere-se que o ácido úrico apresenta propriedades antioxidantes, eliminando espécies reativas de oxigênio produzidas durante a SMet, e, por isso, seus níveis são aumentados

(SIMÃO et al., 2008). Por outro lado, as recentes descobertas do papel do ácido úrico no processo inflamatório, e a associação deste com os fatores de risco cardiovasculares, apontam o aumento sérico de ácido úrico como uma condição desencadeada pela inflamação consequente à obesidade, potencializando o aparecimento da SMet (LONGO-MBENZA et al., 2010; VEKIC et al., 2009).

A inserção do ácido úrico na explicação da fisiopatologia dos riscos cardiovasculares e a sua utilização como marcador inflamatório pode ser interessante na clínica por ser um exame de fácil realização e de baixo custo. Nesse contexto, reforça-se a busca por novas pesquisas para melhor compreender a participação do ácido úrico no cenário das DCV (COUTINHO et al., 2007).

Diante da importância do processo inflamatório desencadeado pela patologia da SMet, cabe ressaltar não somente o valor prognóstico dos marcadores inflamatórios, mas também toda a complexidade e vias envolvidas na inflamação com o intuito de melhor compreender a fisiopatologia da SMet e das DCVs.

Durante o processo inflamatório diversas vias de controle são envolvidas, incluindo os sistemas purinérgico e colinérgico. Sabe-se que os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina, bem como ésteres de colina, têm importantes funções na regulação do processo inflamatório e, portanto, podem estar relacionados ao processo fisiopatológico das DCVs (BOURS et al., 2006; UNDURTI, 2007).

Os nucleotídeos, tais como o ATP, o ADP e o UTP, assim como o nucleosídeo adenosina, estão presentes nos fluídos extracelulares em baixas quantidades, tendo suas concentrações influenciadas por diversos fatores, como secreção e/ou lise celular, permeabilidade seletiva da membrana, exocitose de vesículas secretoras e os efeitos da ação catalítica de enzimas do tipo nucleotidases (ENJYOJI et al., 1999; MALMSJO et al., 2000; ZIMMERMANN, 2001). Uma vez presente no ambiente extracelular, os nucleotídeos interagem com receptores purinérgicos específicos, mediando eventos de resposta imune, de inflamação, de agregação plaquetária, entre outros (BURNSTOCK, 2006; 2007).

Esses receptores purinérgicos estão presentes na membrana plasmática das células, incluindo as células do sistema imune, e são divididos em duas subfamílias: aqueles acoplados à proteína G (P2Y) e aqueles ligados a canais iônicos (P2X), sendo que, em mamíferos, já foram identificados oito tipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) e sete tipos de receptores P2X (P2X1 – P2X7) (BURNSTOCK, 2006). A sinalização purinérgica é

finalizada, então, pela ação de ectoenzimas que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos, no meio extracelular (ZIMMERMANN, 1994).

Os nucleotídeos, especialmente o ATP, atuam como moléculas sinalizadoras endógenas de danos, desencadeando uma resposta do sistema imune (ZHANG et al., 2008). Estudos revelam que o ATP está envolvido em diversas funções no sistema imune: nas células T, o ATP é capaz de mediar a resposta imune atuando como um agente pró-inflamatório, porque estimula a proliferação de linfócitos e potencializa a liberação de citocinas, como a interleucina 1 (IL-1) e o interferon γ (IFN- γ) (BOURS et al., 2006; LANGSTON et al., 2003); nos monócitos circulantes, o ATP está envolvido no recrutamento destes para os tecidos alvo (VENTURA et al. 1995); nas células dendríticas, o ATP induz migração e diferenciação (LA SALA et al., 2003); e nos macrófagos, estimula a produção de interleucina 1 β (IL-1 β) (ELSSNER et al., 2004) e do TNF- α (GUERRA et al., 2003).

Apesar de as funções do ATP sobre os linfócitos durante os processos de inflamação estar, em parte, elucidadas, as funções do ADP não estão perfeitamente esclarecidas (LUTHJE, 1989), muito embora esse nucleotídeo seja um importante estimulante da agregação plaquetária, ativando e recrutando plaquetas para o sítio da injúria tecidual (MARCUS et al., 2003). Quando um vaso é lesado, o primeiro sinal de ativação plaquetária é sentido sua na membrana externa, onde os fatores capazes de promover esta ativação, como o ADP, se ligam aos seus receptores específicos. A plaqueta modifica a sua forma, e ativa a ligação das plaquetas e o processo de agregação plaquetária (EYRE et al., 2010).

Além dos nucleotídeos ATP e ADP, o seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, também é considerado uma importante molécula no processo inflamatório, porém com ações contrárias às do ATP (BOURS et al., 2006). A adenosina atua sobre receptores do tipo A1, A2A, A2B e A3, os quais são glicoproteínas transmembrana acopladas à proteína G, desencadeando uma resposta imunossupressora e anti-inflamatória.

Entre as ações imunes da adenosina, estão incluídas a promoção da maturação dos monócitos (FISCHER et al., 1976; SPYCHALA, 2000), a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF- α) (HASKÓ et al., 2009), a inibição da adesão de linfócitos durante as respostas inflamatórias (ODASHIMA et

al., 2005) e a inibição da proliferação de células T (GESSI et al., 2007; SPYCHALA, 2000).

Frente às funções dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina na inflamação, a regulação das suas concentrações extracelulares tem grande relevância na modulação do processo inflamatório. O nível dos nucleotídeos extracelulares é controlado pela atividade de enzimas denominadas ectonucleotidases. Dentre essas enzimas incluem-se as ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDase, EC 3.6.1.5), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPP, EC 3.6.1.5), a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.3.1.3.5) e a adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4) (ROBSON et al., 2006; ZIMMERMANN, 2001). Essas enzimas atuam em conjunto, formando uma cadeia enzimática que tem início com a ação da E-NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP formando AMP (ZIMMERMANN et al., 2007). A seguir, a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando adenosina, a qual posteriormente é degradada pela ação da ADA, gerando inosina (Figura 2).

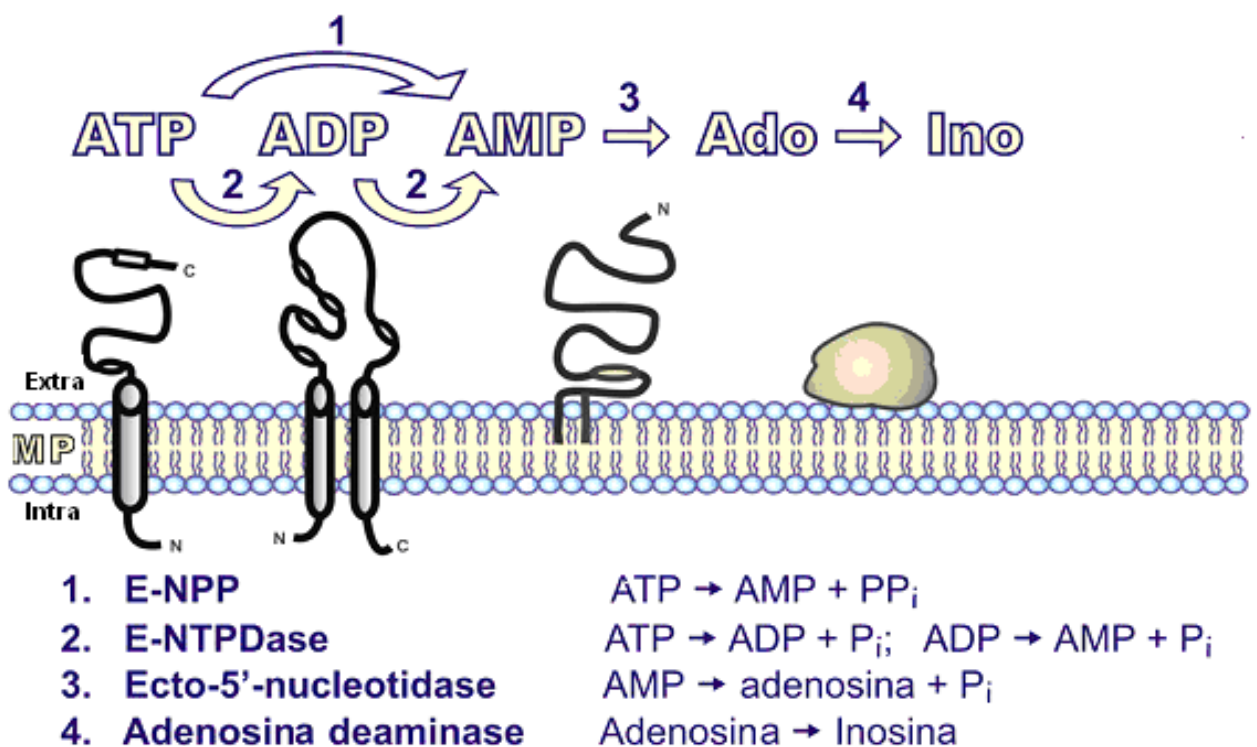


Figura 2 – Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina e adenosina.

FONTE: YEGUTKIN, 2008, com adaptações.

As NTPDases são uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN et al., 2007). Dos oito membros já identificados dessa família, quatro são enzimas tipicamente localizadas na membrana celular com um sítio catalítico na face extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8), e as outras quatro exibem localização intracelular (NTPDase 4, 5, 6 e 7) (Figura 3) (ROBSON et al., 2006).

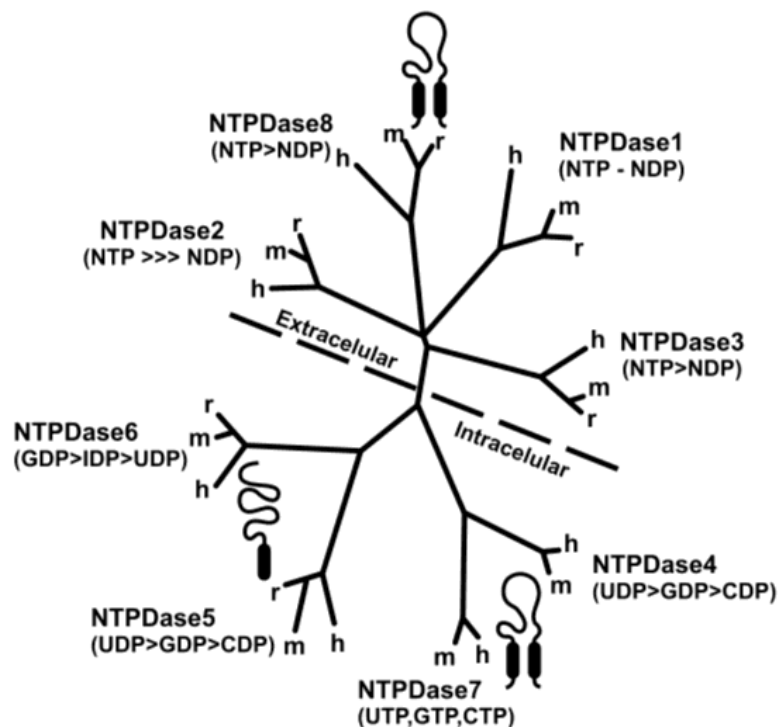


Figura 3 – Membros da família NTPDase.

FONTE: ROBSON et al., 2006, com adaptações.

Essas enzimas são amplamente distribuídas nos tecidos animais e representam as principais ectonucleotidases expressas pelo endotélio e células musculares lisas do sistema circulatório (RÜCKER et al., 2008; SCHETINGER et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 1999). Além disso, a NTPDase1 está ancorada na superfície dos linfócitos, o que lhe confere um importante envolvimento no processo inflamatório (DWYER et al., 2007).

A família das E-NPPs, por sua vez, é constituída por sete enzimas (E-NPP1-7) ligadas à membrana por um único domínio transmembrana, com exceção da E-NPP2, a qual é secretada no meio extracelular. As E-NPP1 e 3 têm uma orientação transmembrana do tipo II, com sua porção aminoterminal voltada para o meio intracelular, enquanto que as E-NPPs 4-7 têm uma orientação do tipo I com sua porção aminoterminal voltada para o meio extracelular (STEFAN et al., 2005).

As E-NPPs apresentam uma ampla especificidade por substratos, entretanto somente as E-NPP1-3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos e são, portanto, relevantes no contexto da sinalização purinérgica (STEFAN et al., 2005). Além disso, a E-NPP2, além da hidrólise do ATP até AMP, é a única capaz de hidrolisar também o AMP em adenosina, conferindo grande importância no processo inflamatório por regular a concentração extracelular de ambos ATP e adenosina (BOURS et al., 2006).

Também é importante destacar que as E-NPPs possuem uma ampla distribuição tecidual, o que lhe confere múltiplos papéis biológicos, incluindo reciclagem de nucleotídeos, proliferação e motilidade celular. De fato, alterações na atividade e expressão de E-NPPs tem sido observadas em várias patologias incluindo câncer, diabetes, DCVs, contudo os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados (BAGATINI et al., 2011; MALDONADO et al., 2008; SCHMATZ et al., 2009).

Assim como as NTPDases e as E-NPPs, a ecto-5'-nucleotidase também participa do metabolismo dos nucleotídeos de adenina, sendo amplamente encontrada em uma variedade de tecidos, como rins, fígado, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune (COLGAN et al., 2006). Entretanto, estudos demonstram que a atividade da ecto-5'-nucleotidase em linfócitos é baixa (LEAL et al., 2005).

Da mesma forma que as demais ectonucleotidases já mencionadas, a ADA, além da isoforma solúvel, também se apresenta ancorada na membrana celular. Por deaminação da adenosina e consequente formação de inosina, essa enzima tem a importante função de controlar os níveis de adenosina extracelular e, assim, regular diversos processos como a inflamação e estados pró-trombóticos. Em adição, a ADA participa da regulação das funções linfocitárias, controlando a diferenciação e proliferação dos linfócitos T (HOVI et al., 1976).

Neste contexto, considerando a importância dos componentes do sistema purinérgico, o que inclui os nucleotídeos, os nucleosídeos, seus receptores e as enzimas ectonucleotidasas, no processo inflamatório, cabe ressaltar o envolvimento desses com uma das principais células ativadas durante a inflamação na SMet: os linfócitos.

Como já descrito, as ectonucleotidasas como NTPDase, E-NPP, ecto-5'-nucleotidase e ADA apresentam-se ancoradas na membrana plasmática dos linfócitos, controlando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e, conseqüentemente, ordenando as ações inflamatórias e imunes dessas células via receptores purinérgicos (BOURS et al., 2006; DWYER et al., 2007; HOVI et al., 1976; LEAL et al., 2005).

De fato, a SMet tem sido caracterizada pela presença de uma inflamação crônica de baixo grau, em que o acúmulo de gordura estimula a liberação de moléculas pró-inflamatórias pelos adipócitos, e, conseqüentemente, ocorre estimulação e ativação das células do sistema imune, incluindo os linfócitos. Estudos indicam que há um aumento na contagem de leucócitos totais nos pacientes com SMet, além de que esse aumento é significativamente associado ao aumento do IMC e da circunferência abdominal (NEBECK et al., 2012). Também, evidencia-se uma tendência de aumento da prevalência da SMet diretamente proporcional ao aumento na contagem do número de linfócitos (PIMENTA, 2008).

Os linfócitos são células nucleadas e agranulócitas (não apresentam grânulos no seu citoplasma) que são identificáveis pela microscopia óptica pela sua imensa massa nuclear esférica e maciça, que ocupa quase todo o seu citoplasma. Tratam-se de células indiferenciadas entre si através deste tipo de microscopia, sendo, contudo, possível diferenciarem-se em vários tipos de linfócitos por técnicas imunocitoquímicas de detecção de receptores específicos em membranas (GOLDSBY et al., 2003).

Essas células têm diversas funções no organismo, todas elas de extrema importância para o sistema imunitário. Dividem-se em linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK, sendo o linfócito T responsável, principalmente, pelo auxílio ao sistema imunitário e resposta imunitária celular, o linfócito B responsável pela resposta imunitária humoral e os linfócitos NK pela resposta imunitária inespecífica (BLUM et al., 2007).

Na inflamação, os linfócitos estimulados liberam moléculas pró-inflamatórias como a IL-6, potencializando a ativação linfocitária com consequente aumento do infiltrado inflamatório no endotélio vascular. Isso facilita a alteração da integridade vascular desencadeada pelo processo inflamatório, favorecendo a formação das placas de aterosclerose (ROBBINS et al., 2009). Nesse sentido, o controle das ações dos linfócitos pelo sistema purinérgico torna-se de grande importância para a patologia da SMet. Entretanto, pouco se sabe sobre a atividade das ectonucleotidases em linfócitos de pacientes com SMet.

Além do sistema purinérgico, diversos estudos têm demonstrado a atuação do sistema colinérgico no controle do processo inflamatório. A ação da acetilcolina (ACh) tem sido extensamente estudada nas patologias que envolvem processos imunológicos e inflamatórios (KAWASHIMA et al., 2003; UNDURTI, 2011).

Por ser um neurotransmissor das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas no sistema nervoso central e periférico, a ACh é a principal molécula envolvida nas funções desse sistema. No entanto, recentes experiências envolvendo seres humanos têm documentado uma expressão ampla do sistema colinérgico também em vários tecidos não neuronais, ou seja, em células do sistema imunológico e sanguíneo (ALMEIDA et al., 2010).

Esses tecidos não neuronais possuem um sistema colinérgico completo, constituído de ACh, receptores muscarínicos e nicotínicos, colina acetiltransferase, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). No sangue, a circulação de ACh pode regular várias funções fisiológicas, incluindo a modulação imunológica através da diferenciação e ativação dos linfócitos (TAYEBATI et al., 2002). Assim, a ACh liberada pelos linfócitos pode ter ação imunomoduladora, via receptores muscarínicos e nicotínicos, e sua propriedade anti-inflamatória torna-se evidente quando presente em concentrações elevadas, como nos processos inflamatórios (ALMEIDA et al., 2010).

Estudos tem demonstrado estreita relação do nervo vago com a imunomodulação via ACh. A estimulação do nervo vago, podendo ocorrer através da colecistoquinina (CCK) liberada após a ingestão de uma dieta hipercalórica, resulta na liberação de ACh para a circulação, a qual atua sobre as células do sistema imune através dos receptores nicotínicos ($\alpha 7nAChR$) e assim inibe a secreção de moléculas pró-inflamatórias por essas células. Essa imunomodulação é conhecida

como via colinérgica anti-inflamatória (PAVLOV et al., 2006) (Figura 4), entretanto, pouco se sabe do efeito dessa via na SMet.

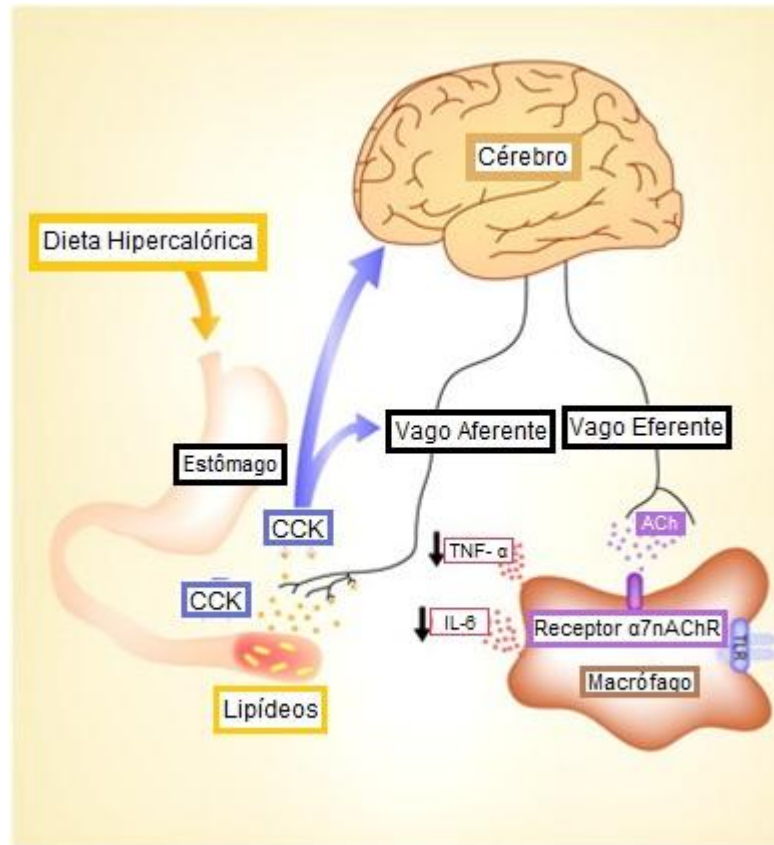


Figura 4 – Desenho esquemático da via colinérgica anti-inflamatória.

FONTE: LUYER et al., 2005, com adaptações.

A ação da ACh é modulada pela atividade das enzimas colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8). Essas enzimas diferenciam-se quanto à distribuição tecidual, propriedades cinéticas e especificidade por substratos (COKUGRAS et al., 1997).

A AChE age especificamente no substrato ACh, promovendo uma inativação da ACh por hidrólise, podendo contribuir, dessa maneira, com a regulação das respostas inflamatórias através da modulação dos níveis de ACh extracelular (KAWASHIMA et al., 2000; TAYEBATI et al., 2002).

A AChE possui um rico polimorfismo, já que existe em uma variedade de formas moleculares que podem ser classificadas como homoméricas ou

heteroméricas, com base na associação com subunidades estruturais especializadas (MASSOULIÉ et al., 1993).

As formas homoméricas incluem as variedades globular monomérica (G1), dimérica (G2) e tetrâmera (G4) (TAYLOR et al., 1999).

As formas heteroméricas, por sua vez, consistem em uma montagem das subunidades estrutural e catalítica, nas quais a ligação, através de pontes dissulfeto, de uma molécula tríplice helicoidal de colágeno a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos resulta nas formas estruturais assimétricas A4, A8 e A12 (MASSOULIÉ et al., 1993).

O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327) (Figura 5).

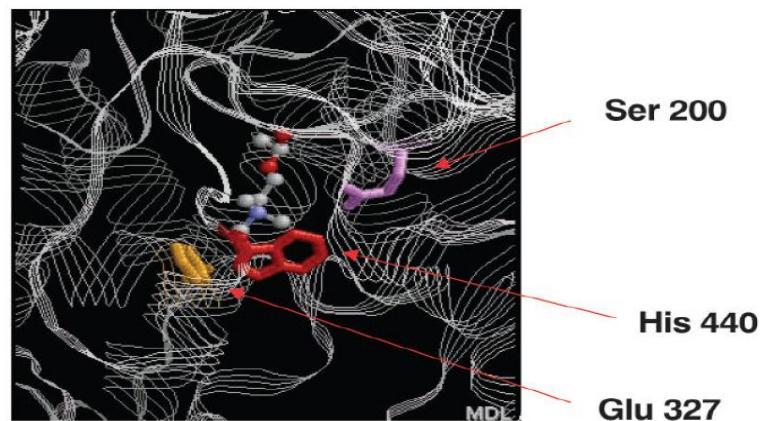


Figura 5 – Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica

Fonte: VIEGAS JÚNIOR et al. (2004), com adaptações.

A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (SILVA, 1998), sendo que, nessas células, a principal forma estrutural encontrada é a G2 (RAKONCZAY et al., 2005).

A BuChE, por sua vez, também conhecida por colinesterase não específica ou pseudocolinesterase, é uma enzima que está presente no soro, nas células hematopoiéticas, no fígado, no coração, no endotélio vascular, nas sinapses colinérgicas e no sistema nervoso central (SILVER, 1974).

Quanto à estrutura, a BuChE é similar a AChE apresentando uma folha β central rodeada por α -hélices (MILLARD et al., 1992). O sítio ativo também contém uma tríade catalítica com os aminoácidos histidina, ácido glutâmico e serina, sendo este último essencial para a atividade catalítica. Há também um sítio aniônico formado pelo aminoácido triptofano e um sítio de acilação no qual o grupo acil dos ésteres de colina encaixa-se durante a catálise (LOCKRIDGE et al., 1987). Apesar da hidrólise do substrato ocorrer na tríade catalítica em ambas as colinesterases, algumas diferenças no curso catalítico, como por exemplo, o maior volume do sítio ativo da BuChE, podem ser importantes na determinação da preferência pelo substrato (HAREL et al., 1993).

Assim como a AChE, a BuChE apresenta diferentes formas moleculares que incluem monômeros e oligômeros com subunidade catalíticas idênticas (SOREQ et al., 2001). As formas globulares monoméricas (G_1) e diméricas (G_2) são simétricas, hidrofílicas e solúveis, enquanto que as tetraméricas (G_4) podem ser assimétricas e estar ancoradas à membrana plasmática por proteínas ricas em prolina (MASSOULIÉ, 2002). Existem também formas assimétricas da BuChE (A_4 , A_8 e A_{12}) constituídas de subunidades catalíticas tetraméricas ligadas à membrana por um filamento colagenoso (MASSOULIÉ et al., 1993).

A BuChE catalisa a hidrólise de ésteres de colina incluindo butirilcolina, succinicolina e ACh, além de hidrolisar outros ésteres como a cocaína, o ácido acetilsalicílico e a heroína (LOCKRIDGE, 1998; MASSOULIÉ et al., 1993).

Apesar da presença em diferentes tecidos, a função fisiológica da BuChE ainda não foi bem estabelecida. A BuChE poderia atuar como um co-regulador da atividade da ACh, tendo importante participação nas diversas funções biológicas exercidas por esse neurotransmissor.

Além de atuar juntamente com a AChE no controle da via colinérgica anti-inflamatória, a atividade da BuChE tem sido relacionada com os fatores de risco cardiovasculares por inúmeras pesquisas. Indivíduos com hiperlipidemia e diabetes apresentam aumento na atividade dessa enzima (KUTTY et al., 1994; RUSTEMEIJER et al., 2001). Corroborando com esses dados, uma correlação positiva entre a BuChE e os níveis séricos de triglicérides, de LDL e de VLDL, bem como uma correlação negativa entre a BuChE e os níveis de HDL, tem sido encontrada há décadas (CUCUIANU et al., 1975; MAGARIAN et al., 1987). Estudos indicam que as lipoproteínas apresentam um grupamento fosfocolina que poderia

interagir com a BuChE, indicando um possível papel dessa enzima no metabolismo dos lipídios (KUTTY et al., 1994; PEPYS et al., 1985) .

Além disso, a BuChE tem demonstrado interações com os diferentes aspectos da SMet, podendo ter um papel no desenvolvimento, na expressão ou no curso da patologia. Em adição, sugere-se que a BuChE esteja envolvida no processo de resistência à insulina, uma vez que essa enzima possui variações estruturais que podem modular a resistência à insulina via mecanismos de estresse oxidativo (SRIDHAR et al., 2010).

Dessa forma, a associação de todo o conjunto do sistema colinérgico com o processo inflamatório, bem como com os fatores de risco cardiovasculares, torna-se de grande relevância para a clínica da SMet. Além disso, o sistema colinérgico, assim como o sistema purinérgico, também desempenha importantes funções imunomoduladoras e de regulação da função celular em linfócitos. Estudos afirmam que os linfócitos apresentam a maioria dos componentes encontrados nos nervos colinérgicos, incluindo ACh, colina acetiltransferase, transportador de colina, receptores muscarínicos e nicotínicos, bem como a enzima AChE (KAWASHIMA et al., 2000, 2003).

Acredita-se que a ACh e outros agonistas dos receptores muscarínicos e nicotínicos aumentam a citotoxicidade dos linfócitos por aumentar o teor de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), modulando a síntese de DNA e a proliferação celular (KAWASHIMA et al., 2000, MASLINSKI, 1989). A ativação imunológica de linfócitos parece aumentar também a expressão de receptores muscarínicos e das enzimas colinérgicas, melhorando a transmissão de sinal entre as células imunes (FUJII et al., 2002; RINNER et al., 1998).

Mudanças na atividade colinérgica linfocítica podem resultar em disfunções do sistema imune, conforme observado em algumas patologias, como na hipertensão (TAKEICHI, 1995). De fato, as alterações inflamatórias e a ativação do sistema imune observado nos pacientes com SMet podem ter relação com possíveis alterações na atividade colinérgica linfocítica.

Portanto, tendo em vista a importância dos sistemas purinérgico e colinérgico no processo inflamatório e seus efeitos na patologia da SMet, torna-se de grande relevância o estudo desses sistemas para elucidar o mecanismo fisiopatológico da SMet.

A descoberta de novas evidências sobre essa síndrome tem sido amplamente estimulada por alguns pesquisadores, uma vez que devido à diversidade de conceitos da SMet, busca-se a sua melhor forma de classificação e, para isso, são necessárias maiores informações para esclarecer a sua patologia (SADIKOT et al. 2010; ZIMMET et al., 2005). Em adição, a descoberta de novos marcadores inflamatórios associados aos riscos cardiovasculares pode auxiliar na melhoria da identificação dos pacientes assintomáticos.

Por outro lado, a SMet é um transtorno de definição ampla, com vários fatores de riscos subjacentes, não tendo uma causa unitária e com aspectos fisiopatológicos não bem esclarecidos. Por isso, alguns pesquisadores apoiam a ideia de que a SMet poderia ser desconsiderada na clínica (GALE, 2005; KAHN, 2006; VINICOR et al., 2004). Entretanto, cabe ressaltar alguns aspectos referentes à importância da SMet como: a associação dos fatores de risco cardiovasculares apresenta um maior potencial de prever eventos cardiovasculares futuros do que cada fator separadamente; apesar de não haver uma causa unitária, é de grande valia identificar os principais fatores de risco que favorecem o aparecimento dos demais e as possíveis formas de tratar e prevenir os mesmos; a ligação entre os fatores de risco engloba de maneira concisa todas as alterações metabólicas, incluindo os fatores de risco ocultos, como o processo inflamatório e a formação de placas de aterosclerose (SADIKOT et al., 2010).

De fato, o tratamento individual de cada fator de risco da SMet reduz somente 50% do risco de eventos cardiovasculares. Assim, o conjunto dos fatores cardiovasculares que caracterizam a SMet apresentam efeitos multiplicativos, o que poderia facilitar o desenvolvimento dos fatores de risco ocultos, os quais, apesar de não serem analisados no diagnóstico e tratamento da SMet, são de grande importância na patologia da síndrome (KANNEL et al., 1993; ZIMMET et al., 2005).

Nesse sentido, considerando a importância da SMet como forma de prognóstico de DCV, associada ao desenvolvimento de um estado inflamatório crônico de baixo grau, ao potencial imunomodulador dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, ao notável papel do sistema colinérgico extraneuronal na função imune e inflamatória e à necessidade de melhor se esclarecer a fisiopatologia dessa síndrome, é de grande importância o estudo do envolvimento dos sistemas purinérgico e colinérgico no processo inflamatório de pacientes diagnosticados com SMet.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico e os níveis de marcadores inflamatórios em pacientes com SMet.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com SMet.
- Verificar a atividade das enzimas ADA e E-NPP em soro dos pacientes em estudo.
- Analisar a atividade das enzimas AChE e BuChE em linfócitos e soro, respectivamente, desses pacientes.
- Medir os níveis de PCR e ácido úrico em soro dos pacientes estudados.
- Estudar a atividade da enzima MPO em plasma desses pacientes.

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item “MANUSCRITO”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÃO**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados apresentados no manuscrito contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS** referem-se somente as citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

MANUSCRITO

**EFEITO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

**EFFECT OF PURINERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN INFLAMMATORY
PROCESS OF METABOLIC SYNDROME PATIENTS**

Este manuscrito está formatado de acordo com as normas da revista *Life Science*,
na qual está submetido.

**Effect of purinergic and cholinergic systems in inflammatory process of
Metabolic Syndrome patients**

Caroline Curry Martins^a, Margarete Dulce Bagatini^{b,*}, Andreia Machado Cardoso^a,
Daniela Zanini^a, Fátima Abdalla^a, Jucimara Baldissarelli^a, Victor Camera Pimentel^a,
Diéssica Padilha Dalenogare^a, Daniela Lopes dos Santos^c, Maria Rosa Chitolina
Schetinger^a, Vera Maria Morsch^a.

Name of the Department:

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

^b Curso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, SC, Brazil.

^c Grupo de Atividade Física, Centro de Educação Física, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

Prof Dr Margarete Dulce Bagatini

Curso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul

Chapecó, SC, Brazil - 89812-000

Fax: 0+5555 3220 9557 or e-mail: margaretebagatini@yahoo.com.br

There is no potential conflict of interest in this paper.

ABSTRACT

Aims: Metabolic Syndrome (MetS) is a pathology accompanied by inflammatory process, which has been considered basic point in the development of atherosclerosis and cardiovascular diseases. Purinergic and cholinergic systems play important roles in the regulation of inflammatory process, but little is known about the effect of these systems in inflammation-related MetS. Thus, in this study it was evaluated the enzymes of purinergic and cholinergic systems linking their action with inflammatory processes during MetS condition.

Main methods: Twenty MetS patients and twenty control patients were recruited to be part of this study. Ecto-nucleotidases, ADA and cholinesterase enzymes were analyzed in lymphocytes and serum of these patients. In addition, classical inflammatory marker levels were measured to investigate the inflammatory process in MetS.

Key findings: Our results showed a decrease in the activity of purinergic enzymes in lymphocytes, but an increase of serum activity for MetS patients. However, cholinesterase enzymes showed an increased activity for both lymphocytes and serum of MetS patients.

Significance: These findings suggest that purinergic and cholinergic systems may have important functions in the modulation of inflammatory response during MetS, being possibly important ways of research to discovery new drugs for this disease.

Keywords:

Metabolic Syndrome; Obesity; Ectonucleotidase; Cholinesterase; Inflammation

INTRODUCTION

Metabolic Syndrome (MetS) is a condition characterized by presence of a risk factor group for cardiovascular diseases, such as high fasting glucose, high blood pressure, hypertriglyceridemia, low HDL cholesterol and abdominal obesity (Ryan et al 2010). This disease has been widely discussed since its prevention and treatment is able to reduce the high rates of cardiovascular morbidity and mortality caused by sedentary lifestyle adopted by general population (Galassi et al 2006; Afsana et al 2010). Although there are some standard therapies for MetS, such as the use of antihypertensive, hypoglycemic and lipid-lowering drugs, it is necessary to develop a therapy that acts concomitantly on all cardiovascular risk factors of MetS as well as on the “hidden risk factors”, such as atherosclerosis process, which is not treated with standard therapy (Sadikot and Hermans 2010).

Numerous studies have suggested that cardiovascular risks that characterize MetS are directly related to a chronic inflammatory process (Mahadik et al 2008; Lim et al 2005) probably caused by fat accumulation. The new concept about the biological function of adipose tissue reinforces the idea of being not only a supplier and storage of energy, but also a dynamic and central organ in the metabolic regulation. In obesity, the excessive accumulation of lipids makes the vascularity of adipose tissue difficult. In response to hypoxia and to improve blood flow, the adipocyte tissue releases pro-inflammatory molecules into the circulation called adipokines. These molecules can act on immune cells and on several tissues altering the vasoconstrictor and vasodilator functions and stimulating an inflammatory process of low-grade (Maury and Brichard 2010; Avogaro and Kreutzenberg 2005). This

inflammation may be one factor that predisposes the onset of cardiovascular risks associated with MetS (Nishtha et al 2008).

Classic inflammatory markers, such as myeloperoxidase enzyme (MPO) (Lau and Baldus 2006), C-reactive protein (CRP) (Lim et al 2005) and uric acid (Conen et al 2004) have been used to aid the diagnosis of MetS. However, the inflammatory process is complex and involves several control ways, including the purinergic and cholinergic systems. It is known that nucleosides and nucleotides as well as choline esters have important functions in the regulation of the inflammatory process (Bours et al 2006; Undurti 2007).

In purinergic system, extracellular ATP acting through specific cell surface receptors is involved in pro-inflammatory functions such as stimulation and proliferation of lymphocytes and cytokine release (Bours et al 2006; Langston et al 2003). On the other hand, its breakdown product, adenosine, exhibits potent anti-inflammatory and immunosuppressive action by inhibiting the proliferation of T cells and secretion of cytokines (Linden 2006; Deaglio et al 2007).

ATP and adenosine levels can be dynamically controlled during inflammation by the action of enzymes expressed on the cellular membrane of immune cells (Yegutkin 2008). Among these enzymes, we stand out ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase (E-NPP), ecto-5'-nucleotidase and ecto-adenosine deaminase (ADA) (Fürstenau 2006). NTPDase is the membrane-bound enzyme involved in the breakdown of ATP and ADP to AMP, whereas E-NPPs hydrolyze 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives producing nucleotide monophosphate, such as AMP, which is sequentially hydrolyzed by ecto-5'-nucleotidase enzyme to adenosine (Zimmermann et al 2007; Yegutkin 2008). Studies have showed that

alterations in the activity of these enzymes can be very important in immune diseases (Spanevello et al 2010; Leal et al 2005).

Continuing the cascade of degradation of adenine nucleotides and nucleosides, the ADA is considered to be a key enzyme in purine metabolism by catalyzing the irreversible deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine, respectively, closely regulating extracellular adenosine concentrations (Franco et al 1997). ADA is present in all cell types and plays an important role in the lymphocyte function and is essential for the normal growth, differentiation and proliferation of T lymphocytes (Codero et al 2001).

Another important system that acts in the immune regulation is the cholinergic system. Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter that acts in the receptors distributed throughout the body, including in non-innervated tissues (Zimmermann 2008). This neurotransmitter is produced by T lymphocytes and endothelial cells after a stimulus (Kawashima and Fujii 2003). Studies have showed that ACh acts on immune cells through nicotinic receptors and prevents the release of pro-inflammatory molecules, constituting the so-called cholinergic anti-inflammatory pathway (Undurti 2011).

ACh level is controlled by cholinesterase enzymes that hydrolyze ACh into acetate and choline, terminating its action. Among these cholinesterases, acetylcholinesterase (AChE) is present in erythrocytes, lymphocytes, neurons, ganglia of the autonomic nervous system, and motor plates, whereas the butyrylcholinesterase (BuChE) is present in serum, liver, glia, and pancreatic digestive tube walls (Lunkes et al 2006). Cholinesterase activities have been indirectly related with the inflammation by regulating the availability of ACh to the cholinergic anti-inflammatory pathway.

However, despite knowing the importance of purinergic and cholinergic systems in inflammation, little is known about the effect of these systems on the pathology of the MetS. In addition, since MetS has been considered a chronic low-grade inflammation disease, the cholinergic and purinergic system can serve as a target for new treatments for this condition. Thus, the aim of the present study was to evaluate the purinergic and cholinergic enzyme activities in lymphocytes and serum from MetS patients.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Nucleotides and Trizma base were from Sigma (St. Louis, MO). Ficoll-Histopaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

Patients

Twenty volunteer patients (both genders) from the study group of the Department of Physical Education, Federal University of Santa Maria, with MetS were selected for this study. MetS patients were recruited through a single-stage cluster random sampling. These patients practiced no physical activity and were aged between 45 and 65 years.

MetS was characterized by the classification of the National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP - ATP III, 2001), which defines MetS as the presence of at least three of the criteria below:

- Abdominal circumference equal to or greater than 102 cm for men and equal to or greater than 88 cm for women;
- Triglycerides equal to or greater than 150 mg/dL or specific treatment for hypertriglyceridemia;
- HDL cholesterol less than 40 mg/dL in men and less than 50 mg/dL in women or specific treatment for low HDL;
- Systolic blood pressure equal to or greater than 130 mmHg or diastolic blood pressure greater than or equal to 85 mmHg or antihypertensive treatment;
- Fasting glucose equal to or greater than 110 mg/dL or treatment for hyperglycemia.

The control group consisted of 20 individuals recruited randomly with the same age as the MetS patients. They presented normal blood pressure and were free of diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, alcoholism, cigarette smoking, or chronic diseases. Moreover, they had not been submitted to any pharmacological therapy during the month before the study.

All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, protocol number 0098.0.243.000-10, Brazil. Ten milliliters of blood was obtained from each patient and used for isolation of lymphocytes and biochemical determinations. The same procedure was carried out for the control group. Patient general characteristics are shown in Table 1.

Anthropometric measurement, biochemical parameters and inflammatory markers

Height, body weight and abdominal circumference were measured with a flexible tape measure. Body mass index (BMI) was calculated as weight divided by height

squared (kg/m^2). The morning blood pressure was recorded between 7 and 9 a.m., after subjects had been in a relaxed state for at least 10 min. The blood was collected after 8-14h overnight fasting in tubes with and without an anticoagulant system. The tubes with an anticoagulant system were used to the isolation of lymphocytes and plasma, whereas tubes without an anticoagulant system were centrifuged at $1800 \times g$ for 10 min. The precipitate was discarded and the serum was used to determine ADA and BuChE activities as well as the level of HDL, total cholesterol, triglycerides, glucose and uric acid by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics[®] reagents on a fully automated analyzer (Vitros[®] 950 dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). The level of LDL-cholesterol (mg/dL) was calculated by using the following Friedewald formula (1972): $[\text{total cholesterol (mg/dL)} - [\text{HDL-cholesterol (mg/dL)} + (\text{triglyceride (mg/dL)}/5)]]$. The level of CRP was determined in serum by nephelometry (Dade Behring, Newark, DE, USA).

Isolation of mononuclear cells from human blood

Mononuclear leukocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum (1968). Despite the methodology described above used to separate mononuclear cells, the work done by Jaques et al. (2009) demonstrated that there is a high incidence of lymphocytes in separate samples and the amount of monocytes is almost insignificant. For this reason we have treated the samples as containing only lymphocytes.

MPO assay

MPO activity was measured in plasma from human blood collected with EDTA and followed by centrifugation at 1800 x g for 10 min. The MPO activity was analyzed spectrophotometrically by a modified peroxidase-coupled assay system involving phenol, 4-aminoantipyrine (AAP) and H₂O₂ (Metcalf 1986). Briefly, 390 µL of 2.5 mM AAP and 20 mM phenol were placed in each tube, followed by 450 µL of 1.7 mM H₂O₂. In the presence of H₂O₂ as oxidizing agent, MPO catalyzed the oxidative coupling of phenol and AAP yielding a colored product, quinoneimine, with a maximum absorbance at 500 nm. The millimolar absorbance coefficient for the quinoneimine was determined to be $\Sigma = 14 \pm 0.1/\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, close to the previously reported values (Kayyali et al 2001). Results were expressed in micromolar of quinoneimine produced at 30 min.

NTPDase assay

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal et al (2005). The reaction medium contained 0.5 mmol/L CaCl₂, 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 6 mmol/L glucose and 50mmol/L Tris–HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200 µl. Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2-4 µg of protein) and pre-incubated for 10 min at 37 °C and incubation proceeded for 70min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mmol/L and stopped with 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-

enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

ADA assay

ADA from lymphocytes and ADA serum were determined according to Guisti and Gakis (1971) based on the Bertholet reaction, that is, the formation of a colored indophenol complex from ammonia released from adenosine and quantified spectrophotometrically. Briefly, 25 μ L of lymphocytes or 50 μ L of serum reacted with 21 mmol/L of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The protein content for lymphocytes experiment was adjusted between 0.1- 0.2 mg/mL. Results were expressed in U/L. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

E-NPP assay

The E-NPP activity from serum was assessed using *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Sakura et al. (1998). The reaction medium containing *p*-Nph-5'-TMP as substrate (at a final concentration of 0.5 mM) in 100 mM Tris-HCl pH 8.9 was incubated with 1 mg of serum protein at 37 °C for 5 min in a final volume of 200 μ L and the reaction was stopped by 200 μ L of NaOH 0.2 N. Controls to correct nonenzymatic substrate hydrolysis were performed by adding serum after the reaction was stopped with NaOH. All samples were performed in duplicate. Enzyme activities were generally expressed as nmol *p*-nitrophenol released/min/mg protein.

AChE assay

After isolation of the lymphocytes, AChE activity was determined according to the method described by Ellman et al. (1961) modified by Worek (1999). Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1-0.2 mg/mL. 0.2 mL intact cells were added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine (ATC), 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic (DTNB), and 0.1 mM phosphate buffer (pH 8.0). The absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm immediately before and after incubation for 30 min at 27 °C. AChE was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content and the results are expressed as $\mu\text{mol}/\text{AcSCh}/\text{mg}$ of protein.

BuChE assay

The BuChE enzymatic assay was determined in serum by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961). The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 and 1.0 mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25°C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM butyrylthiocholine iodide (BuSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol BuSCh}/\text{h}/\text{mg}$ of protein.

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Student's t test for independent samples. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all analyses used. All data were expressed as mean \pm SD.

RESULTS

Anthropometric and Biochemical Characteristics

Clinical characteristics, anthropometric measurements and biochemical determinations of the study group are shown in Table 1. We observed that all cardiovascular risk factors, including high fasting glucose, high blood pressure, hypertriglyceridemia, low HDL cholesterol, and central obesity reported a prevalence of more than 50% in the MetS group, whereas for the control group the prevalence of these risk factors was absent or less than 20%. In addition, the BMI mean value for the MetS group (35.1 ± 5.1) demonstrates the presence of moderate obesity, in which the weight may represent high risk of metabolic complications.

Inflammatory Markers

As can be observed in Table 2, all inflammatory marker levels, including CRP, uric acid and MPO activity had a significant increase for the MetS group when compared with the control group ($P < 0.003$; $P < 0.05$; $P < 0.00001$), indicating the presence of inflammatory process in the MetS patients.

Purinergic System

When the NTPDase activity was determined in lymphocytes, we observed a significant decrease in the activity of this enzyme for both substrates ATP and ADP from MetS patients when compared with the control group, $P < 0.001$, as demonstrated in Fig. 1A and 1B. Furthermore, the same result was observed for the ADA activity in lymphocytes, $P < 0.002$, as shown in Fig. 1C.

Fig. 2 shows the E-NPP activity in serum. An increase in the E-NPP activity was observed in MetS group when compared with the control group ($P < 0.008$). Similarly, the ADA activity in serum was increased in the MetS group when compared with the control group ($P < 0.006$), as demonstrated in Fig. 3.

Cholinergic System

Statistical analysis of the AChE activity from lymphocytes revealed that MetS patients had a significant increase in the activity of this enzyme when compared with the control group, $P < 0.000001$, as shown in Fig. 4. In addition, as can be observed in Fig. 5, the BuChE activity in serum was also increased from MetS patients when compared with the control group ($P < 0.0001$).

DISCUSSION

MetS is a condition marked by the presence of a set of cardiovascular risk factors and its treatment is based on the cure of each factor individually with the use of drugs such as antihypertensive and hypoglycemic. Studies have pointed out that the summation of the individual cardiovascular risk factors represent only 50% of the cardiovascular risk and current therapies do not act on the “hidden risks”, such as

atherosclerosis process, reducing risk by only 50% (Zimmet and Alberti 2005). However, due to fat accumulation and consequent release of pro-inflammatory cytokines, the MetS has been placed as a chronic inflammatory disease, since the inflammation favors the appearance of characteristics of MetS and the development of cardiovascular diseases (Lim et al 2005).

The cardiovascular risks that compose the MetS, such as high blood pressure, high fasting glucose, hypertriglyceridemia, and low HDL cholesterol have showed a higher prevalence in the MetS group, confirming the presence of this disease in the patients recruited in this study. In addition, one of the factors that favors the development of MetS is overweight. As can be observed, more than half of the MetS group showed central obesity and the mean of BMI was typical of obesity for MetS.

Obesity is characterized by excessive fat accumulation in adipose tissue. In this condition, adipocytes are activated and stimulated to release pro-inflammatory molecules known as adipokynes, which act producing a systemic inflammation of low-grade (Maury and Brichard 2010). Several studies have indicated the inflammatory process as a central factor in the appearance of MetS (Maury and Brichard 2010; Nishtha et al 2008; Lau and Baldus 2006). Since literature reports widely the development of inflammation in MetS, it is of great importance to evaluate the involvement of purinergic and cholinergic systems in this complication.

Extracellular nucleotides that comprise the purinergic system, such as ATP and ADP, are well known to participate of immunity regulation through its release by immune cells during inflammatory process. These extracellular nucleotides are able to bind to specific receptors and to activate the inflammation and release of pro-inflammatory molecules. However, they are scavenged by specific ectonucleotidase

enzymes to generate phosphohydrolytic immune suppressive derivatives, such as adenosine (Zhiwen and Tianru 2010).

Thus, in this study we evaluated the role of NTPDase and ADA in lymphocytes of MetS patients in order to contribute to the understanding of the pathogenesis and the involvement of the purinergic system in this disease. The results of the present study demonstrate that both NTPDase and ADA activities were decreased in lymphocytes from MetS patients. The decrease in the NTPDase activity may indicate that the inflammatory process is activated in this disease, since a lower degradation of ATP permits that a greater amount of ATP remains available to exert its pro-inflammatory effects on immune cells.

Moreover, the low NTPDase activity also allows the accumulation of ADP, a molecule known to stimulate platelet aggregation (Bagatini et al 2011), increasing the cardiovascular risks in MetS patients. In addition, the decrease in ATP and ADP hydrolysis in lymphocytes produces a smaller amount of adenosine, providing less substrate to ADA enzyme and thus decreasing its activity. Although there has been no studies linking the purinergic system with MetS, some studies have demonstrated that NTPDase and ADA enzymes have significant alterations in their activities in several diseases in which immunity is altered (Franco et al 1997; Codero et al 2001).

Furthermore, it was evaluated the activity of E-NPP enzyme to better connect purinergic system and MetS, since lymphocytes exhibit low ecto-5'-nucleotidase activity (Leal et al 2005). E-NPP isoform 2 is soluble and besides hydrolyzing ATP to AMP it also hydrolyzes AMP to adenosine (Goding et al 2003), whereas ecto-5'-nucleotidase enzyme hydrolyzes only AMP to adenosine. Thus, we analyzed the E-NPP activity in serum. The E-NPP activity was increased in serum of MetS patients, suggesting that this condition may increase the levels of adenosine as a

compensatory mechanism opposite to inflammation, since adenosine is a molecule that reduces the inflammatory process (Bours et al 2006).

However, when the ADA activity in serum was analyzed, it was also observed an increase in the activity of this enzyme in MetS patients, probably due to the increased availability of adenosine for ADA action. Thus, although the E-NPP activity may have increased the amount of adenosine, as final result we observed reduced adenosine levels by the action of ADA, which could causes the inflammatory process. In addition, a study demonstrated that an increase in interferon- α (IFN α) level induces the up-regulation of ecto-enzymes with increased enzymatic activity in several cells, but not in lymphocytes (Niemela et al 2004). In this sense, it is well established that there is an increase of pro-inflammatory molecule levels, such as interleukins, tumor necrosis factor and IFN α during MetS and this could justify the increase of E-NPP and ADA activities in serum (Shin et al 2009).

Cholinergic system is a signalization way that also modulates the immunity through the action of the neurotransmitter ACh. The “cholinergic anti-inflammatory pathway” was recently established as a regulator of pro-inflammatory cytokine production through the efferent vagus nerve (Nizri et al 2006). In this way, the vagus nerve stimulation induces ACh release and interacts with the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) present in the membrane of immune cells, inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages and other cells (Pavlov and Tracey 2006). However, AChE and BuChE enzymes hydrolyze ACh terminating its action and serving to modulate the cholinergic anti-inflammatory reflex (Shaked and Soreq 2006). Despite the cholinesterase enzymes present in common the modulation of ACh levels, these enzymes exhibit some differences, such as the presence of AChE in the central nervous system, in platelet, lymphocytes and

erythrocyte membranes, while BuChE is more abundant in the serum (Massoulié et al 1993).

Thus, in order to evaluate the effect of the cholinergic system in inflammation-related MetS, we also investigated the AChE activity in lymphocytes and BuChE activity in serum. The results of this study showed an increase in both AChE and BuChE activities in MetS patients, probably to favor inflammatory process as response to the fat accumulation. The increase in the cholinesterase activity may lead to lower ACh levels available to act on the nicotinic receptor and to inhibit cytokine release by immune cells, providing the inflammation in MetS.

Moreover, a decrease in ACh levels may result in a lower vasodilator effect of this neurotransmitter and thus facilitate the development of hypertension (Sauvet et al 2011). As can be observed, more than half of the MetS group showed hypertension and obesity, underscoring our hypothesis that the alteration of immune modulation by purinergic and cholinergic system could promote the presence of cardiovascular risks characteristics of MetS. In addition, studies indicate that hyperlipidemia is associated with an increased serum BuChE activity in humans and that BuChE may have a role in the development, expression or course of the MetS, but the mechanism of this relationship should be further clarified (Stojanov et al 2011).

Reinforcing this line of reasoning and with the objective to confirm the presence of an inflammatory condition in MetS, we evaluated the levels of classic inflammatory markers such as CRP, uric acid and MPO activity. All inflammatory markers were increased in MetS patients indicating not only inflammatory process, but also a higher risk for cardiovascular disease. CRP and uric acid have been identified in subjects at high risk for progression diabetes and related cardiovascular disease (Ridker et al 2003; Gomes and Milton 2010). In addition, high plasma MPO is

reported to be a risk factor for early adverse cardiac events and to be associated with endothelial dysfunction (Wong et al 2009).

Thus, this study showed the importance of the purinergic and cholinergic systems in inflammatory conditions of MetS and reinforced the idea that the inflammatory process is responsible for the emergence of cardiovascular risk factors.

CONCLUSION

The considerations of this study reinforces the presence of inflammatory process in MetS patients and highlights the fact that the purinergic and the cholinergic systems are important ways to control the course of inflammation, which may be an important point of progressing to cardiovascular diseases.

Thus, since MetS is marked by a chronic low-inflammation, it would be interesting to investigate a possible control of the inflammatory process from purinergic and cholinergic systems through the interaction with receptors and signaling molecules of these systems. The modulation of the inflammation is a strategy to control and to treat the MetS as a whole, including the “hidden risks” as well as classic cardiovascular risks.

ABBREVIATIONS

ACh – Acetylcholine

AChE – Acetylcholinesterase

ADA - Ecto-adenosine deaminase

BMI – Body Mass Index

BuChE - Butyrylcholinesterase

CRP – C-Reactive Protein

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

E-NPP - Ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase

HDL – High Density Lipoprotein

IFN α – Interferon- α

LDL – Low Density Lipoprotein

MetS – Metabolic Syndrome

MPO - Myeloperoxidase

NTPDase - Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) for financial support.

REFERENCES

Afsana F, Latif ZA, Haq M, et al. Characteristics of different parameters of metabolic syndrome in subjects undergoing coronary angiogram and their association with peripheral vascular disease *Diabetes & Met Synd: Clin Res & Rev* 2010; 4: 220–225.

Avogaro A, Kreutzenberg SV. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 9 –26.

Bagatini MD, Martins CC, Gasparetto D, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta* 2011; 412:159–164.

Bours M, Swennen E, Di Virgilio F, Cronstein B, Dagnelie P. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 358–404.

Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97:77–89.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem* 1976; 72: 248–254.

Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375–8.

Codero O, Salgado F, Fernández-Alonso C, et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001;70:920–30.

Conen D, Wietlisbach V, Bovet P, et al. Prevalence of hyperuricemia and relation of serum uric acid with cardiovascular risk factors in a developing country. *BMC Public Health* 2004; 4: 9.

Deaglio S, Dwyer K, Gao W, et al. Adenosine generation catalysed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204: 1257–65.

- Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88–95.
- Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
- Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology* 1997; 52: 283–294.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JJF. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006; 17: 84–91.
- Galassi A, Reynolds K, He J. Metabolic syndrome and risk cardiovascular diseases: a meta-analysis. *Am J Med* 2006; 9: 119-812.
- Giusti G, Gakis C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 1971;12:417–25.
- Goding JW, Grobber B, Slegers H. Physiological and patophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638:1–19.
- Gomes TG; Milton K, Hyperuricemia, vascular lesion and systemic arterial hypertension, *Acta Med* 2010; 31: 460-469.

Jaques JAS, Rezer JFP, Ruchel JB, et al, A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity, *Anal. Biochem* 2009; 410: 34-39.

Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences* 2003; 74: 675–696.

Kayyali US, Moore TB, Randall JC, Richardson RJ. Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions based on detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophoro spectrum. *J Anal Toxicol* 1991; 15:86–89.

Langston H, Ke Y, Gewirtz A, Dombrowski K, Kapp J. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003; 170: 2962–70.

Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmac Therap* 2006; 111: 16–26.

Leal D, Streher C, Bertoncheli C, et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746:129–34.

Leal D, Streher C, Neu T, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721:9–11.

Lim S, Lee HK, Kimm KC, et al. C-reactive protein level as an independent risk factor of metabolic syndrome in the Korean population. CRP as risk factor of metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pr* 2005; 70: 126–133.

Linden J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 2006; 116: 1835–7.

- Lunkes GI, Stefanello F, Lunkes DS, et al. Serum cholinesterase activity in diabetes and associated pathologies. *Diabetes Res Clin Pr* 2006; 72: 28–32.
- Mahadik SR, Deo SS, Mehtalia SD. Relation of C-reactive protein with the components of metabolic syndrome in Asian Indian subjects. *Diabetes & Met Synd: Clin Res & Rev* 2008; 2: 29—35.
- Massoulie J, Pezzementi L, Bom S, Krejci E. Molecular and cellular biology of cholinesterase, *Prog. Neurobiol* 1993; 41:31–41.
- Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molec Cel Endo* 2010; 314: 1–16.
- Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK. *Laboratory manual of neutrophil function*. 1986. Raven Press, New York.
- Niemela J, Henttinen T, Yegutkin GG, et al. IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol* 2004; 172(3): 1646–1653.
- Nishtha J, Naseem I, Ahmad J. Small dense LDL oxidation in hypertensives and diabetics and prediction of Metabolic Syndrome. *Diabetes & Met Synd: Clin Res & Rev* 2008; 2: 21—27.
- Nizri E, Amitay YH, Sicsic C, et al. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacolog* 2006; 50: 540-547.
- Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem Soc Transac* 2006; 34 (Pt 6): 1037–1040.
- Ridker PM, Buring JE, Cook N, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy. American women, *Circulation* 2003; 107: 391–397.

Ryan JG, Brewster C, Maria PD, et al. Metabolic syndrome and prevalence in an urban, medically underserved, community-based population. *Diabetes & Met Synd: Clin Res & Rev* 2010; 4: 137–142.

Sadikot S, Hermans M. Here we go again . . . The metabolic syndrome revisited! *Diabetes & Met Synd: Clin Res & Rev* 2010; 4: 111–120.

Sakura H, Nakashima A, Maeda M. Characterization of fetal serum 5'- nucleotide phosphodiesterase: a novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation. *Thromb Res* 1998; 91:83–9.

Sauvet F, Mahé G, Chennaoui M, et al. Acetylcholine chloride as a potential source of variability in the study of cutaneous vascular function in man. *Microvasc Res*, Vol 82, Issue 2, September 2011, Pag 190-197.

Shaked I, Soreq H. Studying cholinergic features by transgenic manipulations of acetylcholinesterase gene expression. In: Ezio Giacobini, G.P., *The Brain Cholinergic System in Health and Disease*. Informa Health Care, London UK, 2006: 125–140.

Shin MJ, Lee KH, Chung JH, et al. Circulating IL-8 levels in heart failure patients with and without metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2009; 405: 139-142.

Spanevello RM, Mazzanti CM, Schmatz R, et al. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients *Clin Chim Acta* 2010; 411: 210–214.

Stojanov M, Stefanović A, Džingalašević G, et al. Butyrylcholinesterase activity in young men and women: Association with cardiovascular risk factors. *Clin Biochem* 2011; 44: 623–626.

Undurti ND. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 2007; 13(12): RA214-221.

Undurti ND. Vagus nerve stimulation as a strategy to prevent and manage metabolic syndrome. *Medi Hypoth* 2011; 76: 429–433.

Wong ND, Gransar H, Narula J, et al. Myeloperoxidase: Subclinical Atherosclerosis and Cardiovascular Disease Events. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2009; 2, N^o.9.

Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold D, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Chim Clin Acta* 1999; 288:73–90.

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 673–94.

Zhiwen Y, Tianru J. Extracellular high dosages of adenosine triphosphate induce inflammatory response and insulin resistance in rat adipocytes. *Biochem and Biophys Res Communic* 2010; 402: 455–460.

Zimmermann H, Mishra S, Shukla V, et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An R Acad Nac Farm* 2007;73: 537–66.

Zimmermann H. ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neuroch Interna* 2008; 52: 634–648.

Zimmet P, Alberti G. The metabolic syndrome: perhaps an etiologic mystery but far from amyth—where does the International Diabetes Federation stand. *Medscape Diabetes Endocrinol* 2005;7:2.

Table 1 – Anthropometric and biochemical characteristics of the study population. (n = 20)^a

	Control	Metabolic Syndrome
Age (yr)	54 ± 11.3	46 ± 12.9
Male/female	6/14	4/16
High blood pressure (%)	14.2	60.8
SBP (mmHg)	121 ± 14.3	144 ± 28
DBP (mmHg)	79 ± 5.8	90 ± 13
Central obesity (%)	-	60
Waist circumference (cm)	89 ± 11.3	115 ± 2.2
BMI (Kg/m ²)	26.3 ± 4.3	35.1 ± 5.1
High fasting glucose (%)	-	51.2
Glycemia (mg/dL)	81.5 ± 12.6	107.7 ± 22.7
Hypertriglyceridemia (%)	9.5	51.2
Triglyceridemia (mg/dL)	94.4 ± 32.7	161.5 ± 60
Total cholesterol (mg/dL)	178.7 ± 27.5	172.7 ± 30.6
LDL cholesterol (mg/dL)	88.2 ± 35.9	103.5 ± 17.6
Low HDL cholesterol (%)	19	55.2
HDL cholesterol (mg/dL)	57.6 ± 9.6	49.3 ± 3.1

SBP/DBP, systolic/diastolic blood pressure; BMI, body mass index.

^a Values are expressed as means with standard deviation (S.D.) or n with %.

Table 2 – Inflammatory marker levels of the study population. (n = 20)^a

	Control	Metabolic Syndrome
CRP(mg/L)	0.10 ± 0.05	2.06 ± 0.12*
Uric Acid (mg/dL)	4.36 ± 0.59	5.65 ± 1.5*
MPO activity (µM Quinoneimine)	0.97 ± 0.04	1.92 ± 0.125*

CRP, C-reactive protein; MPO, myeloperoxidase enzyme.

^a Values are expressed as means with standard deviation (S.D.) or n with %.

* represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$)

LEGENDS

Fig. 1- NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrates and ADA activity (C) using adenosine as substrate in lymphocytes of control and MetS patients. Bars represent means \pm SD. * represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$ n=20).

Fig. 2- E-NPP activity in serum of control and MetS patients. Bars represent means \pm SD. * represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$ n=20).

Fig. 3- ADA activity in serum of control and MetS patients. Bars represent means \pm SD. * represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$ n=20).

Fig. 4- AChE activity in lymphocytes of control and MetS patients. Data represent the mean \pm SD of 20 individuals. ** represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.0005$).

Fig. 5- BuChE activity in serum of control and MetS patients. Data represent the mean \pm SD of 20 individuals. * represents statistical difference from the control group (Student's t test, $P < 0.05$).

Fig. 1

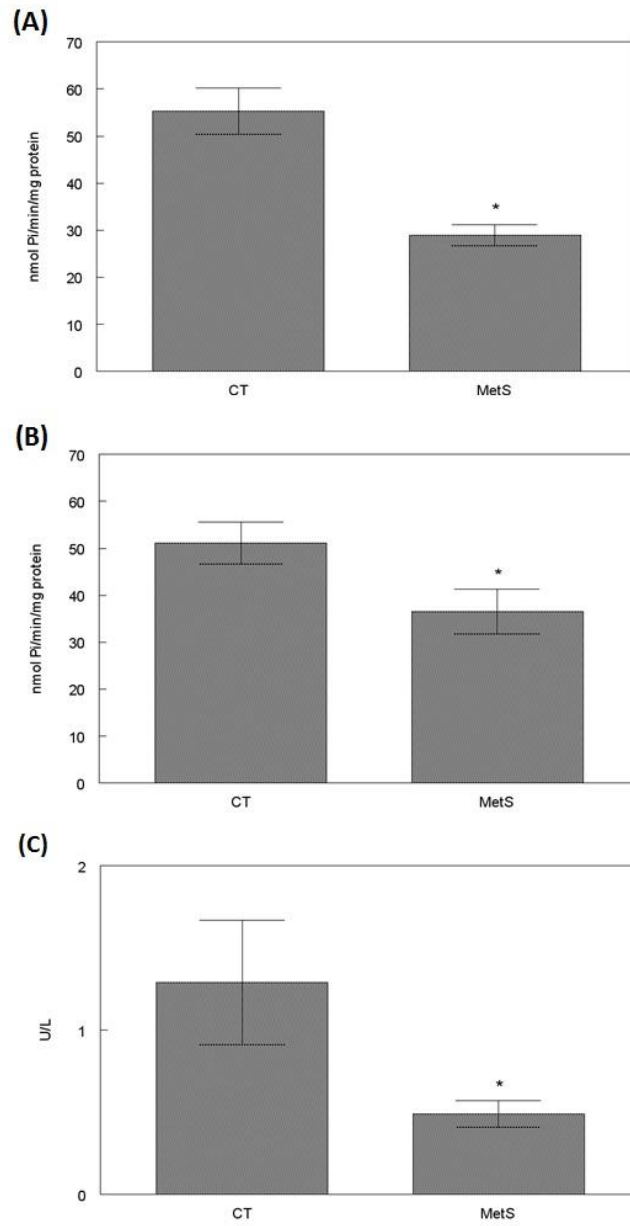


Fig. 2

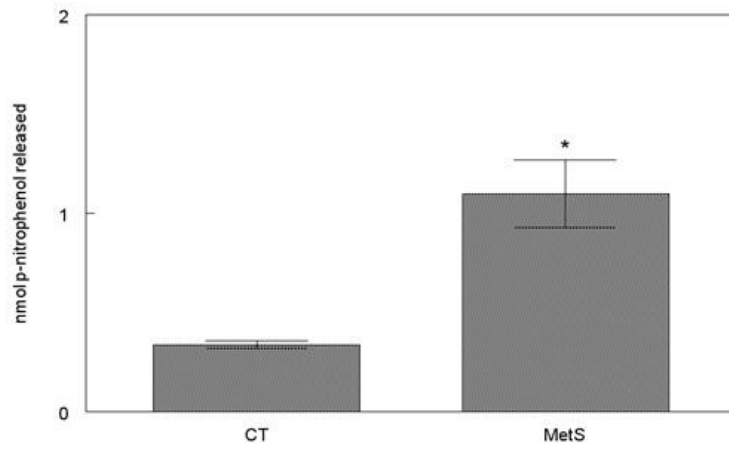


Fig. 3

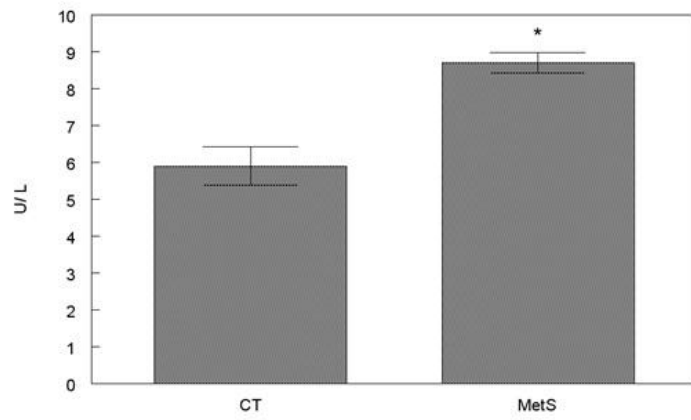


Fig. 4

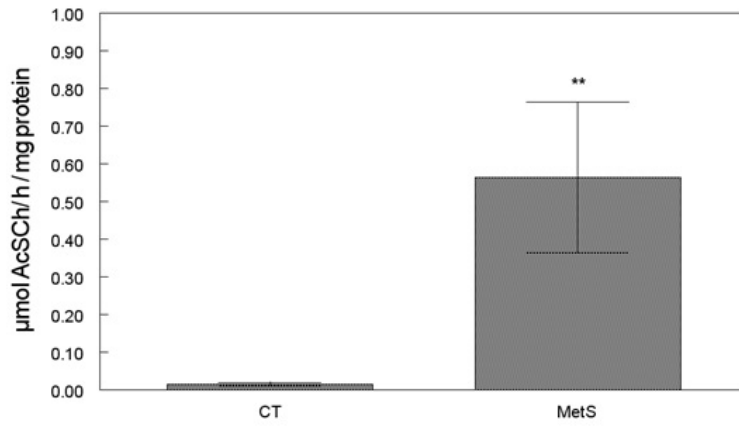
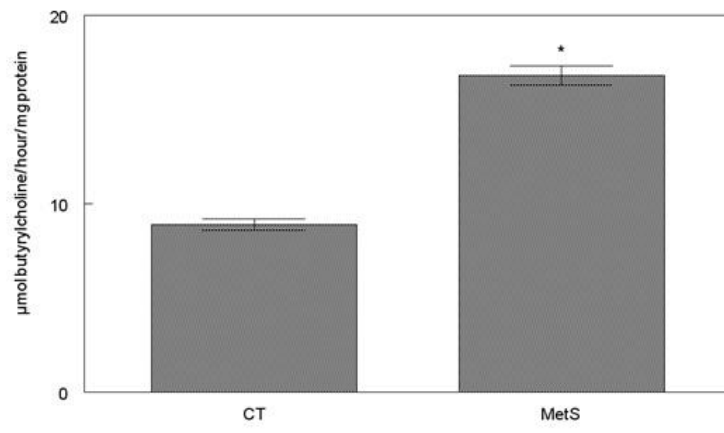


Fig. 5



CONCLUSÕES

- O decréscimo na atividade das enzimas NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com SMet demonstra importante participação do sistema purinérgico na imunomodulação e indica um possível efeito desse sistema no favorecimento do estado pró-inflamatório na SMet, uma vez que maiores quantidades de ATP extracelular podem estar disponíveis para estimular a inflamação.
- O aumento da atividade das enzimas E-NPP e ADA em soro podem refletir uma diminuição nos níveis de adenosina extracelular com consequente perda do seu efeito anti-inflamatório e potencialização do estado pró-inflamatório pelo sistema purinérgico na SMet.
- Da mesma forma que o sistema purinérgico, o sistema colinérgico demonstrou importante papel na imunomodulação pelo aumento na atividade das enzimas AChE e BuChE. Essa ativação enzimática pode indicar uma inibição da via colinérgica anti-inflamatória por diminuir a disponibilidade de ACh, propiciando o processo inflamatório.
- O aumento nos níveis sorológicos de PCR e ácido úrico confirmou a presença de um estado inflamatório conforme indicado pela análise dos sistemas purinérgico e colinérgico.
- A maior atividade da enzima MPO plasmática corroborou com os demais dados do estudo, indicando a existência de um processo inflamatório e consequente risco de evento cardiovascular nos pacientes com SMet.

REFERÊNCIAS

AFSANA, F. et al. Characteristics of different parameters of metabolic syndrome in subjects undergoing coronary angiogram and their association with peripheral vascular disease. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 4, p. 220-225, 2010.

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.11, p.327-332, 2000.

ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. **The Lancet**, v. 366, p. 1059–1062, 2005.

ALMEIDA, J. P. L.; SALDANHA, C. Nonneuronal cholinergic system in human erythrocytes: Biological role and clinical relevance. **Journal Membrane Biology**, v. 234, p. 227-234, 2010.

AZIZI, F. et al. Prevalence of metabolic syndrome in an urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 61, p. 29-37, 2003.

BAGATINI, M.D. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 159–164, 2011.

BAHIA, L. et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, Abril de 2006.

BALDUS, S. et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 108, p. 1440-1445, 2003.

BEHRENDT, D.; GANZ, P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. **American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 10, p. 40-48, 2002.

BIASUCCI, L.M. et al. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarctio, but its reduction is not related to ischemia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 27, p. 611-616, 1996.

BLAKE, G.J.; RIDKER, P.M. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, p. 37-42, 2003.

BLUM, K.S.; PABST, R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood – Do they mirror the situation in all organs? **Immunology Letters**, v. 108, p. 45-51, 2007.

BOURS, M. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology Therapy**, v. 112, p. 358–404, 2006.

BRUNZELL, J.D.; HOKANSON, J.E. Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance. **Diabetes Care**, v.22, p. 10-13, 1999.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 2, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling – an overview. **Novartis Foundation Symposium**, v. 276, p. 26-48, 2006.

CAMERON, A. J. et al. Central obesity as a precursor to the metabolic syndrome in the AusDiab Study and Mauritius. **Obesity**, Silver Spring, v. 16, n. 12, p. 2707–2716, 2008.

CAMPFIELD, L.A. et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, v. 269, p. 546-549, 1995.

CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 113, p. 1141-1147, 2006.

COKUGRAS, A.N.; TECZAN, F. Amitriptyline: a potent inhibitor of butyrylcholinesterase from human serum. **General Pharmacology**, v. 29, p. 835-838, 1997.

COLGAN, S.P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal**, v. 2, p. 351-360, 2006.

COPPACK, S.W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 349-356, 2001.

COUTINHO, T.A. et al. Association of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome and subclinical coronary atherosclerosis. **American Journal of Hypertension**, v. 20, n. 1, p. 83-89, 2007.

CUCUIANU, M. et al. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 59, p. 19-27, 1975.

DWYER, K. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic signaling**, v. 3, p. 171-180, 2007.

ELSSNER, A. et al. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4987-4994, 2004.

ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v. 5, p. 1010-1017, 1999.

EYRE, L.; GAMLIN, F. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 11, n. 6, p. 244-246, 2010.

FISCHER D, et al. A role for adenosine deaminase in monocyte maturation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 58, p. 399-407, 1976.

FLORIDA. Department of Health. 2008 Florida Behavioral Risk Factor Surveillance System (BRFSS) Data Report. Division of Disease Control. Florida: Department of Health. Bureau of Epidemiology. **Chronic Disease Epidemiology Section**, 2008.

FORD, E.S.; GILES, W.H.; DIETZ, W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **The Journal of the American Medical Association**, v. 287, p. 356-359, 2002.

FRANKS, P.W.; OLSSON, T. Metabolic syndrome and early death: getting to the heart of the problem. **Hypertension**, v. 49, p. 10-12, 2007.

FUJII, T. et al. Effects of human antithymocyte globulin on acetylcholine synthesis, its release and choline acetyltransferase transcription in a human leukemic T-cell line. **Journal of Neuroimmunology**, v. 128, p. 1–8, 2002.

GALE, E. The myth of the metabolic syndrome. **Diabetologia**, v. 48, p. 1679-1683, 2005.

GESSI, K.; VARANI, S.; MERIGHI, S. Adenosine and lymphocyte regulation, **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 109-116, 2007.

GOLDSBY, R.A. et al. **Immunology**, W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2003, ed. 5, p. 276-298.

GRUNDY, S.M. et al. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute / American Diabetes Association Conference on Scientific Issues Related to Management. **Circulation**, v. 109, p.551-556, 2004.

GUERRA, A. N. et al. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signalling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 4, p. 256-263, 2003.

GUIZE, L. et al. All-cause mortality associated with specific combinations of the metabolic syndrome according to recent definitions. **Diabetes Care**, v. 30, p. 2381-2387, 2007.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M. Biosynthesis, processing and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 214-224, 2006.

HAREL, C. et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 9031-9035, 1993.

HASKÓ, G. et al. A2B adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 6, p. 263-270, 2009.

HONG, S.C. et al. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal woman. **Menopause**, v. 14, n. 5, p. 835-840, 2007.

HOVI, T. et al. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 23, p. 395-403, 1976.

IDF - The International Diabetes Federation. **Consensus worldwide definition of metabolic syndrome**. Belgium, 2006.

ISRAILI, Z.H. et al. Metabolic syndrome: treatment of hypertensive patients. **American Journal of Therapeutics**, v.14, n.4, p.386-402, 2007.

JANSSEN, I. et al. Menopause and the metabolic syndrome: the Study of Women's Health Across the Nation. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 14, p. 1568-1575, 2008.

JOHNSON, R.J. et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1183-1190, 2003.

JOHNSON, R.J. Role of uric acid in hypertension, renal disease and metabolic syndrome. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 72, n. 12, p. 1059-1063, 2006.

KAHN, R. The metabolic syndrome (emperor) wears no clothes. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1693-1696, 2006.

KANELIS, J. et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1287-1293, 2003.

KANNEL, W.; LARSON, M. Long-term epidemiologic prediction of coronary disease. The Framingham experience. **Cardiology**, v. 83, p. 137-152, 1993.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Sciences**, v. 72, p. 2101-2110, 2003.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

KUTTY, K.M.; PAYNE R, H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 8, p. 247-250, 1994.

LA SALA, A. et al. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 3, p. 339-343, 2003.

LANGSTON, H. et al. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LEAL, D. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, p. 129-134, 2005.

LEE, E.C. et al. Antiandrogen-induced cell death in LNCaP human prostate cancer cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, p. 761-771, 2003.

LEITE, L.D.; ROCHA, E.D.M.; BRANDÃO-NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul./dez. 2009.

LIM, S. et al. C-reactive protein level as an independent risk factor of metabolic syndrome in the Korean population CRP as risk factor of metabolic syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 70, p. 126-133, 2005.

LIN, L. Y. et al. Confirming a biological pathway in the metabolic syndrome-insight from the NHANES 1999-2002. **Obesity**, Silver Spring, v. 16, n. 12, p. 2676-2681, 2008.

LOCKRIDGE, O. et al. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 549-557, 1987.

LOCKRIDGE, O. Structure of human serum cholinesterase. **BioEssays**, v. 9, p. 125-128, 1998.

LOLMÈDE K. et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 27, p. 1187-1195, 2003.

LONGO-MBENZA, B. et al. Is uric acid a surrogate and additional component of incident metabolic syndrome, insulin resistance among inactive Central Africans? **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 4, p. 74-81, 2010.

LOPES, H. F. Síndrome Metabólica: uma abordagem multidisciplinar. **Atheneu**, São Paulo, 2007.

LORD, G.M. et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, p. 897-901, 1998.

LUTHJE, J. Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. **Klinische Wochenschrift**, v. 67, p. 317-327, 1989.

LUYER, M.D. et al. Nutritional stimulation of cholecystinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 8, p. 1023-1029, 2005.

MAGARIAN, E.O.; DIETZ A, J. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. **The Journal Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 819-820, 1987.

MALDONADO, P.A. et al. Ectonucleotidepyrophosphorilase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patients with uterine cervix neoplasia. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 400-406, 2008.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGUE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **European Journal of Pharmacology**, v. 390, p. 173-180, 2000.

MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, p. 2497-2509, 2003.

MARTI, A.; MARCOS, A.; MARTINEZ, J. Obesity and immune function relationships. **Obesity Reviews**, v. 2, p. 131-140, 2001.

MASLINSKI, W. Cholinergic receptors of lymphocytes. **Brain Behaviour and Immunology**, v. 3, p. 1-14, 1989.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.

MASSOULIÉ, J. The original of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. **Neurosignals**, v. 11, p. 130-143, 2002.

MAYORGA, M.P. El adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. **Revista de La Facultad de Medicina**, v. 15, n. 2, p. 225-242, 2007.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

MOURA, E.C. et al. Vigilância de Fatores de Risco para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal (2006). **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, p. 20-37, 2008.

NEBECK, K. et al. Hematological parameters and metabolic syndrome: Findings from an occupational cohort in Ethiopia. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2012.05.009>, 2012.

NEELS, J.G.; OLEFSKY, J.M. Inflamed fat: what starts the fire? **Journal Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 33-35, 2006.

NICHOLLS, S.J.; HAZEN, S.L. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary artery disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 21-22, 2004.

NIH – National Institutes of Health. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **The Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 2486-2497, 2001.

ODASHIMA, M. et al. Selective adenosine A receptor agonist, ATL-146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 2, p. 275-280, 2005.

OKADA, S. et al. Reversal Rate of Clustering of Cardiovascular Disease Risk Factors of Metabolic Syndrome in the General Population: The Niigata Preventive Medicine Study. Hindawi Publishing Corporation. **Journal of Obesity**, v. 2010, n. 1, p. 1-5, 2010.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Obesidade: prevenção e gestão de uma epidemia global**. Genebra, 1998, p.98.

OUCHI, N. et al. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, p. 561-566, 2003.

PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J.; Controlling inflammation: the cholinergic antiinflammatory pathway. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, p. 1037-1040, 2006.

PEPYS, M.B.; ROWE, I.F.; BALTZ, M.L. C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. **International Review of Experimental Pathology**, v. 27, p. 83-111, 1985.

PIMENTA, A.M. **Fatores associados à síndrome metabólica em área rural de Minas Gerais**. 2008. f 79. Tese (Doutorado em Prevenção e Controle de Agravos a Saúde) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem, Belo Horizonte, 2008.

PIÑÓN, P.; KASKI, J.C. Inflammation, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease Risk: PAPP-A, Lp-PLA2, and Cystatin C. New Insights or Redundant Information? **Revista Espanhola de Cardiologia**, v. 59, n. 3, p. 247-258, 2006.

POULOS, S.P.; HAUSMAN, D.B.; HAUSMAN, G.J. The development and endocrine functions of adipose tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 20-34, 2010.

RAKONCZAY, Z. et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chemical Biological Interactions**, v.157-158, p. 233-238, 2005.

RIDKER, P.M. High-sensitivity C-reactive protein. Potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. **Circulation**, v. 103, p. 1813-1818, 2001.

RINNER, I.; KAWASHIMA, K.; SCHAUENSTEIN, K. Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 81, p. 31–37, 1998.

ROBBINS & COTRAN. **Pathologic Basis of Disease** - Kumar, Abbas and Fausto. International Edition, 2009, ed 7.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**, Mosby, London, 2001, ed. 6, p. 480.

RONTI, T.; LUPATTELLI, G.; MANNARIANO, E. The endocrine function of adipose tissue: an up date. **Clinical Endocrinology**, v. 64, p. 355-365, 2006.

ROSS, R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RÜCKER, B. J. et al. E-NTPDase and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings. **Life Sciences**, v. 27, p. 477-486, 2008.

RUSTEMEIJER, C. et al. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in type II diabetes mellitus? **Clinical Science**, v. 101, p. 29-35, 2001.

SADIKOT, S.; HERMANS, M. Here we go again . . . The metabolic syndrome revisited! **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 4, p. 111-120, 2010.

SCHETINGER, M. R. C. et al. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. **Comparative Biochemistry and Physiology B- Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, p. 731-741, 2001.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Science**, v. 14, p. 345-350, 2009.

SCHNABEL, R. et al. Analysis of N-terminal-pro-brain natriuretic peptide and C-reactive protein for risk stratification in stable and unstable coronary artery disease: Results from the atherogene study. **European Heart Journal**, v. 26, p. 241-249, 2005.

SETHI, J.K.; HOTAMISLIGIL, G.S. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 10, p. 19-29, 1999.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1998. p. 1314.

SILVER, A. The biology of cholinesterases. **Elsevier**, 1974, Amsterdam.

SIMÃO, A.N.C. et al. Influence of uric acid and gama-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 24, p. 675–681, 2008.

SIRDAH, M.M. et al. Prevalence of metabolic syndrome and associated socioeconomic and demographic factors among Palestinian adults (20–65 years) at the Gaza Strip. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 5, p. 93-97, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Síndrome Metabólica**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/sindrome-metabolica>>. Acesso em: 27 jul. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. I-Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Hipertensão**, v.7, n.4, p.123-159, 2004.

SONNENBERG, G.; KRAKOWE, G.; KISSEBAH, A. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. **Obesity Research**, v.12, n.2, p. 180-186, 2004.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SPYCHALA, J. Tumor promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, p. 161-173, 2000.

SRIDHAR, G.R. et al. Butyrylcholinesterase in metabolic syndrome. **Medical Hypotheses**, v. 75, p. 648-651, 2010.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity and diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 542-550, 2005

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol. Modifications of lowdensity lipoprotein that increase its atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 915-924, 1989.

STERN, M.P. et al. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? **Diabetes Care**, v. 27, p. 2676-2681, 2004.

TAKEICHI, N. Age-related immunological disorders in an animal model for hypertension, SHR rats. Progress in Hypertension: New Advances in SHR Research. **Pathology and Pharmacology**, v. 3, p. 33-43, 1995.

TAYEBATI, S.K. et al. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 132, p. 147-155, 2002.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. In: SIEGEL, G. J. et al. **Lippincott-Raven Publishers**. Philadelphia, USA. 1999. p. 214-242.

TOSS, H. et al. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. **Circulation**, v. 96, p. 4204-4210, 1997.

TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

UNDURTI, N.D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 12, p. 214-221, 2007.

UNDURTI, N.D. Vagus nerve stimulation as a strategy to prevent and manage metabolic syndrome. **Medical Hypotheses**, v. 76, p. 429-433, 2011.

VEKIC, J. et al. High serum uric acid and low-grade inflammation are associated with smaller LDL and HDL particles. **Atherosclerosis**, v. 203, p. 236-242, 2009.

VENTURA, M. A.; THOMOPOULOS, P. ADP and ATP activate distinct signalling pathways in human promonocytic U-937 cells differentiated with 1,25-dihydroxy-vitamin D3. **Molecular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 104-114, 1995.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidates a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

VINICOR, F.; BOWMAN, B. The metabolic syndrome: the emperor needs some consistent clothes: response to Davidson and Alexander. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1243, 2004.

VITA, J.A.; KEANEY, JR. J.F. Endothelial function: A barometer for cardiovascular risk? **Circulation.**, v. 106, n. 6, p. 640-642, 2002.

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal Clinical Investigation**, v.112, p.1785-1788, 2003.

WOOD, I.S. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 370-377, 2009.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside – converting ectoenzymes: important modulations of purinergic signaling cascade. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1783, p. 973-694, 2008.

YLA-HERTTUALA, S. et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **The Journal Clinical Investigation**, v. 84, p. 1086-1095, 1989.

YUDIKIN, J.S. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 27, p. 25-28, 2003.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 161-178, 2008.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537-566, 2007.



ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in haemostasis and thrombosis. **Nature Medicine**, v. 5, p. 987-988, 1999.

ZIMMERMANN, H. Signalling via ATP in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 10, p. 420-426, 1994.

ZIMMET, P.; ALBERTI, G. The metabolic syndrome: perhaps an etiologic mystery but far from myth—where does the International Diabetes Federation stand? **Medscape Diabetes & Endocrinology**, v. 7, n. 2, p. 1371-1376, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM

	<p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
---	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Estudo do Perfil Oxidativo e de Marcadores Inflamatórios em Pacientes com Síndrome Metabólica

Número do processo: 23081.007831/2010-35

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0098.0.243.000-10

Pesquisador Responsável: Vera Maria Melchior Morsch

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/2011 Relatório parcial

Janeiro/2012 Relatório parcial

Janeiro/2013 Relatório parcial

Janeiro/2014 Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 08/06/2010

Santa Maria, 10 de Junho de 2010.



Félix A. Antunes Soares
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado: **Estudo do perfil oxidativo e de marcadores inflamatórios em pacientes com síndrome metabólica (SMet)**, através da acadêmica Caroline Curry Martins, orientada pela Dra. Vera Maria Morsch, que tem como objetivo avaliar a atividade de componentes sangüíneos, que se alteram durante a SM, a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na SMet. Justifica-se este estudo tendo em vista que pacientes com SMet apresentam maiores chances de desenvolver doenças cardiovasculares, coronarianas e cerebrovasculares. Os benefícios do estudo para os participantes é a possibilidade de verificar fatores predisponentes e envolvidos na SM sendo esses informados e esclarecidos de atitudes preventivas que poderão tomar.

Os voluntários participantes da pesquisa permitirão uma coleta de sangue através de punção venosa em um tubo com anticoagulante e um tubo de soro. Todo o material utilizado para a coleta será descartável e/ou desinfetado. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos pacientes. Em caso de acidente de coleta, os pacientes poderão desenvolver flebite, hematoma local ou petéquias, neste caso serão atendidos e receberão os cuidados adequados. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos.

Fica garantido que as amostras coletadas ficarão sob responsabilidade do pesquisador durante o período do projeto (6 meses) no laboratório de Enzimologia, sala 2208, prédio 18, Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria e que as mesmas serão utilizadas apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato. Após serão descartadas de acordo com as normas de segurança do Hospital Universitário de Santa Maria.

A participação neste estudo é livre e voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. A recusa

na participação não leva a nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados de saúde aos pacientes.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos relacionados com a pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____ estou de acordo em participar nesta pesquisa, assinando este consentimento.

Santa Maria, ____ de _____ 201__.

Assinatura

Caroline Curry Martins/ Pesquisadora/ (55)99045111

Vera Maria Morsch/ Orientadora/ (55)91422611

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria

Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702

Cidade Universitária - Bairro Camobi

97105-900 - Santa Maria - RS

APÊNDICE B – Questionário para anamnese.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA NÚCLEO DE ESTUDOS EM EXERCÍCIO FÍSICO E SAÚDE



ANAMNESE

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ SEXO: () Masculino () Feminino

IDADE: _____ TELEFONE: _____

ENDEREÇO: _____

HISTÓRIA DE PATOLOGIAS: _____

SINTOMAS DIFERENTES: _____

HISTÓRIA DE CIRURGIAS: _____

PATOLOGIAS NOS FAMILIARES PRÓXIMOS: _____

PROBLEMAS ORTOPÉDICOS: _____

MEDICAMENTOS EM USO: _____

FUMA: () SIM () NÃO QUANTOS CIGARROS POR DIA: _____

POSSUI CONVÊNIO MÉDICO: () Sim () Não Qual: _____

PRÁTICA ATIVIDADE FÍSICA: () Sim () Não Qual: _____

PRATICAVA NA ADOLESCÊNCIA: () Sim () Não Qual: _____

	<i>Avaliação Inicial</i>	<i>Avaliação Final</i>
DATA		
Antropometria		
Peso (Kg)		
Altura		
Circunferência Abdominal		
IMC		
Pressão Arterial		
Exames Laboratoriais		
Glicemia de Jejum		
Triglicerídeos		
HDL_c		
LDL_c		
<i>Colesterol Total</i>		