

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE DA HIDRÓLISE EXTRACELULAR DOS NUCLEOTÍDEOS DA  
ADENINA EM SORO DE INDIVÍDUOS ADULTOS SEDENTÁRIOS DO SEXO  
MASCULINO SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO**

CESAR EDUARDO JACINTHO MORITZ

PORTO ALEGRE

2015

## CIP - Catalogação na Publicação

Moritz, Cesar Eduardo Jacintho

Análise da Hidrólise Extracelular dos Nucleotídeos da Adenina em Soro de Indivíduos Adultos Sedentários Submetidos ao Exercício Físico Agudo / Cesar Eduardo Jacintho Moritz. -- 2015.

76 f.

Orientadora: Ana Maria Oliveira Battasini.

Coorientador: Emerson André Casali.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Nucleotidases. 2. Sinalização Purinérgica. 3. Exercício Físico. 4. Sedentarismo. I. Battasini, Ana Maria Oliveira, orient. II. Casali, Emerson André, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE DA HIDRÓLISE EXTRACELULAR DOS NUCLEOTÍDEOS DA  
ADENINA EM SORO DE INDIVÍDUOS ADULTOS SEDENTÁRIOS DO SEXO  
MASCULINO SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO**

CESAR EDUARDO JACINTHO MORITZ

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Oliveira  
Battastini

Coorientador: Prof. Dr. Emerson André  
Casali

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em  
Medicina: Ciências Médicas, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas.

PORTO ALEGRE

2015

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

(Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas – UFRGS)

Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica – UFRGS)

Dr. Jerri Luis Ribeiro

(Programa de Pós-Graduação em Biociências e Reabilitação – Centro Universitário Metodista  
IPA)

“It matters not how strait the gate,  
How charged with punishments the scroll,  
I am the master of my fate:  
I am the captain of my soul.”

Invictus  
*William Ernest Henley*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à minha mãe, Marlisa, que com muito esforço criou um filho sozinha, fazendo de tudo para manter nossa pequena “grande” família unida. Mulher batalhadora, determinada e amorosa, que me serve de exemplo em todas as situações, lutando incessantemente para contribuir com meu sucesso. Sem você na minha vida, nada disso seria possível.

Minha tia/madrinha Rosane, que desde minha graduação me auxiliou em todo tipo de suporte para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigado pelo amor e companheirismo, parte desse objetivo alcançado só foi possível pela tua presença em minha vida.

Meu primo, Luís Henrique pela parceria e amizade em todos os momentos. És um irmão para mim.

Aos meus amigos que a vida me presenteou, apesar da minha ausência nos últimos tempos, vocês moram no meu coração.

À minha orientadora Ana Battastini, não tenho palavras para agradecer esses dois anos de trabalho, por me receber de maneira tão acolhedora no teu laboratório mesmo sem me conhecer. Tua forma de trabalhar me encanta, é um exemplo de caráter e profissionalismo. Muito obrigado por todos os ensinamentos e pela contribuição na minha jornada acadêmica.

Ao meu segundo orientador (talvez seja injusto chamar de coorientador), Emerson Casali pelos sete anos de trabalho e amizade. Evidentemente, esse trabalho não seria possível sem a tua presença. Muito obrigado por me apresentar ao mundo científico, e tu foi determinante para minha formação profissional. Mais do que um professor, és um grande amigo!

Ao Laboratório 22, Ana, Angélica, Carol, Dani, Elisa, Fabrícia, Fabrício, Júlia, Letícia, Lila e Pati, muito obrigado pela presença de vocês na minha vida nesses últimos dois anos. Tenho certeza que fui presenteado ao entrar no laboratório e ter o privilégio de conhecer vocês. Obrigado pela amizade e companheirismo!

Ao professor Alvaro por ter acreditado neste trabalho, aceitando a colaboração para sua realização, abrindo as portas do LAPEX para as coletas.

Ao Bruno, muito obrigado por toda parceria durante as coletas e abraçando o trabalho como se fosse seu, mostrando muito profissionalismo e dedicação para sua finalização.

Ao Departamento Bioquímica, que mesmo não sendo aluno do seu programa de pós-graduação, me recebeu de braços abertos.

Ao CNPq e a CAPES por disponibilizar recursos financeiros para concretizar este trabalho de mestrado.

## RESUMO

### Base Teórica

O sistema purinérgico é um sistema de sinalização extracelular que influencia processos fisiológicos e patológicos. O exercício físico promove adaptações moleculares e teciduais sendo sugerido como uma conduta terapêutica em algumas patologias crônicas. Dados apontam uma possível influência do exercício físico sobre o sistema purinérgico, no entanto as bases bioquímicas desse processo ainda não estão muito bem compreendida.

### Objetivos

Analisar a hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina e quantificar os níveis dos nucleotídeos, nucleosídeos e resíduos metabólicos no soro sanguíneo de indivíduos adultos sedentários do sexo masculino submetidos a uma sessão aguda de exercício aeróbico moderado.

### Métodos

Indivíduos adultos sedentários do sexo masculino, sem patologia prévia, foram selecionados de acordo com critérios clínicos pré-definidos. Os sujeitos foram avaliados, responderam ao questionário PAR-Q (*Instrumental Physical Activity Questionnaire*) e submetidos a um teste do consumo máximo de oxigênio. Sete dias após a avaliação, os indivíduos realizaram 30 minutos de exercício aeróbico moderado. Amostras de sangue foram coletadas pré e pós-exercício. Ao fim da coleta, o soro sanguíneo foi separado e a atividade enzimática foi avaliada pela liberação de fosfato inorgânico (Pi). Os nucleotídeos da adenina, nucleosídeo e resíduos metabólicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os níveis de creatina quinase (CK), creatinina (CR), colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína baixa densidade (LDL) foram avaliados por meio de kits específicos conforme instruções do fabricante.



## **Resultados**

A hidrólise da adenosina 5'-trifosfato (ATP), adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-monofosfato (AMP) e *p*-nitrofenil 5'-timinidina monofosfato (*p*-Nph-5'-TMP) se mostrou aumentada após a realização do exercício aeróbico agudo. O nível de ATP extracelular diminuiu após a realização da sessão de exercício. As concentrações de adenosina (ADO), inosina (INO) e ácido úrico apresentaram-se aumentadas.

## **Conclusão**

Nossos resultados demonstram uma modificação no perfil da atividade ectonucleotidásica e nos níveis dos nucleotídeos da adenina, nucleosídeos e metabólitos do ATP após a realização do exercício aeróbico agudo em intensidade moderado no soro sanguíneo de indivíduos sedentários, sugerindo uma possível atuação do exercício físico como modulador da sinalização purinérgica. Mais estudos são necessários para melhor compreensão das ações do exercício físico na sinalização purinérgica, e de como ocorre esta interação.

**Palavras chave:** Nucleotidases; sinalização purinérgica; exercício físico; sedentarismo.

## ABSTRACT

### Background

The purinergic system is an extracellular signaling system, which affect physiological and pathological processes. Physical exercise promotes molecular and tissue adaptations, being suggested as therapeutic approach in some chronic diseases. Data indicate a possible influence of exercise on purinergic system, however the biochemical basis are not well understood.

### Objectives

Analyze extracellular hydrolysis of adenine nucleotides and quantify nucleotides, nucleosides and metabolic residues levels in blood serum of male sedentary individuals submitted an acute session of moderate aerobic exercise.

### Methods

Male sedentary adults, without previous disease, were selected according predefined clinical criteria. Subjects were evaluated, answered to PAR-Q questionnaire (*Instrumental Physical Activity Questionnaire*) and performed maximum intake oxygen test. Seven days after evaluation, individuals conducted 30 minutes of aerobic moderate exercise. Blood samples was collected pre and post exercise. At the end of collection, blood serum separated and enzymatic activity measured by inorganic phosphate (Pi) release. Adenine nucleotides, nucleoside and metabolics residue were quantified using high performance liquid chromatography (HPLC). Creatine kinase (CK), creatinine (CR), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein (LDL) levels were evaluated by particular kit according manufacturer's instructions.

### Results

Adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-monophosphate (AMP) and *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP)

hydrolysis increased after acute session of aerobic exercise. ATP extracellular levels decreased after acute exercise. ADO, inosine (INO) and uric acid concentrations increased.

## **Conclusion**

Our results demonstrate modifications in ectonucleotidasic activity profile and levels of adenine nucleotides, nucleoside and ATP metabolites after performing acute aerobic exercise of moderate intensity in blood serum of sedentary male individuals, suggesting a possibly modulation of purinergic signaling from exercise. Additional studies are necessary for better understanding physical exercise actions in purinergic signaling, and how these interactions occur.

**Keywords:** Nucleotidases; purinergic signaling; exercise; sedentary.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

**Figura 1:** Organograma com a estratégia de busca de referências bibliográficas que fundamentaram o estudo..... 18

**Figura 2:** Hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina feita por ectonucleotidases... 24

**Figura 3:** Receptores purinérgicos e suas respectivas subdivisões. .... 26

**Figura 4:** Efeito do exercício físico nas vias sinalização intracelular para translocação do GLUT 4. .... 27

**Figura 5:** Organograma ilustrando o marco teórico da dissertação..... 32

### Artigo

**Figure 1:** (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP and (d) *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis in blood serum of sedentary male individuals pre and post an acute protocol of aerobic exercise. Data are presented in mean  $\pm$  S.E.M. \*Indicate difference from pre-exercise ( $p < 0.05$ ). .... 61

**Figure 2:** Blood serum levels of (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP, (d) adenosine (ADO), (e) inosine (INO), (f) xanthine (XANT), (g) hypoxanthine (HYPO) and (h) uric acid (UA) from blood serum of sedentary male individuals comparing pre and post-exercise. Data are presented in in mean  $\pm$  S.E.M. \*Indicate difference from pre-exercise ( $p < 0.05$ ). .... 62

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

**Table 1:** Baseline characteristics of sedentary subjects participants. .... 60

**Table 2:** Blood serum biochemistry pre and post-exercise..... 60

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PAR-Q – Instrumental Physical Activity Questionaire  
Pi – Fosfato Inorgânico  
HPLC – Cromatografia líquida de alta performance  
CK – Creatina quinase  
CR – Creatinina  
CT – Colesterol total  
TG – Triglicerídeos  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
ATP – Adenosina 5'-trifosfato  
ADP – Adenosina 5'-difosfato  
AMP – Adenosina 5'-monofosfato  
*p*-Nph-5'-TMP – *p*-nitrofenil 5'-timinidina monofosfato  
ADO – Adenosina  
INO – Inosina  
WHO – World Health Organization  
NANC – Não adrenérgico não colinérgico  
GTP – Guanosina 5'-trifosfato  
Ca<sup>2+</sup> – Cálcio  
ADA – Adenosina deaminase  
E-NTPDase – Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase  
E-NPP – Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase  
PPi – Pirofosfato inorgânico  
GPI – Glicosilfosfatidlinositol  
PNP – Purina nucleosídeo fosforilase  
AMPc – AMP cíclico  
SNC – Sistema nervoso central  
Na<sup>+</sup> – Sódio  
K<sup>+</sup> – Potássio  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

NO – Óxido nítrico

PAS – Pressão arterial sistólica

PAD – Pressão arterial diastólica

IL-10 – Interleucina 10

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

SNS – Sistema nervoso simpático

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2. <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações .....	19
2.2 Sistema Purinérgico.....	21
2.2.1 Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDases) .....	22
2.2.2 Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (E-NPP).....	23
2.2.3 Ecto-5'-Nucleotidase .....	24
2.2.4 Receptores Purinérgicos.....	26
2.3 Sedentarismo e Exercício físico .....	28
2.4 Exercício Físico e Sinalização Purinérgica .....	31
3. <b>MARCO TEÓRICO</b> .....	34
4. <b>JUSTIFICATIVA</b> .....	35
5. <b>OBJETIVOS</b> .....	36
5.1 Objetivos Primários.....	36
5.2 Objetivos Secundários .....	36
6. <b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
7. <b>ARTIGO</b> .....	44
8. <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	66
9. <b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	67
10. <b>ANEXOS</b> .....	68
10.1 Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).....	68
10.2 Questionário Sobre Prontidão para Atividade Física (PAR-Q) .....	70
10.3 Ficha de Avaliação Individual .....	71
10.4 Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	73
10.5 STROBE ( <i>Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology</i> ) – <i>checklist</i> para estudos transversais .....	75



## 1 INTRODUÇÃO

A ideia de nucleotídeos tri e difosfatos atuarem exclusivamente como moeda energética no ambiente intracelular tem sido revisada. Em 1929 foi publicado o primeiro trabalho onde foi demonstrada uma possível atuação moduladora do ATP e da adenosina ADO na atividade cardíaca e vascular (1).

Atualmente o conceito de nucleotídeos e nucleosídeos agindo como sinalizadores no meio extracelular e influenciando processos fisiológicos e patológicos é amplamente aceito, definindo um sistema específico de sinalização celular. A sinalização purinérgica, como é usualmente denominada, pode atuar modulando a agregação plaquetária, inflamação, atividade cardíaca, tônus vasomotor, morte celular, proliferação celular, entre outros efeitos já descritos na literatura (2, 3).

O sedentarismo é um grave problema de saúde pública do mundo moderno, influenciando o desenvolvimento de doenças crônicas como hipertensão arterial, diabetes tipo 2, síndrome metabólica, obesidade, cardiopatias, osteoporose, determinados tipos de cânceres e podendo levar a morte prematura (4). Segundo dados da *World Health Organization* (WHO), o número de pessoas sedentárias tem aumentado significativamente em diversos países, sendo o quarto principal fator de risco para taxa de mortalidade global, sendo superado apenas pela obesidade e sobrepeso, hiperglicemia, fumo e hipertensão (5).

A prática de exercício físico é uma alternativa não farmacológica na prevenção e/ou tratamento de patologias crônicas como hipertensão, diabetes, depressão, fibromialgia e doenças cardiovasculares (6, 7). Em indivíduos com idade entre 18 e 64 anos a recomendação é de no mínimo 150 minutos semanais de exercício com intensidade moderada, ou ainda 75 minutos com alta intensidade (5, 8). Os benefícios associados ao treinamento físico são justificados pela ocorrência de adaptações fisiológicas e bioquímicas em nível metabólico, neuromuscular, cardiopulmonar, endotelial e gastrointestinal (9).

O treinamento físico em diferentes intensidades em modelos experimentais já é descrito como um modulador da sinalização purinérgica alterando as concentrações de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, além das atividades enzimáticas envolvidas no controle desse sistema (10, 11, 12).

Considerando a participação do sistema de sinalização purinérgica em diversos processos homeostáticos e fisiopatológicos, e a atuação do exercício físico como precursor de adaptações sistêmicas e celulares, sendo sugerido como conduta terapêutica em diversas doenças, e levando

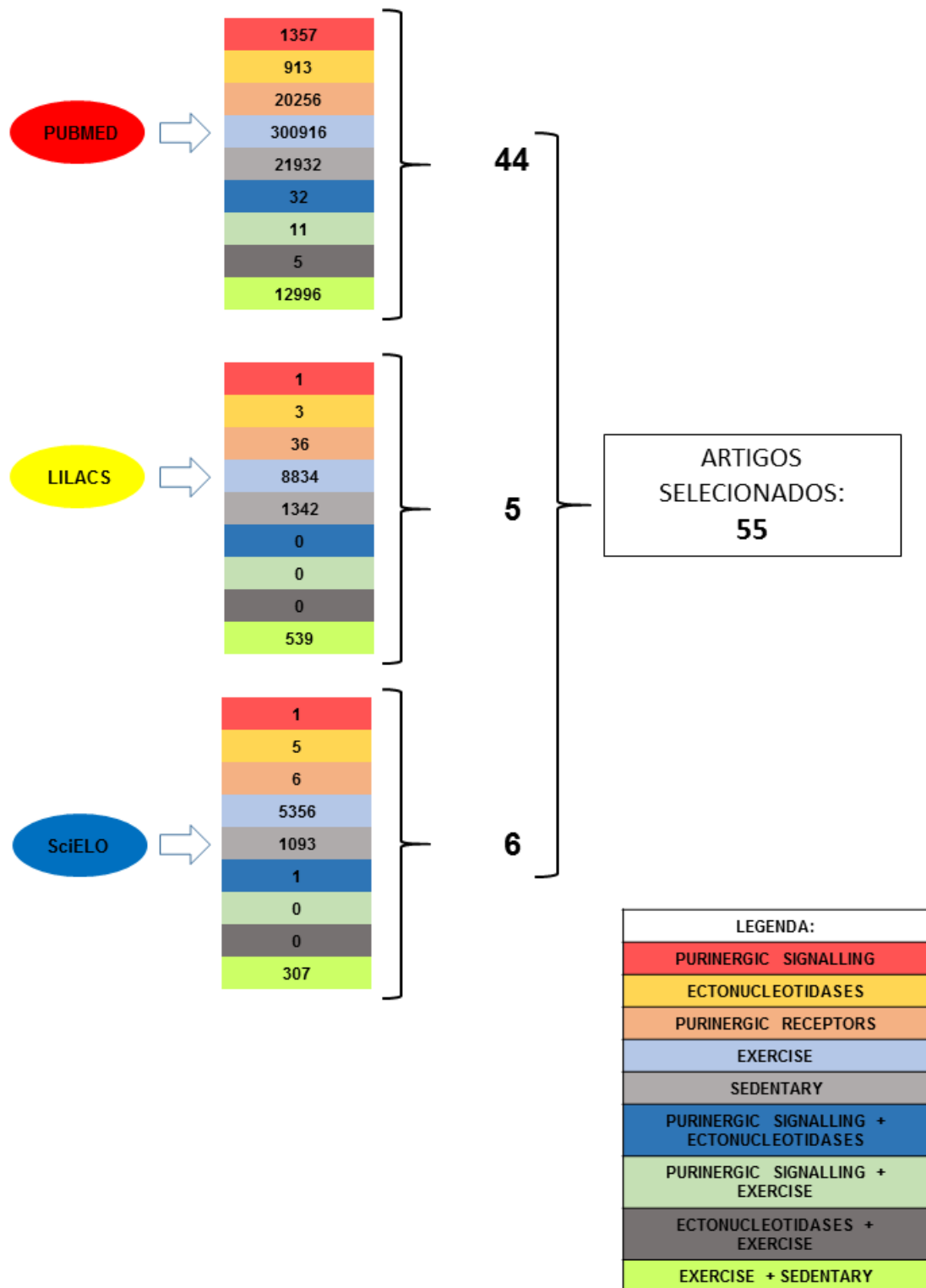
em consideração sua atuação no sistema purinérgico, é importante avaliarmos como o exercício pode regular essa forma de sinalização. É importante ressaltar a escassez de trabalhos sobre a regulação da sinalização purinérgica em função do exercício físico, e sobre a caracterização do seu claro funcionamento em seres humanos. Assim, o presente estudo tem como objetivo elucidar o funcionamento das enzimas que controlam a concentração plasmática dos compostos purinérgicos de indivíduos sedentários, buscando um possível papel modulador do exercício físico na atividade enzimática, admitindo a atuação do exercício físico em diferentes condições patológicas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura busca ressaltar os aspectos relacionados ao funcionamento do sistema purinérgico e seus respectivos componentes, nucleotídeos e nucleosídeos, enzimas e receptores específicos, juntamente com os efeitos do exercício físico e suas aplicações em relação ao sedentarismo.

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, LILACS e SciELO, utilizando artigos sem data de publicação inicial definida até 2015. Foram realizadas buscas através dos termos “*purinergic signaling*”, “*ectonucleotidases*”, “*purinergic receptors*”, “*exercise*”, e “*sedentary*” e suas combinações, conforme apresentado na figura 1. No total foram selecionados 55 artigos para compor a revisão da literatura referente aos temas desta dissertação.



**Figura 1.** Organograma demonstrando a estratégia de busca de referências bibliográficas que fundamentam os objetivos deste estudo.

## 2.2 SISTEMA PURINÉRGICO

Apesar das primeiras evidências da atuação do ATP e ADO como moléculas sinalizadoras no sistema cardiovascular terem surgido em 1929, a hipótese utilizando e referindo-se ao “sistema purinérgico” foi somente proposta em 1972 por Geoffrey Burnstock, onde o ATP foi demonstrado como um neurotransmissor sendo secretado por fibras nervosas não adrenérgicas e não colinérgicas (NANC) (3).

Partindo do conceito de sinalização purinérgica, temos nucleotídeos e nucleosídeos como ATP, ADP, AMP, ADO, guanosina 5'-trifosfato (GTP) e guanosina participando como sinalizadores de eventos fisiológicos e patológicos em diversos tipos celulares e teciduais. Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares exercem seus efeitos por meio de receptores específicos denominados purinoceptores, apresentando duas principais divisões P1 e P2, e a partir destas, outras subdivisões. As ectonucleotidases são uma família de enzimas responsáveis por controlar as concentrações de nucleotídeos como ATP, ADP e AMP extracelularmente, e assim como os receptores purinérgico, apresentam diversas subdivisões e diferentes características funcionais e estruturais (13).

A cascata de sinalização purinérgica tem seu início com a liberação de nucleotídeos para o meio extracelular que pode acontecer de diferentes formas. O ATP é amplamente secretado quando acontece lise celular, sinalizando morte e/ou dano celular, sendo muito importante para o desenvolvimento do processo inflamatório. Células com propriedades excitatórias e/ou secretórias como neurônios, células acinares pancreáticas e plaquetas armazenam ATP e ADP juntamente com outros transmissores e liberam seu conteúdo de forma dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) via exocitose. Estímulos mecânicos, hipóxia, alterações na pressão hidrostática levam a liberação de ATP em células epiteliais, endoteliais, astrócitos, fibroblastos, hepatócitos, cardiomiócitos, eritrócitos, neutrófilos e macrófagos. Resumidamente, os mecanismos sugeridos para a liberação de nucleotídeos são através de canais ionotrópicos voltagem e mecano-dependente, por difusão facilitada e por exocitose do conteúdo armazenado em vesículas e grânulos (14).

Gradualmente tem crescido a importância da função dos hemicanais de conexina e panexina na liberação de ATP para o meio extracelular. A abertura dos hemicanais de conexina é fortemente regulada por diferentes mecanismos incluindo o sítio ativo para ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosforilação intracelular e voltagem-dependência. A abertura do poro de conexina permite não somente a liberação de ATP, mas de outros sinalizadores, como glutamato, regulando a

comunicação intercelular (15). Semelhantemente, os poros formados pelas panexinas permitem a saída de outros transmissores, incluindo ATP. As panexinas formam grandes canais acoplados à membrana plasmática, e sua abertura é regulada pelos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo a despolarização da membrana plasmática (15, 16).

A ADO no meio extracelular pode ser proveniente de uma liberação endógena direta de determinado tipo celular, ou ainda devido a uma hidrólise sequencial de ATP, ADP ou AMP. Apesar das possibilidades, podemos considerar que a principal fonte de ADO no meio extracelular, é a hidrólise do ATP por ectonucleotidases, que a seguir serão detalhadamente abordadas. A desfosforilação do AMP é considerada um fator limitante para a formação da ADO a qual tem seus níveis extracelulares regulados pela sua captação ou ainda pela sua subsequente deaminação através da enzima adenosina deaminase (ADA) (14, 17).

O sistema purinérgico, incluindo nucleotídeos, nucleosídeos, enzimas e receptores, apresenta uma ampla distribuição celular e tecidual, influenciando a regulação de inúmeros processos biológicos e a fisiopatologia de doenças. O ATP é descrito agindo nos processos inflamatórios, liberando histamina, citocinas e podendo induzir a apoptose. No sistema nervoso ele participa de processos de neurotransmissão e mielinização, já no coração e vasos sanguíneos, o ATP pode levar a vasoconstrição e aumento da frequência cardíaca (13, 18). A molécula de ADP é classicamente descrita como uma reguladora da agregação plaquetária, sendo muito importante para a manutenção da hemostase (19).

A ADO e o ATP, em determinadas situações, apresentam funções antagônicas. No entanto, deve-se levar em consideração que o ATP possui um papel dual, em altas concentrações ele é um agente pró-inflamatório, em contrapartida, em baixas concentrações age como imunossupressor. Imunologicamente, a ADO atua como importante imunossupressor (20). Um dos efeitos relevantes da ADO no sistema nervoso é a modulação inibitória, diminuindo, por exemplo, a secreção de neurotransmissores (21). No sistema cardiovascular a ADO é cardioprotetora, podendo induzindo a bradicardia, ativando a angiogênese e a vasodilatação coronariana (17, 22).

### 2.2.1 ECTO-NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASES (E-NTPDases)

As enzimas que compõe o sistema purinérgico, controlando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares são genericamente denominadas como ectonucleotidases (figura 2).

Assim, as ectonucleotidasas podem ser divididas principalmente em ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e ecto-5'-nucleotidase, apresentando respectivas subdivisões. Essas enzimas podem estar localizadas acopladas na membrana plasmática ou solubilizadas no sangue (14).

As NTPDases hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados, como ATP e ADP, formando AMP (ou outros nucleotídeos monofosfatados) como produto final. Sua atividade catalítica é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) com melhor atividade em um pH variando entre 7 e 8 (14,23). Atualmente estão identificadas 8 diferentes NTPDases, NTPDases 1-8, cada uma apresentando diferentes propriedades e distribuição tecidual. NTPDases 1, 2, 3 e 8 são encontradas usualmente ancoradas à membrana plasmática, enquanto as NTPDases 5 e 6 possuem uma localização intracelular podendo ser, secretadas em sua forma solúvel, por fim as NTPDases 4 e 7 ficam localizadas intracelularmente, associadas à membranas de organelas citoplasmáticas (21, 24).

As NTPDases têm ampla distribuição tecidual e celular, sendo consideradas extremamente eficazes no controle da biodisponibilidade extracelular de ATP e ADP, hidrolisando em diferentes proporções nucleotídeos tri e difosfatados. A NTPDase 1 (ou CD39) foi primeiramente reconhecida como marcadora de ativação de linfócitos B, e entre todas é a mais investigada, hidrolisando ATP e ADP numa proporção 1:1, sendo identificada em linfócitos, plaquetas, endotélio, neurônios, astrócitos, músculo liso, e também na sua forma solúvel (solCD39) ou em microvesículas na corrente sanguínea (23, 24, 25).

A NTPDase 1/D39 possui um papel relevante na hemostase, controlando níveis de ATP e ADP circulante e dessa forma influenciando processos inflamatórios, na formação de trombos e tônus vascular (26). A atividade enzimática e a expressão da NTPDase 1/CD39 é alterada em condições patológicas como cardiopatias, hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia e câncer, sugerindo uma possível participação desse sistema no desenvolvimento fisiopatológico dessas doenças (27, 28, 29).

## 2.2.2 ECTO-NUCLEOTÍDEO PIROFOSFATASES/FOSFODIESTERASES (E-NPPs)

As E-NPPs, outra classe de ectonucleotidasas, possui 7 diferentes formas (E-NPP 1-7), porém somente as formas E-NPP 1, 2 e 3 possuem importância na sinalização purinérgica, apresentando capacidade de hidrolisar nucleotídeos (14). E-NPP 1 e 3 estão ancoradas à

membrana plasmática, podendo ser clivadas e liberadas na sua forma solúvel, enquanto a E-NPP 2 atua periféricamente quando secretada para o meio extracelular, todas elas tendo uma atividade ótima em pH alcalino (30).

Os substratos em que as E-NPPs podem atuar não ficam limitados somente a nucleotídeos, podendo hidrolisar ligações pirofosfato ou fosfodiéster. Considerando sua atividade enzimática mais ampla, as E-NPPs 1-3 podem hidrolisar ATP ou ADP formando AMP e uma molécula de pirofosfato inorgânico (PPi), no caso quando utilizar o ATP como substrato ( $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PPi}$ ). As E-NPPs 1 e 3 hidrolisam mais eficientemente nucleotídeos, enquanto a E-NPP 2 tem preferência como substrato fosfolipídeos (23, 30).

A distribuição tecidual das E-NPP 1 e 3 é bastante diversificada, e podem ser coexpressadas em uma mesma célula, como em hepatócitos e osteoblastos. Já é descrita a presença dessas enzimas em superfícies epiteliais, como pulmonar, hepática, renal e intestinal. Curiosamente, elas foram sugeridas como participantes no processo de produção salivar, conjuntamente com NTPDases e a 5'-nucleotidase (23, 24).

Uma das principais funções da E-NPP 1 é relacionada à mineralização óssea, considerando que PPi em baixas concentrações (0.01 – 0.1 mmol/L) estimula a mineralização óssea e em altas concentrações inibe. Essa enzima é encontrada em osteoblastos e condroblastos, tendo crucial na manutenção da saúde óssea (14).

Interessantemente, a E-NPP 1 pode estar envolvida no processo de desenvolvimento de cardiopatias, hipertensão e resistência insulínica. O polimorfismo K121Q do gene da E-NPP 1 age influenciando negativamente o receptor de insulina, pois se alelo Q121 se liga ao receptor de tirosina quinase resultando em uma menor autofosforilação do receptor, induzindo a resistência da insulina e ao diabetes tipo 2 (31). Em conjunto, esse mesmo polimorfismo, é associado ao aumento da pressão arterial, associada a uma resposta prejudicada das células endoteliais na liberação de óxido nítrico (NO) (32). De uma forma geral, pode-se dizer que o polimorfismo K121Q da E-NPP1 afeta tanto a secreção de insulina e seus efeitos em diferentes tecidos (33).

### 2.2.3 ECTO-5'-NUCLEOTIDASE

A 5'-nucleotidase possui sete subtipos, cinco localizam-se no citosol, uma na matriz mitocondrial, e uma ecto-enzima acoplada na membrana plasmática, denominada ecto-5'-

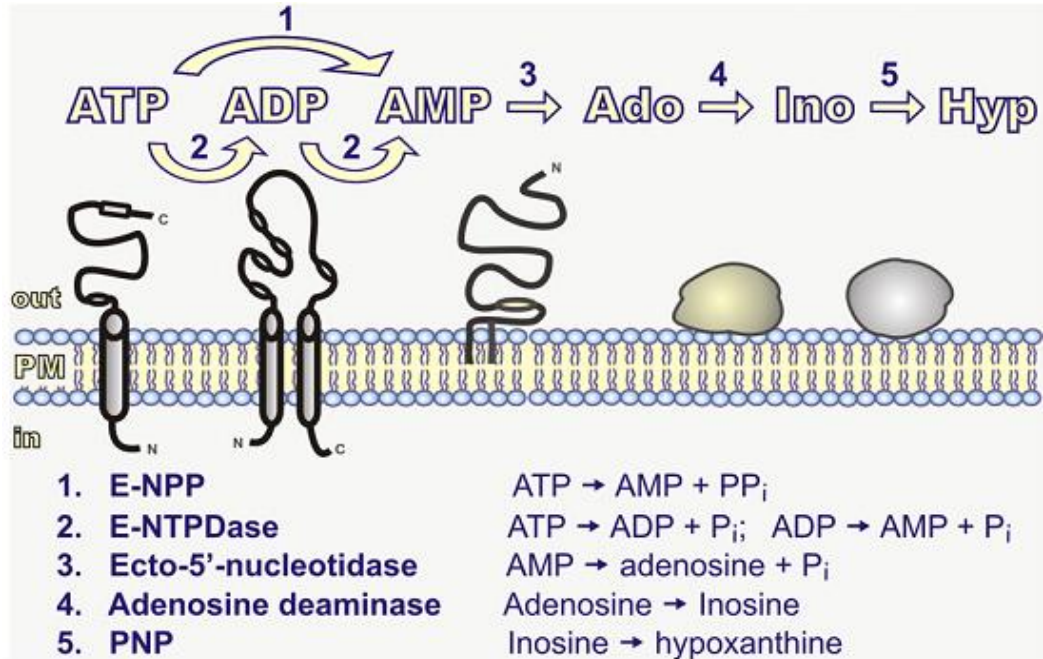


nucleotidase ou CD73. Essa enzima hidrolisa nucleotídeos monofosfatados, incluindo o AMP, que é o mais eficientemente hidrolisado, sendo sua principal função a formação de ADO no meio extracelular (14, 24). A produção de ADO via ecto-5'-nucleotidase/CD73 é inibida por ATP e ADP, que são inibidores competitivos, assim sua produção depende da atividade de outras ecotnucleotidasas acima descritas (30).

Essa enzima também é importante na via de salvação de purinas, uma vez que hidrolisando nucleotídeos monofosfatos até nucleosídeos no meio extracelular, os mesmos podem ser captados pelas células por transportadores específicos, dando continuidade a essa via no interior das células. Como outras ecto-enzimas, possui algumas funções não enzimáticas, como marcadora de ativação de linfócitos T e adesão celular (34).

A ecto-5'-nucleotidase/CD73, quando acoplada à membrana plasmática, pode ter sua porção glicosilfosfatidilinositol (GPI) hidrolisada por uma fosfolipase específica ou ainda por alguma atividade de uma protease, gerando sua forma solúvel que pode ser encontrada no citosol ou no sangue (14, 34). Sua presença já foi identificada em diferentes tecidos: cérebro, nervos periféricos, rins, fígado, pulmão e coração. Células endoteliais, principalmente de vasos com maior calibre como a aorta, carótida e as coronárias apresentam uma alta expressão de CD73, revelando a importância dessa enzima na modulação do tônus vascular uma vez que, a ADO é um potente vasodilatador (14, 24).

Considerando a ADO como sinalizadora de processos fisiológicos e patológicos, atuando por meio de receptores específicos (receptores P1), a 5'-nucleotidase ganha importância notável nessas ações. Transporte iônico em células epiteliais e endoteliais, controle do funcionamento da barreira tecidual, regulando a transmigração celular, controle adaptativo da hipóxia, pré-condicionamento isquêmico, regulação da filtração tuboglomerular nos rins, participação na tromboregulação e inflamação, são apenas algumas das funções relacionadas a ecto-5'-nucleotidase como geradora de ADO (35,36).



**Figura 2.** Degradação extracelular do ATP catalisada por ectonucleotidasas. Esquemáticamente nessa figura, estão incluídas a ADA responsável pela deaminação da adenosina formando inosina, e a purina nucleosídeo fosforilase (PNP), produzindo hipoxantina, ilustrando a cascata metabólica do ATP. *Yegutkin G.G., 2008.*

#### 2.2.4 RECEPTORES PURINÉRGICOS

Os nucleotídeos e nucleosídeos têm seus níveis extracelulares controlados pelas ectonucleotidasas, no entanto exercem seus efeitos por meio de receptores específicos acoplados a membrana plasmática, os purinoceptores ou receptores purinérgicos (figura 3). Esses receptores foram descritos pela primeira vez em 1978 por Burnstock, e foram divididos em duas grandes famílias de receptores P1 e P2 (13).

Os receptores P1 são específicos para ADO, sendo divididos em quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, todos acoplados à proteínas G. Esses receptores diferenciam-se pela afinidade pela ADO e pelo tipo de proteína G a qual está ligado (37).

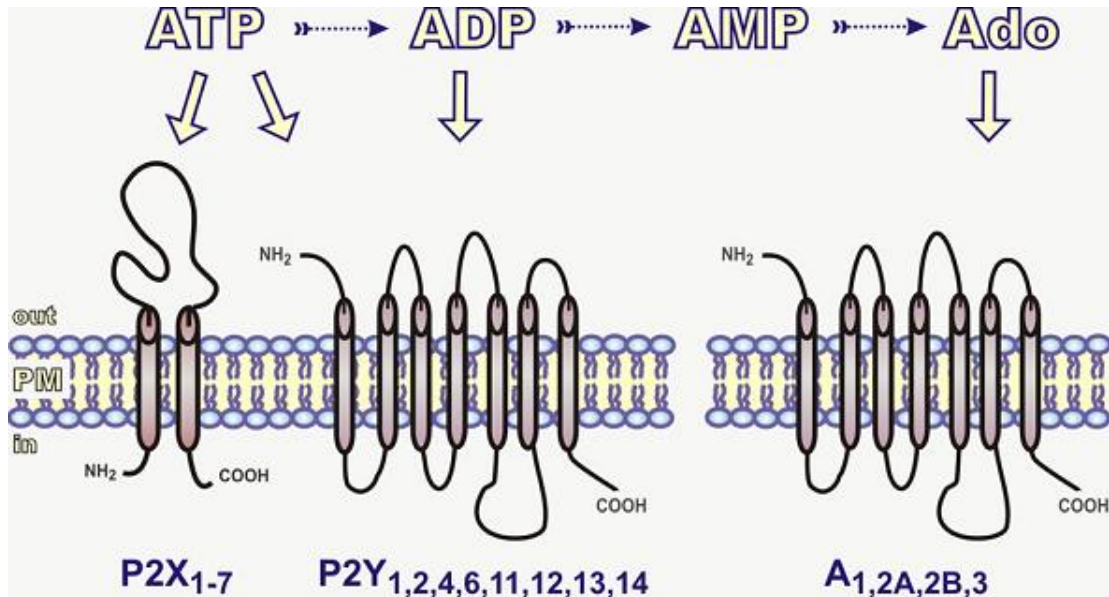
A ADO apresenta alta e baixa afinidade pelos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub>, respectivamente, e inibem a adelinato ciclase causando uma diminuição dos níveis de AMP cíclico (AMPc), ambos receptores também possuem uma via alternativa de sinalização pela fosfolipase C. Da

mesma forma, a ADO apresenta alta afinidade pelos receptores  $A_{2A}$  e baixa afinidade pelos  $A_{2B}$ , e atuam ativando a adenilato ciclase e aumentando o AMPc intracelular (17).

Purinoceptores P2, específicos para ATP e ADP, conforme diferenças estruturais e nos mecanismos de transdução, são subdivididos em duas classes P2X e P2Y. Os P2Y, são receptores metabotrópicos ligados a uma proteína G, enquanto os receptores P2X caracterizam-se como ionotrópicos (38).

Os receptores P2X são receptores de ação rápida e apresentam sete subtipos  $P2X_{1-7}$ , principalmente ativados por ATP. Como dito anteriormente, esses receptores são ionotrópicos, associados a canais com permeabilidade seletiva a íons sódio ( $Na^+$ ), potássio ( $K^+$ ) e  $Ca^{2+}$ . Por apresentarem característica de ação rápida, são altamente expressos em células excitatórias como neurônio, células da glia e músculo liso, ao contrário células não excitáveis caracterizam-se por uma maior expressão de receptores P2Y. O mecanismo de sinalização mais aceito desse receptor é pelo influxo de íons aumentando os níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  levando a uma despolarização da célula (18, 37, 39).

Semelhantemente aos P2X, os purinoceptores P2Y são divididos em  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$ ,  $P2Y_{11}$ ,  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{13}$  e  $P2Y_{14}$ , todos metabotrópicos ligados à proteínas G, relacionados a diferentes efeitos. Além de ATP e ADP, os receptores P2Y podem ser ativados por meio de uridina 5'-trifosfato (UTP) e uridina 5'-difosfato (UDP), apresentando diferentes afinidades. Os ligantes ATP e ADP possuem maior afinidade pelos receptores  $P2Y_1$  e  $P2Y_{13}$ ,  $P2Y_{11}$  é ativado principalmente por ATP,  $P2Y_{12}$  por ADP, o UTP liga-se principalmente ao  $P2Y_4$ , enquanto UDP ao  $P2Y_6$ , por fim o  $P2Y_{14}$  pode ser ativado por UDP-glicose, UDP-galactose, UDP-N-acetilglucosamina e UDP-ácido glicurônico (18)(40). Referente as diferentes ações dos receptores P2Y, eles podem ser divididos em dois grupos:  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$  e  $P2Y_{11}$  que são ligados a uma proteína G estimulatória e ativando a fosfolipase C, enquanto  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{13}$  e  $P2Y_{14}$  ativam uma proteína G inibitória, causando a inibição da adenilato ciclase (37, 40).



**Figura 3.** Vias de sinalização purinérgica através dos purinoceptores P2X, P2Y e A<sub>1, 2A, 2B, 3</sub>. Yegutkin G.G., 2008.

### 2.3 SEDENTARISMO E EXERCÍCIO FÍSICO

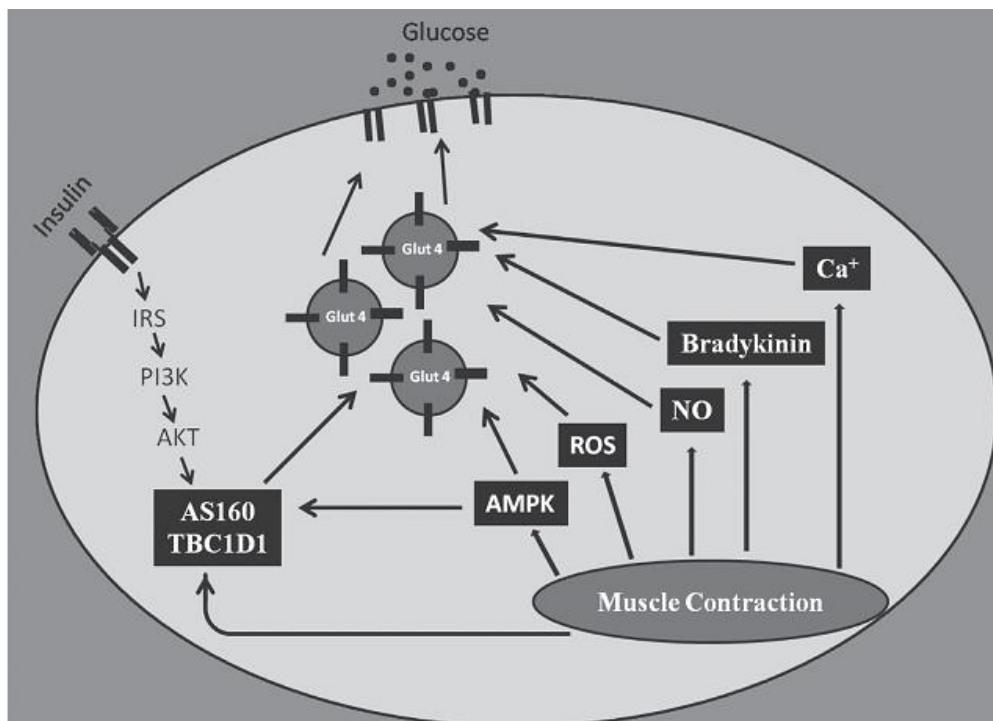
Sedentarismo, hábitos alimentares inadequados e exposição diária ao estresse caracterizam o estilo de vida moderna. O sedentarismo é associado a muitas doenças crônicas como hipertensão, diabetes tipo 2, obesidade, síndrome metabólica, cardiopatias e a uma maior taxa de mortalidade prematura (5). Modificações no estilo de vida, incluindo a mudança do comportamento sedentário e os hábitos alimentares são descritos como eficazes na prevenção e no tratamento dessas doenças crônicas, algumas vezes antecedendo o tratamento farmacológico (41, 42).

O exercício físico promove diversas adaptações bioquímicas e fisiológicas. No entanto, diferentes adaptações são geradas por diferentes tipos de exercícios. Exercícios físicos podem ser divididos em duas formas: aeróbicos, que se caracterizam por baixa intensidade e longa duração, e exercícios anaeróbicos apresentando alta intensidade e curta duração. Ambas modalidades resultam em adaptações biológicas benéficas para a saúde (43).

As repetidas contrações musculares realizadas durante uma sessão de exercício, induzem alterações na contratilidade e tensão muscular, produção de ATP, maior influxo de cálcio para dentro da célula, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e assim ativando

cascatas de sinalização celular que regulam adaptações sistêmicas geradas pelo exercício (9, 43).

O aumento na captação de glicose é um importante fator na prescrição de condutas terapêuticas em doenças, como no diabetes tipo 2. Este efeito induzido pelo exercício físico, se deve principalmente pela maior translocação dos transportadores GLUT-4 para a membrana plasmática (figura 4). Além de proporcionar o aumento da translocação do GLUT-4, ocorre também um aumento da expressão desses transportadores, no tecido muscular e adiposo, adicionalmente gera adaptações em enzimas relacionadas à fosforilação e oxidação da glicose, otimizando seu metabolismo (44, 45).



**Figura 4.** Efeito do exercício físico nas vias de sinalização intracelulares resultando na translocação do GLUT 4 para membrana plasmática. Proteína quinase ativada por AMP (AMPK), ROS, NO, bradicinina e  $\text{Ca}^{2+}$  são alguns mediadores envolvidos na translocação do GLUT 4 induzida pelo exercício. *Alvim R.O., et al. 2015.*

Durante uma sessão aguda de exercício aeróbico, ocorre aumento do débito cardíaco para manutenção da perfusão dos músculos ativos, devido inicialmente ao aumento do volume sistólico e aumento da frequência cardíaca. A pressão arterial sistólica (PAS) aumenta juntamente com o débito cardíaco, enquanto a pressão arterial diastólica (PAD) diminui

associadamente com a resistência vascular periférica. Por outro lado, durante o exercício de resistência/força (anaeróbico) ocorre elevação da PAS e PAD, resultado do barorreflexo, onde a pressão intramuscular excede a pressão arterial, interrompendo o fluxo sanguíneo, fazendo com que a pressão arterial aumente para vencer a resistência e garantir a perfusão muscular. A hipotensão pós-exercício em indivíduos normotensos e hipertensos é justificada principalmente pela diminuição nos níveis de noradrenalina e inibição da atividade simpática (46).

O exercício físico demonstra efeitos redutores na pressão arterial de indivíduos normotensos e hipertensos, sendo considerando uma importante ferramenta na prevenção e tratamento da hipertensão. Exercícios aeróbicos e anaeróbicos apresentam efeitos positivos no controle da pressão arterial. Esses benefícios são justificados por adaptações neuroendócrinas e por alterações estruturais, como diminuição nos níveis de noradrenalina e angiotensina II circulantes juntamente com menor expressão de seus receptores, elevação dos níveis de NO, otimização da atividade antioxidante e melhora da sensibilidade a insulina. Estruturalmente, ocorre remodelamento vascular e angiogênese (9, 46, 47).

Em relação ao sistema cardíaco, a prática regular de exercícios também promove alterações na sua função e conseqüentemente benefícios, atuando na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (48). Remodelamento cardíaco, melhora do controle autonômico do coração e bradicardia de repouso são alguns efeitos clássicos do treinamento físico (49). O aumento do consumo máximo de oxigênio gerado pela prática regular de exercício físico leva a um enchimento ventricular mais rápido, aumento da contratilidade do miocárdio e, conseqüentemente, um maior volume de ejeção sistólico. Periféricamente, nos músculos, ocorre aumento do número de capilares e uma melhor captação de oxigênio, levando a um menor gasto energético pelo sistema cardíaco, e assim uma menor frequência cardíaca (49, 50).

O exercício físico regular pode promover efeitos anti-inflamatórios, podendo influenciar positivamente o sistema imunológico em relação a doenças crônicas, aumentando os níveis de citocinas anti-inflamatórias (51). O treinamento crônico, por pelo menos 8 semanas, melhora a razão entre Interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), aumentando os níveis de IL-10 e diminuindo TNF- $\alpha$  (52). As citocinas anti-inflamatórias induzidas pelo exercício físico podem estar inibindo citocinas pró-inflamatórias produzidas em doenças como diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. Os efeitos protetores do treinamento estão ligados à sua intensidade, ou seja, em intensidade moderada pode ajudar a resolver infecções causadas por micro-organismos, em contrapartida em intensidade alta pode aumentar a suscetibilidade a infecções (53).

## 2.4 EXERCÍCIO FÍSICO E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

O exercício físico provoca adaptações em sistemas de bioquímicos e fisiológicos e, quando executado de forma correta, produz benefícios à saúde, participando da prevenção e tratamento de doenças crônicas (43). O sistema purinérgico, semelhante a outros sistemas bioquímicos, também sofre influência do exercício. Em 1969, foi evidenciada a liberação de ATP pelos músculos durante o exercício, adicionalmente vários tipos celulares liberam ATP, durante estímulos mecânicos (no qual está incluído o exercício físico). Durante a contração muscular o ATP é liberado pelo músculo devido a deformação mecânica, e como co-transmissor juntamente com a noradrenalina de terminações nervosas do sistema nervoso simpático (SNS) para o meio extracelular, exercendo seus efeitos através de receptores P2 (54).

A ADO, produto da hidrólise do AMP pela 5'-nucleotidase, é uma importante molécula cardioprotetora, regulando fluxo sanguíneo coronário e o ritmo cardíaco. O treinamento aeróbico e anaeróbico possui a habilidade de aumentar a atividade da 5'-nucleotidase no coração de ratos, submetidos aos dois tipos de treinamento durante 6 semanas, no entanto o exercício agudo (uma única sessão), não modificou a atividade desta enzima. Esse aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase, pode levar a um possível aumento dos níveis de ADO no coração, impactando na sua função (10).

Durante o exercício físico observa-se o aumento na liberação de ADO no sistema cardíaco, levando a vasodilatação coronária, o que se justifica pelo aumento de consumo de oxigênio durante o exercício. A hidrólise de ATP, ADP e AMP aumenta em ratos submetidos ao exercício físico aeróbico moderado crônico (10 semanas), esse aumento ocorre no soro e no sarcolema de células cardíacas, associado ao aumento na hidrólise dos nucleotídeos da adenina foi observado o aumento na expressão da E-NTPDase1/CD39 e da ecto-5'-nucleotidase/CD73 no tecido cardíaco (22).

Indivíduos com hipertensão apresentam, entre diversas características, um estado pró-inflamatório crônico, e considerando o exercício físico como uma das terapêuticas para o tratamento da hipertensão e adicionalmente a sua capacidade de combater inflamações crônicas de baixa intensidade, foi avaliada a influências do exercício físico na atividade ectonucleotidásica em linfócitos de ratos hipertensos, sendo observado que ratos hipertensos apresentam maior hidrólise de ATP e ADP. No entanto os ratos hipertensos que realizaram exercício aeróbico moderado crônico (6 semanas), reverteram esse aumento. Os animais que se exercitaram também apresentaram uma menor expressão da E-NTPDase1/CD39 em linfócitos.

No mesmo trabalho, foi apresentado que o exercício físico agudo (uma única sessão), diminuiu a hidrólise de ATP e ADP (55).

Em soro de ratos diabéticos, a hidrólise dos nucleotídeos da adenina apresenta-se aumentada, juntamente com o aumento da atividade da E-NPP por meio da hidrólise de seu substrato específico *p*-Nph-5'-TMP. Quando ratos diabéticos são submetidos ao exercício aeróbico moderado por 4 semanas, a hidrólise de ATP, ADP e AMP retornam aos níveis basais, no entanto, não foi observado efeitos sobre a E-NPP. Sugere-se que o aumento na atividade ectonucleotidásica no soro de ratos diabéticos é compensatória, levando a uma maior produção de ADO circulante, gerando efeitos citoprotetores (56, 57).

Da mesma forma que acontece com linfócitos de ratos hipertensos, em plaquetas a sinalização purinérgica se mostra alterada, podendo ser modulada pelo treinamento. Animais hipertensos apresentam maior hidrólise de ATP, ADP e AMP em plaquetas. Quando submetidos ao exercício físico aeróbico moderado por 6 semanas, a hidrólise dos nucleotídeos retornou aos níveis dos controles, demonstrando que o exercício teve um efeito na prevenção ou revertendo esse aumento. No entanto, contrariamente aos linfócitos, após serem submetidos ao exercício físico agudo, houve um aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP. Considerando o estado pró-trombótico após o exercício agudo, esse aumento na hidrólise pode relacionado a um efeito compensatório para impedir a formação de ADP e uma maior formação de ADO, inibindo a agregação plaquetária (12).

Diferentes protocolos de treinamento físico produzem diferentes efeitos na hidrólise extracelular de ATP, ADP e AMP no hipocampo de ratos. O treinamento aeróbico com intensidade moderada, realizado diariamente durante 2 semanas diminuiu a hidrólise de ATP e ADP, sem efeito algum no AMP, enquanto um protocolo de treinamento aeróbico na mesma intensidade realizado 3 vezes por semana, durante 12 semanas não produziu efeito na hidrólise extracelular desses nucleotídeos em sinaptossomas hipocampais. No mesmo trabalho, relata-se uma grande presença de NTPDase 1, 2 e 3 no cérebro, possivelmente o treinamento físico exercendo efeitos sobre essas enzimas. Foram avaliados os efeitos dos dois protocolos de treinamento no soro sanguíneo. Semelhantemente ao que aconteceu no hipocampo, o protocolo de 2 semanas diminuiu a hidrólise de ATP e ADP, sem efeitos sobre o AMP, enquanto o protocolo de 12 semanas aumenta a hidrólise somente do ATP. No soro existe a possibilidade de o exercício físico atuar sobre as formas solúveis das NTPDases (11).

O nível de ADO no sangue de pacientes com insuficiência cardíaca pode ser alterado pelo exercício físico. Naturalmente, os níveis basais de ADO são mais altos em pacientes com insuficiência cardíaca, foi demonstrado que quanto maior o nível de insuficiência cardíaca



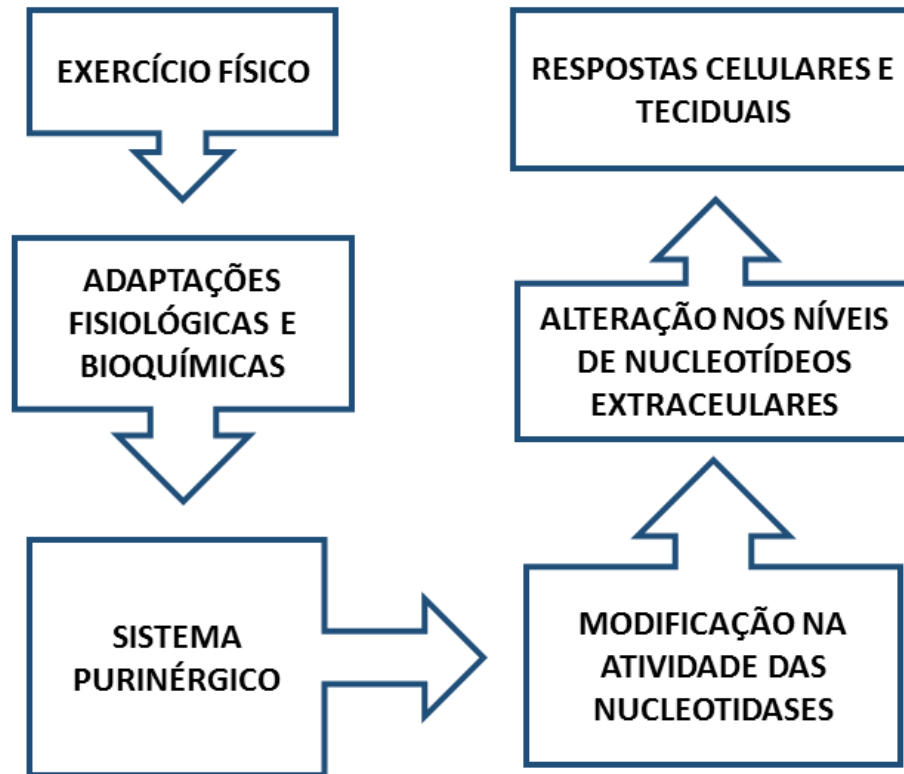
maiores são os níveis ADO no sangue. Quando esses indivíduos são submetidos ao exercício aeróbico agudo ocorre um aumento na produção ADO até 30 minutos após o fim do exercício, e da mesma forma pacientes com maior grau de insuficiência cardíaca apresentam uma maior produção de adenosina pós-exercício. Além do papel cardioprotetor da ADO, existe a possibilidade desse nucleosídeo aumentar a tolerância ao exercício físico em pacientes cardiopatas (58).

A expressão da E-NTPDase1/CD39 pode ser alterada após o exercício aeróbico agudo em indivíduos sedentários e ativos. Quando submetidos ao exercício aeróbico agudo em alta intensidade, indivíduos sedentários e fisicamente ativos apresentaram diminuição na expressão da E-NTPDase1/CD39 em plaquetas e um aumento da expressão dessa enzima em linfócitos B, indicando um possível papel regulador dos linfócitos B na tromboregulação pós-exercício (59).

Aletas, quando submetidos ao exercício aeróbico agudo, em diferentes intensidades, mostram um aumento gradual nos níveis da ATP e ADP extracelular em plasma sanguíneo, de acordo com a intensidade (submáxima e máxima), esses nucleotídeos mantiveram sua concentração elevada até 10 minutos após o fim do exercício. A concentração de AMP, na mesma situação, só aumentou durante o exercício de intensidade máxima. A formação de fosfato inorgânico (Pi) e PPi, respectivamente por NTPDases e NPPs no soro sanguíneo de atletas também foi avaliada, mostrando um aumento na produção de Pi (maior atividade de NTPDases) durante o exercício submáximo, máximo e após 10 minutos do fim do exercício, de maneira similar mostrou-se um aumento na produção de PPi (maior atividade de NPPs) durante o exercício máximo e submáximo. Em indivíduos sedentários, quando submetidos ao exercício máximo, ocorreu um aumento na atividade das NTPDases e NPPs, verificada pela maior produção extracelular de Pi e PPi, respectivamente (60).

Considerando a participação da sinalização purinérgica em processos fisiológicos, bioquímicos e patológicos, e das diversas adaptações em diferentes sistemas causadas pelo exercício físico, está dissertação se propôs a esclarecer o funcionamento da sinalização purinérgica em seres humano e qual a influência do exercício físico nesse sistema de sinalização, considerando a escassez de dados sobre esses aspectos na atual literatura.

### 3 MARCO TEÓRICO



**Figura 5.** Organograma ilustrando o marco teórico da dissertação.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

Baseado nos dados supracitados e considerando a crescente importância dos temas sistema purinérgico, exercício físico e sedentarismo na literatura científica e suas respectivas importâncias na fisiopatologia, tratamento e prevenção de doenças, esse trabalho é de proeminente relevância, pois visa apresentar novos dados referentes ao comportamento da sinalização purinérgica diante as condições de sedentarismo e a resposta ao exercício físico agudo. Além disso, há uma falta de referências sobre a interação da sinalização purinérgica e exercício físico, e como esse sistema de sinalização pode ser influenciado pelo exercício. O melhor entendimento dessas informações irá possibilitar uma melhor concepção sobre os aspectos moleculares do exercício, permitindo a otimização na prescrição deste na prevenção e tratamento de doenças crônicas, como diabetes tipo 2, hipertensão e cardiopatias.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVOS PRIMÁRIOS

Analisar e caracterizar a hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina em soro de indivíduos adultos sedentários do sexo masculino submetidos a uma sessão aguda de exercício aeróbico moderado.

### 5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a hidrólise extracelular de ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'-TMP no soro de indivíduos adultos sedentários.

Avaliar a hidrólise extracelular ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'-TMP no soro em indivíduos adultos sedentários do sexo masculino quando submetidos a uma sessão aguda de exercício aeróbico moderado.

Quantificar e comparar os níveis de ATP, ADP, AMP e ADO extracelular pré e pós-exercício no soro de indivíduos adultos sedentários.

Relacionar os valores plasmáticos de parâmetros bioquímicos de atividade metabólica em humanos com as hidrólises de ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'-TMP no soro.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Drury a N, Szent-Györgyi a. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929;68(3):213–37.
2. Burnstock G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med (Northfield Il).* 2002;2(1):45–53.
3. Burnstock G. Purinergic signalling : past , present and future. *Brazilian J Med Biol Res.* 2009;42:3–8.
4. Kruk J. Health and Economic Costs of Physical Inactivity. *Asian Pac J Canc Prev.* 2014;15(18):7499–503.
5. Who WHO. Global recommendations on physical activity for health. Geneva World Heal Organ [Internet]. 2010;60. Available from: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Global+Recomendations+on+physical+activity+for+health#0>
6. Pedersen BK, Brandt C. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
7. Ambrose KR, Golightly YM. Physical exercise as non-pharmacological treatment of chronic pain: Why and when. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;29(1):120–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521694215000297>
8. Schoenborn C a., Stommel M. Adherence to the 2008 adult physical activity guidelines and mortality risk. *Am J Prev Med.* 2011;40(5):514–21.
9. Tipton CM. Exercise, Training and Hypertension: An Update. *Exerc Sport Sci Rev.* 1991;19(1):447–506.

10. Langfort J, Czarnowski D, Pilis W, Wójcik B, Górski J. Effect of various types of exercise training on 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities in rat heart: influence of a single bout of endurance exercise. *Biochem Mol Med.* 1996;59(1):28–32.
11. Siqueira IR, Elsner VR, Rilho LS, Bahlis MG, Bertoldi K, Rozisky JR, et al. A neuroprotective exercise protocol reduces the adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes and serum of rats. *Brain Res. Elsevier B.V.*; 2010;1316:173–80.
12. Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D, Schmatz R, et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2012;371(1-2):147–56.
13. Burnstock G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of. *Pharmacol Rev.* 2006;58(1):58–86.
14. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2008;1783(5):673–94.
15. Cheung G, Chever O, Rouach N. Connexons and pannexons: newcomers in neurophysiology. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014;8(November):1–19. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00348/abstract>
16. Velasquez S, Eugenin E a. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front Physiol.* 2014;5 MAR(March):1–12.
17. Merighi S, Borea PA, Gessi S. Adenosine receptors and diabetes: Focus on the A2B adenosine receptor subtype. *Pharmacol Res. Elsevier Ltd*; 2015;99:229–36.
18. Puchałowicz K, Tarnowski M, Baranowska-Bosiacka I, Chlubek D, Dziedziejko V. P2X and P2Y Receptors—Role in the Pathophysiology of the Nervous System. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014;15(12):23672–704. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/12/23672/>

19. Ralevic V, Dunn WR. Purinergic transmission in blood vessels. *Auton Neurosci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;191:48–66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070215000430>
20. Di Virgilio F, Vuerich M. Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci*. The Authors; 2015;191:117–23.
21. Roszek K, Czarnecka J. Is Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase ( NTPDase ) -based Therapy of Central Nervous System Disorders Possible? *Mini-Reviews Med Chem*. 2015;15(1):5–20.
22. Roque FR, Soci UPR, Angelis K De, Coelho M a, Furstenau CR, Vassallo D V, et al. Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats. *Clinics*. 2011;66(12):2105–11.
23. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012;8(3):437–502.
24. Cardoso AM, Schetinger MRC, Correia-de-Sá P, Sévigny J. Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. *Auton Neurosci*. Elsevier B.V.; 2015;191:25–38.
25. Buergler JM, Maliszewski CR, Broekman MJ, Kaluza GL, Schulz DG, Marcus AJ, et al. Effects of SolCD39, a novel inhibitor of platelet aggregation, on platelet deposition and aggregation after PTCA in a porcine model. *J Thromb Thrombolysis*. 2005;19(2):115–22.
26. Mathieu P. Pharmacology of ectonucleotidases: Relevance for the treatment of cardiovascular disorders. *Eur J Pharmacol*. Elsevier; 2012;696(1-3):1–4.
27. Lunkes GI, Lunkes DS, Leal D, Araújo MDC, Corrêa M, Becker L, et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;81(3):351–7.
28. Bagatini MD, Martins CC, Gasparetto D, Spanevello RM, Becker L V., Rosa CS, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta*. Elsevier B.V.; 2011;412(1-2):159–64.

29. Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, Gutierrez JM, Maldonado PA, Thomé GR, et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomed Pharmacother.* 2012;66(1):40–5.
30. Shirley DG, Vekaria RM, Sévigny J. Ectonucleotidases in the kidney. *Purinergic Signal.* 2009;5(4):501–11.
31. Moehlecke M, Kramer CK, Leitão CB, Krahe AL, Balbosco I, Azevedo MJ De, et al. ENPP1 K121Q polymorphism and ischemic heart disease in diabetic patients. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(2):157–61, 168–73, 159–63.
32. Bacci S, Di Paola R, Menzaghi C, Di Fulvio P, Di Silvestre S, Pellegrini F, et al. ENPP1 Q121 variant, increased pulse pressure and reduced insulin signaling, and nitric oxide synthase activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1678–83.
33. Di Paola R, Caporarello N, Marucci A, Dimatteo C, Iadicicco C, Del Guerra S, et al. ENPP1 affects insulin action and secretion: Evidences from in vitro studies. *PLoS One.* 2011;6(5).
34. Sträter N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal.* 2006;2(2):343–50.
35. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2006;2(2):351–60.
36. Grenz A, Zhang H, Eckle T, Mittelbronn M, Wehrmann M, Köhle C, et al. Protective role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in renal ischemia. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(3):833–45.
37. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):413–92.
38. Burnstock G, Boeynaems J. Purinergic signalling and immune cells. 2014;529–64.



39. Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology* [Internet]. 2015;1–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390815300393>
40. Sperlágħ B, Heinrich A, Csöllle C. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release - An update. *Purinergic Signal*. 2007;3(4):269–84.
41. Dempsey PC, Owen N, Biddle SJH, Dunstan DW. Managing sedentary behavior to reduce the risk of diabetes and cardiovascular disease. *Curr Diab Rep*. 2014;14(9).
42. Schenkel IDC, Carvalho T De, Simone RP. Exercise Controls Blood Pressure and Improves Quality of Life. *Rev Bras Med do Esporte*. 2007;19(188):91–5.
43. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*. Elsevier Inc.; 2013;17(2):162–84.
44. Tatsuya Hayashi JFPW and LJG. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;1039–51.
45. Alvim RO, Cheuhen MR, Machado SR. General aspects of muscle glucose uptake. *Ann Brazilian Acad Sci*. 2015;87(1):351–68.
46. Ruivo JA, Alcântara P. Hipertensão arterial e exercício físico. *Rev Port Cardiol* [Internet]. 2012 Feb;31(2):151–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0870255111001107>
47. De Fátima Monteiro M, Sobral Filho DC. Exercício físico e o controle da pressão arterial. *Rev Bras Med do Esporte*. 2004;10(6):513–9.
48. Pozehl B, McGuire R, Norman J. Team-based Care for Cardiac Rehabilitation and Exercise Training in Heart Failure. *Heart Fail Clin*. Elsevier Inc; 2015;11(3):431–49.
49. Martins-Pinge MC. Cardiovascular and autonomic modulation by the central nervous system after aerobic exercise training. *Brazilian J Med Biol Res*. 2011;44(9):848–54.
50. Opondo M a., Sarma S, Levine BD. *The Cardiovascular Physiology of Sports and Exercise*. Clin Sports Med. Elsevier; 2015;34(3):391–404.

51. Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm.* 2008;2008.
52. Nunes RB, Alves JP, Kessler LP, Dal Lago P. Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68(6):876–82.
53. Terra R, Silva SAG Da, Pinto VS, Dutra PML. Effect of exercise on the immune system: response, adaptation and cell signaling. *Rev Bras Med do Esporte.* 2012;18(3):208–14.
54. Greaney JL, Wenner MM, Farquhar WB. Exaggerated increases in blood pressure during isometric muscle contraction in hypertension: Role for purinergic receptors. *Auton Neurosci. Elsevier B.V.;* 2015;188:51–7.
55. Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, Zanini D, Schmatz R, et al. Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats. *J Hypertens.* 2015;33(4):763–72.
56. R ucker B, Abreu-Vieira G, Bischoff LB, Harthmann AD, Sarkis JJF, Wink MR, et al. The nucleotide hydrolysis is altered in blood serum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2010;116(2):79–87.
57. Moritz CEJ, Abreu-Vieira G, Piroli C, De Senna PN, Cardoso VV, Wink MR, et al. Physical training normalizes nucleotide hydrolysis and biochemical parameters in blood serum from streptozotocin-diabetic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2012;(January):1–7.
58. Kinugawa T, Fujita M, Ogino K, Kato M, Osaki S, Igawa O, et al. Catabolism of Adenine Nucleotides Favors Adenosine Production Following Exercise in Patients With Chronic Heart Failure. *J Card Fail.* 2006;12(9):720–5.
59. Coppola A, Coppola L, dalla Mora L, Limongelli FM, Grassia A, Mastrolorenzo L, et al. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *J Appl Physiol.* 2005;98(4):1414–9.

60. Yegutkin GG, Samburski SS, Mortensen SP, Jalkanen S, González-Alonso J. Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. *J Physiol.* 2007;579(Pt 2):553–64.

## 7 ARTIGO

Manuscrito à ser submetido na revista *Molecular and Cell Biochemistry*, devidamente formatado de acordo com as regras da mesma.

### **Altered extracellular ATP, ADP and AMP hydrolysis in blood serum of sedentary individuals after acute aerobic moderate exercise session**

Cesar Eduardo Jacintho Moritz<sup>1</sup>, Bruno Costa Teixeira<sup>2,6</sup>, Liliana Rockenbach<sup>3</sup>, Alvaro Reischak-Oliveira<sup>2</sup>, Emerson André Casali<sup>4,5</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano, Escola de Educação Física, Universidade Federado do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup>Progama de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>4</sup>Departameto de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>6</sup>Departamento de Educação Física da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

Corresponding Author:

Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 – Anexo, Laboratório 22, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone/Fax: 55-51-33085553

E-mail: [abattastini@gmail.com](mailto:abattastini@gmail.com)

## Abstract

Nucleotidases participate of regulation of physiological and pathological events, as inflammation and coagulation. Exercises promotes distinct adaptations, may influence purinergic signaling. In present work, we evaluated the influence of acute moderate aerobic exercise in nucleotidasic activity, ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and other metabolic residues levels from ATP hydrolysis, additionally biochemistry parameters were analyzed associated to enzymatic activity in blood serum of sedentary male subjects. Sedentary individuals were submitted to moderate aerobic exercise in treadmill, blood samples were collected pre and post-exercise, serum was separated to analysis. Results showed an increase in ATP, ADP and AMP extracellular hydrolysis post-exercise ( $0.302 \pm 0.065$ ;  $0.407 \pm 0.103$ ;  $0.293 \pm 0.058$ , respectively) compared to pre-exercise value ( $0.115 \pm 0.018$ ;  $0.157 \pm 0.023$ ;  $0.191 \pm 0.023$ , respectively). NPP activity was measured by *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis, showing increased activity post-exercise ( $5.27 \pm 0.74$ ) compared to pre-exercise ( $3.55 \pm 0.59$ ). Purine levels were analyzed by HPLC, pre and post-exercise in blood serum. Decreased levels of ATP and ADP are found in post-exercise ( $0.646 \pm 0.117$  and  $0.755 \pm 0.174$ , respectively) in contrast pre-exercise values ( $0.824 \pm 0.155$  and  $0.920 \pm 0.227$ , respectively). Conversely, post-exercise levels of adenosine and inosine increased ( $9.44 \pm 1.14$  and  $4.38 \pm 0.62$ , respectively), comparing to pre-exercise ( $7.69 \pm 1.12$  and  $3.54 \pm 1.32$ , respectively). Our results, indicate a possible influence of acute exercise in nucleotidasic activity, modifying enzymatic behavior to promotes a protective biological environment.

## Introduction

As it is broadly described, physical exercise promotes molecular and tissue adaptations being non pharmacological conduct in prevention and treatment of chronic diseases as diabetes, hypertension and heart failure [1, 2]. Inversely, sedentary behavior increases predisposition for cardiovascular diseases, diabetes type 2, metabolic syndrome, obesity and increasing premature mortality rate [3, 4]. The World Health Organization (WHO) recommends for adults (18 – 64 years) at least 150 minutes of moderate aerobic exercise per week for health benefits [5].

Purinergic signaling influence through extracellular nucleotides and nucleosides, many physiological situations as inflammation, coagulation and neurotransmission [6]. Likewise, this signaling system are probably involved in pathophysiology of many diseases like some cardiopathies, cancer, hypertension and diabetes [7, 8, 9].

Extracellular levels of adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-monophosphate (AMP) and adenosine (ADO) are controlled by the action of nucleotidases. These enzymes are mainly divided in nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases 1–8) family, nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterase (NPPs 1–7) family and 5'-nucleotidase/CD73 [10]. Purinergic receptors, called purinoceptors, are involved in transmission of purinergic signaling, mediating extracellular actions of nucleotides and nucleosides. They are classified in P1 and P2 subtypes. ADO show high affinity for P1 receptors and are subdivided in A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, all of them are metabotropic with different particularities. The P2 family are subdivided in P2X<sub>1-7</sub> (ionotropic) activated by ATP or P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>, (metabotropic) activated by ATP, ADP, uridine 5'-triphosphate (UTP) or uridine 5'-diphosphate (UDP). These receptors, present specific features and distribution [11].

ATP is released during mechanical stimulation, including exercise, occurs in neurons, muscle and endothelial cells. In 1969, it was demonstrated the extracellular release of ATP by muscle cells during and after exercise. During exercise, this released ATP can act via P2X receptor and influence blood pressure (BP) and heart rate (HR) [12].

Despite limited and unclear, data suggested the influence of exercise in purinergic signaling. Ten weeks of moderate aerobic exercise in rats, increased ATP, ADP and AMP hydrolysis in blood serum and cardiac sarcolemmal, additionally increased E-NTPDase1/CD39 expression and ecto-5'-nucleotidase/CD73 in heart [13]. Different

exercise protocols, promote distinct results in ectonucleotidase activities. Rats submitted to 2 weeks of 20 minutes daily of moderate aerobic exercise, reduced ATP and ADP hydrolysis in hippocampal synaptosomes and blood serum. Interestingly, in the same work, it was showed that three times a week of moderate aerobic exercise sessions of 20 minutes by 12 weeks, did not change adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes, but increased ATP hydrolysis in blood serum [14]. Hypertensive rats, submitted to 6 weeks of aerobic moderate exercise, 5 times a week per 1 hour, demonstrated a decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis; while sedentary hypertensive rats remained with higher levels of nucleotide hydrolysis in platelets. However, a single session of aerobic moderate exercise increased adenine nucleotides hydrolysis in platelets, in both cases suggesting a modification in E-NTPDase1/CD39 activity [15]. Previous work demonstrated that in a streptozotocin-diabetic rats there was an increased adenine nucleotide hydrolysis in blood serum, and this increase can be normalize by 4 weeks of aerobic training [16]. In another study, it was showed that sedentary and physically active individuals performing incremental aerobic exercise to exhaustion, and the NTPDase1/CD39 expression decreased in platelet of both groups. In contrast NTPDase1/CD39 B lymphocytes expression increased [17]. Trained subjects submitted to strenuous exercise showed temporary increase in ADPase activity in blood serum, according to exercise intensity and time recovery. ATP, ADP and AMP extracellular levels in blood plasma, increased in submaximal and maximal exercise intensity [18].

Taking account the important role of purinergic signaling in multiple conditions, considering exercise a promoter of biological adaptations, and an unclear interaction between exercise and purinergic system, our objective was to analyze the nucleotidase activities pre and post-acute protocol of acute moderate aerobic exercise, in blood serum of sedentary male individuals. In addition, the purine nucleotides and metabolites levels were quantified in the blood serum of these individuals. Besides, biochemical parameters will be collected pre and post-exercise and correlated with enzymatic activity and nucleotides levels.

## **Material and methods**

### **Chemicals**

Nucleotides, *p*-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP), adenosine (ADO), inosine (INO), hypoxanthine (HYPOX), xanthine (XANT), uric acid (UA), Coomassie brilliant blue G, Tris, methanol, tetrabutylammonium hydroxide and potassium phosphate monobasic were obtained from Sigma Chemical CO. (ST. Louis, MO, USA). The biochemistry blood parameters were evaluated by commercial kits from Labtest™ diagnostic reagents (Labtest Diagnóstica S/A, Minas Gerais, Brazil). All others reagents were also of analytical grade.

## Subjects

Ten young adults male with mean ( $\pm$  SD) age  $25.3 \pm 2.9$ , sedentary, not engaged in any exercise program for at least 6 months, without previous diseases, no pharmacological treatment at least 60 days and non-smokers participated of the study (Table 1). Subjects with a history of alcohol abuse were excluded ( $2 \geq$  doses per day). The volunteers were instructed to abstain from caffeine for  $\geq 12$ h before tests. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. The study was conducted according to the declaration of Helsinki and was approved by the Ethic Committee of Federal University of Rio Grande de Sul (760.528 / 2014). Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) were used in the preparation of the manuscript [19].

## Experimental protocol

The experimental protocol was realized in two different days in the Exercise Research Laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. In the first day, all subjects were interviewed and clinical evaluated. Data about history diseases, pharmacological treatments, dietary and exercise habits were collected. Additionally, the subjects answered the Physical Activity Readiness Questionnaire (PAR-Q), used to exclude individuals with inappropriate health conditions. Body mass, height and body mass index (BMI) was also measured (Table 1).

To determine the intensity of acute exercise, oxygen maximum uptake ( $VO_{2max}$ ) and maximum heart rate (MHR) were evaluated, through ergoespirometry in treadmill. The subjects breathed through a facemask connected to a pneumotacograph and a gas analyzer (MedGraphics Cardiorespiratory Diagnostic Systems, model CPX-D, St. Paul,



MN). A telemetric band (S610, Polar Electro Oy, Finland) was positioned to monitor the heart rate (HR) of individuals. The initial velocity was 5 Km.h<sup>-1</sup>, then work rate was increased by 0.5 Km.h<sup>-1</sup> every 1 minute, until subjects were able to run or asked to stop (Table 1) [20, 21].

Seven days after evaluations, in the second day of experimental protocol, subjects arrived at the laboratory and rested for 30 minutes in supine position. After rest, the pre-exercise blood samples and capillary glycemia (glucometer Accu Check Advanced, Roche, Switzerland) were collected. The individuals were submitted to 30 minutes of aerobic exercise in treadmill with 70% of MHR of intensity. Blood samples and capillary glycemia were collected immediately after the end of session.

#### Isolation of blood serum samples

Blood samples (10 mL) were collected before and immediately after exercise protocol from the vein of the antecubital region. The blood were collected in plastic tubes without anticoagulant. For blood serum isolation, samples was allowed to clot at room temperature for 30 min before centrifugation at 5,000 rpm for 10 min. After centrifugation, clot was discarded and the serum samples used to enzymatic assay. Serum aliquots were stored at -80°C for posterior analysis of blood biochemistry.

#### Protein determination

Protein was measured by the Comassie Blue method, using bovine serum albumin as standard [22].

#### Assay of NTPDase and 5'-Nucleotidase activity

For the incubation of NTPDase and 5'-nucleotidases in blood serum, the reaction medium containing 112.75mM (final concentration) Tris-HCl buffer, pH 8.0 was used. Samples were in pre-incubation for 10 minutes at 37°C and to the start reactions, substrates (ATP, ADP and AMP) were added in reaction medium in a final concentration 3mM. After 50 minutes of incubation, 5% (final concentration) trichloroacetic acid (TCA) were added to stop the reaction and subsequently the samples were chilled on ice. The samples were centrifuged for 10 minutes and the amount of inorganic phosphate (Pi)

released was assayed by the malachite green colorimetric method with minor modifications [23]. Controls were performed to correct the non-enzymatic substrate hydrolysis by adding blood serum after the reactions had been stopped with TCA. All samples were performed in triplicate. Enzyme activities were expressed as nmol of Pi released per minute per milligram of protein.

#### Assay of NPP activity

The phosphodiesterase activity was assessed using *p*-Nph-5'-TMP (an artificial marker substrate that is used for the *in vitro* assay of this activity) as previously described [24]. The NPP activity reaction was performed in a medium containing Tris-HCl in final concentration of 112mM, pH 8.9. Approximately 1mg of serum protein was pre-incubated for 10 minutes at 37°C. Enzyme reaction was started by the addition of 0.5mM (final concentration) of *p*-Nph-5'-TMP. After 60 minutes of incubation, 200uL of NaOH 0.2N was added to the medium to stop the reaction. The amount of *p*-Nph-5'-TMP released from the substrate was measured at 410nm using a molar extinction coefficient of  $18.8 \times 10^{-3} \text{ M/cm}$ . Controls to correct the non-enzymatic substrate hydrolysis were performed by adding blood serum after the reactions has been stopped with NaOH. All samples were performed in quintuplicate. Enzyme activities were expressed as nmol of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein.

#### Analysis of purine levels by high-pressure liquid chromatography (HPLC)

Purine levels and metabolic residues of ATP hydrolysis of serum samples pre and post-exercise were analyzed by HPLC. The denaturation of proteins was performed using 0.6 mol/L perchloric acid. All samples were then centrifuged (14,000 x *g* for 10 min at 4°C), supernatants were neutralized with 4.0N KOH and clarified with a second centrifugation (14,000 x *g* for 30 min at 4°C). After second centrifugation, the supernatants were collected and centrifuged again (14,000 x *g* for 30 min at 4°C). Aliquots of 20 µL were applied to a reversed-phase HPLC (Shimadzu, Japan) using a C<sub>18</sub> column (Ultra C18, 25 cm x 4.6 mm x 5 µm, Restek – USA). The elution was carried out applying a linear gradient from 100% solvent A (60 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 5 mM of tetrabutylammonium phosphate, pH 6.0) to 100% of solvent B (solvent A plus 30% methanol) over a 30 min period (flow rate at 1.4 mL/min) according to a method

previously described [25]. The amounts of purines were measured by absorption at 254 nm. The retention time of standards was used as parameter for identification and quantification. Purines concentrations are expressed as nmol of compound per mL of serum.

#### Blood serum biochemical parameters

After blood serum isolation, creatine kinase (CK), creatinine (CR), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein (LDL) and low density lipoprotein (LDL) were evaluated pre and post-exercise blood serum of the individuals. The concentrations levels were analyzed using standard methods with Labtest™ diagnostics reagents (Labtest™ Diagnóstica S/A, Minas Gerais, Brazil), according manufacturer recommendations.

#### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error mean (SEM). The comparison of subjects pre and post-acute exercise protocol was analyzed by Student's *t* test for paired samples using GraphPad Prism, version 5.01, San Diego, CA, USA. Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

## Results

#### Nucleotidase activities

ATP, ADP and AMP (Fig. 1a, 1b and 1c, respectively) hydrolysis was significantly higher in blood serum of sedentary subjects submitted to an acute protocol of moderate aerobic exercise ( $0.302 \pm 0.065$ ;  $0.407 \pm 0.103$ ;  $0.293 \pm 0.058$  nmol Pi/min/mg protein, respectively) when compared to pre-exercise values ( $0.115 \pm 0.018$ ;  $0.157 \pm 0.023$ ;  $0.191 \pm 0.023$  nmol Pi/min/mg protein, respectively). The activity of NPP (Fig. 1d), measured by hydrolysis of *p*-Nph-5'-TMP, was increased post-exercise ( $5.27 \pm 0.74$  nmol *p*-nitrophenol/min/mg protein) in comparison to pre-exercise levels ( $3.55 \pm 0.59$  nmol *p*-nitrophenol/min/mg protein).

## Purine and metabolic residues levels

To investigate influence of acute moderate aerobic exercise in adenine nucleotides, nucleoside and other metabolic residues levels from ATP hydrolysis we analyze blood serum through HPLC according described in Material methods. ATP and ADP (Fig. 2a and 2b) levels post-exercise ( $0.646 \pm 0.117$  and  $0.755 \pm 0.174$ , respectively) decreased compared to pre-exercise ( $0.824 \pm 0.155$  and  $0.920 \pm 0.227$ , respectively). Although not significant, the AMP levels (Fig. 2c) were higher post-exercise ( $0.794 \pm 0.137$ ) comparing to pre-exercise values ( $0.660 \pm 0.143$ ). Higher values of ADO and INO (Fig. 2d and 2e) were found post-exercise ( $9.44 \pm 1.14$  and  $4.38 \pm 0.62$ , respectively) than pre-exercise ( $7.69 \pm 1.12$  and  $3.54 \pm 1.32$ , respectively). XANT and HYPOX levels (Fig. 2f and 2g) did not show significant modification in both moments, pre and post-exercise. Raised levels of UA (Fig. 2h) were found post-exercise ( $289.2 \pm 21.48$ ) compared to pre-exercise levels ( $233.1 \pm 10.07$ ).

## Biochemical parameters

Classical clinical blood serum biochemical markers were analyzed pre and post-exercise acute aerobic exercise of sedentary individuals (Table 2). Glycemia values were not significantly altered pre and post exercise ( $85.3 \pm 1.89$  and  $88.9 \pm 3.96$ , respectively). Similarly, pre and post-exercise levels of CR ( $0.85 \pm 0.03$  and  $0.90 \pm 0.03$ , respectively) and HDL ( $46.33 \pm 2.22$  and  $47.4 \pm 2.20$ , respectively) did not significantly change. CK, TC, LDL and TG post-exercise levels were significantly increased ( $222 \pm 34.21$ ,  $187.8 \pm 8.08$ ,  $99.4 \pm 4.52$  and  $143.1 \pm 29.58$ , respectively), when compared to pre-exercise levels ( $189.9 \pm 30.06$ ,  $181 \pm 8.03$ ,  $95.7 \pm 4.78$  and  $129.8 \pm 28.13$ ).

## Discussion

Sedentary behavior is described as promoters of poor health, increased of chronic diseases, mortality rates and cost at least \$90 billion dollars in health care in United States [2, 26]. Lifestyle modification, including regular exercise and healthy diet, is related to reduced health costs, acting preventing and treatment of cardiovascular diseases, hypertension, obesity, diabetes type 2 and others [5, 27, 28].

Acute and chronic aerobic exercise exerts different tissue and cellular response. Broadly related in literature, acute aerobic exercise increases sympathetic nervous activity inhibiting parasympathetic nervous system and raised cardiac and ventilatory response to guarantee oxygen demand by increasing blood flow [29]. Vascular tone is altered during acute exercise, decrease of peripheral resistance (dilatation of small arteries and arterioles) and central vasoconstriction (liver, gut and pancreas). Hormones levels as insulin, glucagon, cortisol and adrenaline are influenced by exercise and glucose transport is increased by GLUT4 translocation. Prothrombotic effects of acute exercise are related to increase of platelet count, activation and P-selectin expression. Similarly, immune response are triggered by exercise, as interleukin 6 (IL-6) release [30, 31]. All this global response, are coordinated by cellular signaling systems, however the purinergic signaling participation in exercise effects remain unclear, despite considerable advances in recent years.

In the present work, we investigated soluble nucleotidase activities in blood serum of sedentary male young adults individuals in pre (basal conditions) and post-acute moderate aerobic exercise; in addition, we evaluated how this kind of exercise could influence adenine nucleotides concentrations in blood serum.

Our data showed a significantly increase of ATP, ADP, AMP and *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis post-acute aerobic exercise in blood serum the individuals (Fig. 1). This result is in agreement with previous study published by Yegutkin et al., analyzing enzymatic activity of trained in comparison to sedentary individuals [18]. Differently, we found a raised 5'-nucleotidase activity in blood serum of sedentary subjects, result not found in part of respectively work. About this distinct result, is important consider our bigger sample size about sedentary subjects and the intensity of exercise realized. They analyzed the blood serum after a maximal intensity exercise, and in the other hand, we submitted individuals to moderate intensity exercise.

Physical exercise could change NTPDase, 5'-nucleotidase and NPP activities in different situations and models. Roque et al., demonstrated, in normotensive male Wistar rats, that moderate aerobic training (10 weeks) increase NTPDase and 5'-nucleotidase activity in blood serum and cardiac sarcolemmal. In addition they showed an increased E-NTPDase1/CD39 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 expression in heart [13]. Cardoso et al., showed in a study with hypertensive rats submitted to aerobic moderate training (swimming training for 6 weeks), that ATP and ADP hydrolysis were increased after 6 weeks training in blood lymphocytes, similarly adenosine deaminase (ADA) activity was

also increased. In the same study, it was analyzed acute effects of this kind of exercise in blood lymphocytes and demonstrated a decreased in the ATP and ADP hydrolysis as well in ADA activity [32]. The effects of maximum acute aerobic exercise in E-NTPDase1/CD39 expression in platelets and B-lymphocyte were evaluated in active and sedentary individuals; and post-acute exercise in sedentary was significantly reduced, the expression of this enzyme were enhanced in B-lymphocyte [17].

Considering the importance of NTPDase and 5'-nucleotidase in modulation of biological process as inflammation and coagulation, some controlling mechanisms were suggested. First, high blood glucose level promotes increase in NTPDase and 5'-nucleotidase in platelet from healthy subjects. *In vitro* results showed that increasing in NTPDase and 5'-nucleotidase was directly and proportional with elevation of glucose and fructose concentrations. Besides, the same study demonstrated that in patients with diabetes type 2, E-NTPDase1/CD39 expression in platelets was higher in comparison to healthy subjects [33]. Hyperglycemic states, as diabetes type 1 and 2, promote an increased in activity in NTPDase, 5'-nucleotidase [34].

Another proposed mechanism to control nucleotidase activity is related to cholesterol levels. In cell culture, it was demonstrated that E-NTPDase1/CD39 is caveolae-localized. This structure is rich in cholesterol and sphingolipids, and it was suggested that levels of cholesterol in this structure could modulate E-NTPDase1/CD39 activity. This study demonstrated that higher levels of cholesterol resulting in increased activity of E-NTPDase1/CD39 [35]. Duarte et al., evaluated extracellular hydrolysis of ATP and ADP in platelets of patients with hypercholesterolemia, and showed revealed that patients with hypercholesterolemia have increased levels of ATP and ADP hydrolysis in platelets. Values above 151 mg/dL of blood serum cholesterol could change degradation of these nucleotides. Besides, a positive correlation was demonstrate between the TG blood serum levels in ATP and ADP hydrolysis in platelets [36]. The data of these two studies are in agreement with our results, considering that we observed significant higher levels of TC, LDL and TG levels post-exercise (Table 2), associated to elevated NTPDase, 5'-nucleotidase and NPP activities in sedentary individuals.

CK is a well-known biological marker of muscular tissue damage and the values are find to increase after exercise [37]. Increased CK values in blood serum of sedentary adult males post-acute aerobic exercise, in several intensities, is described, and these data are possibly related to an increase in the oxidative stress and lipid peroxidation [38]. Inflammatory responses are involved in exercise, increasing cytokine levels during and

after exercise. As example, after acute exercise there are increased in the levels of interleukin-1 (IL-1), IL-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Importantly, high levels of IL-6 after exercise are associated to muscular damage [39]. Our results showed significantly increase in CK levels after exercise (Table 2), demonstrating that exercise protocol was capable to cause muscular damage, triggering an inflammatory response. We hypothesize that the increase in NTPDase, 5'-nucleotidase and NPP activities may has occur to participate of modulation of inflammatory response activated by exercise, considering the importance of purinergic signaling in inflammatory modulation [40].

Through HPLC analysis, we can evaluate adenine nucleotides, nucleosides and other metabolites levels from ATP catabolism, after pre and post-aerobic moderate exercise in sedentary individuals. Our results demonstrated significant decrease in the levels of ATP and ADP post-exercise in blood serum of these individuals. AMP levels show a tendency to increase in blood serum post-exercise. ADO and INO blood serum levels, in contrast to ATP and ADP, significantly increase post-exercise (Fig. 2).

The modification in adenine nucleotides and nucleosides levels in blood serum, pre and post-exercise, reflect the enzymatic activity post-exercise. The raised levels of ATP and ADP hydrolysis is associated with decreased concentrations of these nucleotides in blood serum of sedentary men post-acute aerobic exercise. This condition can be justified for proinflammatory and prothrombotic conditions found after exercise [42, 43]. The participation of nucleotidase activities in the regulation of inflammation and coagulation conditions is notorious, mainly NTPDase1/CD39 activity of platelet, endothelial cells and also in soluble form, might be released in exosomes or microparticles from the blood cells [10, 44, 45]. Likewise, contributing to the reduced levels of ATP and ADP observed in our work, the NPP activity in blood serum was increased post-exercise. The activity of this enzyme is described in blood serum and was demonstrated that exercise could increase your activity [18].

Following to reduced levels of ATP and ADP, our results show an increase in ADO and INO post-exercise in blood serum of sedentary individuals. In conjunction with this result, an enhanced in AMP hydrolysis by 5'-nucleotidase was found. The antagonistic effects of ATP and ADO in inflammation is well known. ATP is broadly described as pro-inflammatory molecule, signaling tissue damage and hypoxia, in contrast ADO is related to anti-inflammatory, vasodilatation and cytoprotective effects [7]. Similarly, ADP and ADO has distinct effects in thrombus formation, ADO has competitive inhibitor effects in ADP induced platelet coagulation [45]. INO was first described as no biological

effects, however protective effects, attenuating pro-inflammatory actions, increasing coronary flow and possible inhibiting platelet aggregation is demonstrated nowadays [46, 47]. The increased levels of INO can be due to the raised activity of adenosine deaminase (ADA), considering that exercise could influence this enzymatic activity [32]. Interestingly, associate to elevated levels of the cytoprotective molecules ADO and INO, increased values of UA in blood serum of sedentary subjects are found. UA shows antioxidant properties, responsible for at least 60% of blood serum free radical scavenger capacity. Besides, UA administration is capable to improve endothelial function in patients with diabetes type 1 and smokers, additionally antioxidant properties was demonstrated post-exercise in healthy adults submitted to high intensity aerobic exercise [48, 49].

Pro-inflammatory and pro-thrombotic response post-acute aerobic exercise is recognize as aforementioned. Nucleotidasic activity of NTPDase1/CD39 (bound to cell membrane, soluble form or in microparticles/exosomes), NPP and 5'-nucleotidase, operate as modulator of both pathological conditions, modifying ATP, ADP, ADO and INO levels in blood serum of sedentary male individuals, trying to control inflammatory and thrombotic response triggered by acute physical exercise. In summary, here we show that the protocol of acute aerobic exercise in moderate intensity, may promote transitory biochemistry adaptations in purinergic signaling of sedentary individuals to compensate the exacerbation of inflammation and thrombotic condition produced by exercise, attempting to design a protective biological environment.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). C.E.J Moritz and L. Rockenbach were recipients of CAPES fellowships.



## References

- [1] M. L. Bruneau, B. T. Johnson, T. B. Huedo-Medina, K. a. Larson, G. I. Ash, and L. S. Pescatello, "The blood pressure response to acute and chronic aerobic exercise: A meta-analysis of candidate gene association studies," *J. Sci. Med. Sport*, 2015.
- [2] P. C. Dempsey, N. Owen, S. J. H. Biddle, and D. W. Dunstan, "Managing sedentary behavior to reduce the risk of diabetes and cardiovascular disease," *Curr. Diab. Rep.*, vol. 14, no. 9, 2014.
- [3] D. E. Rosenberg, J. Bellettiere, P. a. Gardiner, V. N. Villarreal, K. Crist, and J. Kerr, "Independent Associations Between Sedentary Behaviors and Mental, Cognitive, Physical, and Functional Health Among Older Adults in Retirement Communities," *Journals Gerontol. Med. Sci.*, p. glv103, 2015.
- [4] A. Martin, C. Fitzsimons, R. Jepson, D. H. Saunders, H. P. van der Ploeg, P. J. Teixeira, C. M. Gray, and N. Mutrie, "Interventions with potential to reduce sedentary time in adults: systematic review and meta-analysis," *Br. J. Sports Med.*, pp. 1056–1063, 2015.
- [5] World Health Organization, "Global recommendations on physical activity for health," *Geneva World Heal. Organ.*, p. 60, 2010.
- [6] G. Burnstock, "Purinergic signalling : past , present and future," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 42, pp. 3–8, 2009.
- [7] T. Eckle, T. Krahn, A. Grenz, D. Köhler, M. Mittelbronn, C. Ledent, M. a. Jacobson, H. Osswald, L. F. Thompson, K. Unertl, and H. K. Eltzschig, "Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors," *Circulation*, vol. 115, no. 12, pp. 1581–1590, 2007.
- [8] F. Di Virgilio, D. Ferrari, and E. Adinolfi, "P2X7: A growth-promoting receptor - Implications for cancer," *Purinergic Signal.*, vol. 5, no. 2, pp. 251–256, 2009.
- [9] B. Rücker, G. Abreu-Vieira, L. B. Bischoff, A. D. Harthmann, J. J. F. Sarkis, M. R. Wink, and E. a Casali, "The nucleotide hydrolysis is altered in blood serum of streptozotocin-induced diabetic rats.," *Arch. Physiol. Biochem.*, vol. 116, no. 2, pp. 79–87, 2010.
- [10] G. G. Yegutkin, "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, no. 5, pp. 673–694, 2008.

- [11] V. Ralevic and G. Burnstock, "Receptors for purines and pyrimidines.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 50, no. 3, pp. 413–492, 1998.
- [12] J. L. Greaney, M. M. Wenner, and W. B. Farquhar, "Exaggerated increases in blood pressure during isometric muscle contraction in hypertension: Role for purinergic receptors," *Auton. Neurosci.*, vol. 188, pp. 51–57, 2015.
- [13] F. R. Roque, U. P. R. Soci, K. De Angelis, M. a Coelho, C. R. Furstenau, D. V Vassallo, M. C. Irigoyen, and E. M. Oliveira, "Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats," *Clinics*, vol. 66, no. 12, pp. 2105–2111, 2011.
- [14] I. R. Siqueira, V. R. Elsner, L. S. Rilho, M. G. Bahlis, K. Bertoldi, J. R. Rozisky, A. M. O. Batastini, and I. L. da Silva Torres, "A neuroprotective exercise protocol reduces the adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes and serum of rats," *Brain Res.*, vol. 1316, pp. 173–180, 2010.
- [15] A. M. Cardoso, M. D. Bagatini, C. C. Martins, F. H. Abdalla, D. Zanini, R. Schmatz, J. Gutierrez, V. C. Pimentel, G. Thomé, C. A. M. Leal, J. M. Vieira, N. Stefanello, F. Da Silva Fiorin, J. Baldissareli, L. F. F. Royes, A. B. Klein, V. M. Morsch, and M. R. C. Schetinger, "Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 371, no. 1–2, pp. 147–156, 2012.
- [16] C. E. J. Moritz, G. Abreu-Vieira, C. Piroli, P. N. De Senna, V. V. Cardoso, M. R. Wink, Â. d'Avila Harthmann, B. Rücker, and E. A. Casali, "Physical training normalizes nucleotide hydrolysis and biochemical parameters in blood serum from streptozotocin-diabetic rats," *Arch. Physiol. Biochem.*, no. January, pp. 1–7, 2012.
- [17] A. Coppola, L. Coppola, L. dalla Mora, F. M. Limongelli, A. Grassia, L. Mastrolorenzo, G. Gombos, and G. Lucivero, "Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 98, no. 4, pp. 1414–1419, 2005.
- [18] G. G. Yegutkin, S. S. Samburski, S. P. Mortensen, S. Jalkanen, and J. González-Alonso, "Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans.," *J. Physiol.*, vol. 579, no. Pt 2, pp. 553–564, 2007.
- [19] E. von Elm, D. G. Altman, M. Egger, S. J. Pocock, P. C. Gøtzsche, and J. P. Vandenbroucke, "The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies," *Prev. Med. (Baltim.)*, vol. 45, no. 4, pp. 247–251, Oct. 2007.

- [20] C. D. Schneider, J. Barp, J. L. Ribeiro, A. Belló-Klein, and A. R. Oliveira, "Oxidative Stress After Three Different Intensities of Running," *Can. J. Appl. Physiol.*, vol. 30, no. 6, pp. 723–734, Dec. 2005.
- [21] a Lucía, J. Hoyos, M. Pérez, and J. L. Chicharro, "Heart rate and performance parameters in elite cyclists: a longitudinal study.," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 32, no. 10, pp. 1777–1782, 2000.
- [22] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [23] K. M. Chan, D. Delfert, and K. D. Junger, "A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> -stimulated ATPase activity.," *Anal. Biochem.*, vol. 157, no. 2, pp. 375–380, 1986.
- [24] H. Sakura, S. Nagashima, A. Nakashima, and M. Maeda, "Characterization of fetal serum 5'-nucleotide phosphodiesterase: A novel function as a platelet aggregation inhibitor in fetal circulation.," *Thromb. Res.*, vol. 91, no. 2, pp. 83–89, 1998.
- [25] W. Voelter, K. Zech, P. Arnold, and G. Ludwig, "Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 199, pp. 345–354, Oct. 1980.
- [26] L. A. Brocklebank, C. L. Falconer, A. S. Page, R. Perry, and A. R. Cooper, "Accelerometer-measured sedentary time and cardiometabolic biomarkers: A systematic review," *Prev. Med. (Baltim.)*, vol. 76, pp. 92–102, Jul. 2015.
- [27] J. E. Manson, P. J. Skerrett, P. Greenland, and T. B. VanItallie, "The Escalating Pandemics of Obesity and Sedentary Lifestyle," *Arch. Intern. Med.*, vol. 164, no. 3, p. 249, Feb. 2004.
- [28] C. H. Lin, S. L. Chiang, W. C. Tzeng, and L. C. Chiang, "Systematic review of impact of lifestyle-modification programs on metabolic risks and patient-reported outcomes in adults with metabolic syndrome," *Worldviews Evid Based Nurs*, vol. 11, no. 6, pp. 361–368, 2014.
- [29] I. Heinonen, K. K. Kalliokoski, J. C. Hannukainen, D. J. Duncker, P. Nuutila, and J. Knuuti, "Organ-Specific Physiological Responses to Acute Physical Exercise and Long-Term Training in Humans," *Physiology*, vol. 29, no. 6, pp. 421–436, 2014.

- [30] G. Lippi and N. Maffulli, "Biological influence of physical exercise on hemostasis," *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 35, no. 3, pp. 269–276, 2009.
- [31] N. Mathur and B. K. Pedersen, "Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation," *Mediators Inflamm.*, vol. 2008, 2008.
- [32] A. M. Cardoso, F. H. Abdalla, M. D. Bagatini, C. C. Martins, D. Zanini, R. Schmatz, J. A. Jaques, D. B. R. Leal, V. M. Morsch, and M. R. C. Schetinger, "Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats," *J. Hypertens.*, vol. 33, no. 4, pp. 763–772, 2015.
- [33] G. I. Lunkes, D. S. Lunkes, D. Leal, M. D. C. Araújo, M. Corrêa, L. Becker, C. S. Da Rosa, V. M. Morsch, and M. R. C. Schetinger, "Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 81, no. 3, pp. 351–357, 2008.
- [34] G. I. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V. M. Morsch, C. M. Mazzanti, and M. R. C. Schetinger, "Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies," *Thromb. Res.*, vol. 109, no. 4, pp. 189–194, 2003.
- [35] A. Papanikolaou, "Cholesterol-dependent Lipid Assemblies Regulate the Activity of the Ecto-nucleotidase CD39," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, pp. 26406–26414, 2005.
- [36] M. Medeiros Frescura Duarte, V. L. Loro, J. B. T. Rocha, D. B. R. Leal, A. F. De Bem, A. Dorneles, V. M. Morsch, and M. R. C. Schetinger, "Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes," *FEBS J.*, vol. 274, no. 11, pp. 2707–2714, 2007.
- [37] A. J. Koch, R. Pereira, and M. Machado, "The creatine kinase response to resistance exercise.," *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 14, no. 1, pp. 68–77, 2014.
- [38] L.-Y. K. Daruosh Moflehi Tengku-Fadilah, Saidon Amri, "Effect of Single-Session Aerobic Exercise with Varying Intensities on Lipid Peroxidation and Muscle-Damage Markers in Sedentary Males ," *Heal. Sci.*, vol. 4, no. 4, pp. 48–54, 2012.
- [39] B. K. Pedersen and L. Hoffman-goetz, "Exercise and the Immune System: Regulation , Integration , and Adaptation IMMUNE SYSTEM," *Physiol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 1055–1081, 2000.

- [40] F. Di Virgilio and M. Vuerich, "Purinergic signaling in the immune system," *Auton. Neurosci.*, vol. 191, pp. 117–123, 2015.
- [41] F. Mooren, A. Lechtermann, M. Fobker, B. Brandt, C. Sorg, K. Völker, and W. Nacken, "The Response of the Novel Pro-Inflammatory Molecules S100A8/A9 to Exercise," *Int. J. Sports Med.*, vol. 27, no. 9, pp. 751–758, 2006.
- [42] G. Thrall, "Exercise and the Prothrombotic State: A Paradox of Cardiovascular Prevention or an Enhanced Prothrombotic State?," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 2, pp. 265–266, Nov. 2004.
- [43] A. V Birk, M. J. Broekman, E. M. Gladek, H. D. Robertson, J. H. F. Drosopoulos, A. J. Marcus, and H. H. Szeto, "Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity.," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 140, no. 3, pp. 166–175, 2002.
- [44] Z. G. Jiang, Y. Wu, E. Csizmadia, L. Feldbrügge, K. Enjyoji, J. Tigges, V. Toxavidis, H. Stephan, C. E. Müller, C. J. McKnight, A. Moss, and S. C. Robson, "Characterization of circulating microparticle-associated CD39 family ectonucleotidases in human plasma," *Purinergic Signal.*, vol. 10, no. 4, pp. 611–618, 2014.
- [45] G. Burnstock, "Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling," *Purinergic Signal.*, Aug. 2015.
- [46] G. Haskó, M. V. Sitkovsky, and C. Szabó, "Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 25, no. 3, pp. 152–157, 2004.
- [47] G. Hsiao, "Protective Mechanisms of Inosine in Platelet Activation and Cerebral Ischemic Damage," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 9, pp. 1998–2004, 2005.
- [48] W. S. Waring, J. a Mcknight, D. J. Webb, and S. R. J. Maxwell, "Uric Acid Restores Endothelial Function in Patients With Type 1 Diabetes and Regular Smokers," vol. 55, no. November, pp. 3127–3132, 2006.
- [49] W. S. Waring, A. Convery, V. Mishra, A. Shenkin, D. J. Webb, and s. R. J. Maxwell, "Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults," *Clin. Sci.*, vol. 105, no. 4, pp. 425–430, Oct. 2003.

## Annexes

### Table 1

**Table 1** Baseline characteristics of sedentary subjects participants

Variable	
n	10
Age (years)	25.30 ± 2.94
Body Mass (Kg)	81.51 ± 13.43
Height (m)	1.78 ± 0.02
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25.59 ± 3.44
Systolic BP pre-exercise (mmHg)	125.2 ± 11.84
Diastolic BP pre-exercise (mmHg)	79 ± 9.41
Systolic BP post-exercise (mmHg)	141.5 ± 5.52
Diastolic BP post-exercise (mmHg)	86.3 ± 7.87
HR (beats/min)	82.5 ± 2.3
MHR (beats/min)	189.7 ± 8.82
VO <sub>2MAX</sub> (mL/kg/min)	31.38 ± 7.69

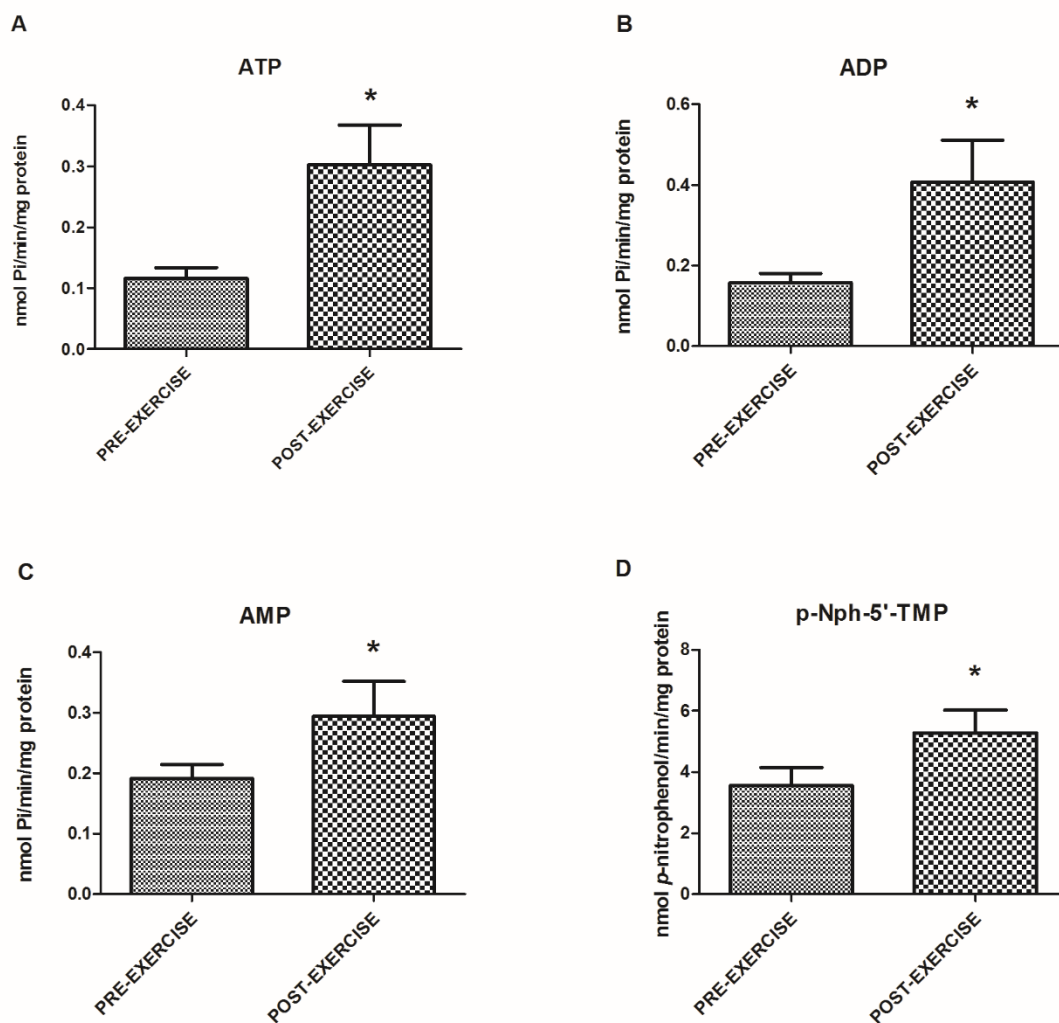
Body mass Index (BMI); blood pressure (BP); hearth rate (HR); maximum heart rate (MHR); maximum oxygen uptake (VO<sub>2MAX</sub>). Values are presented as mean ± SD.

### Table 2

**Table 2** Blood serum biochemistry pre and post-exercise

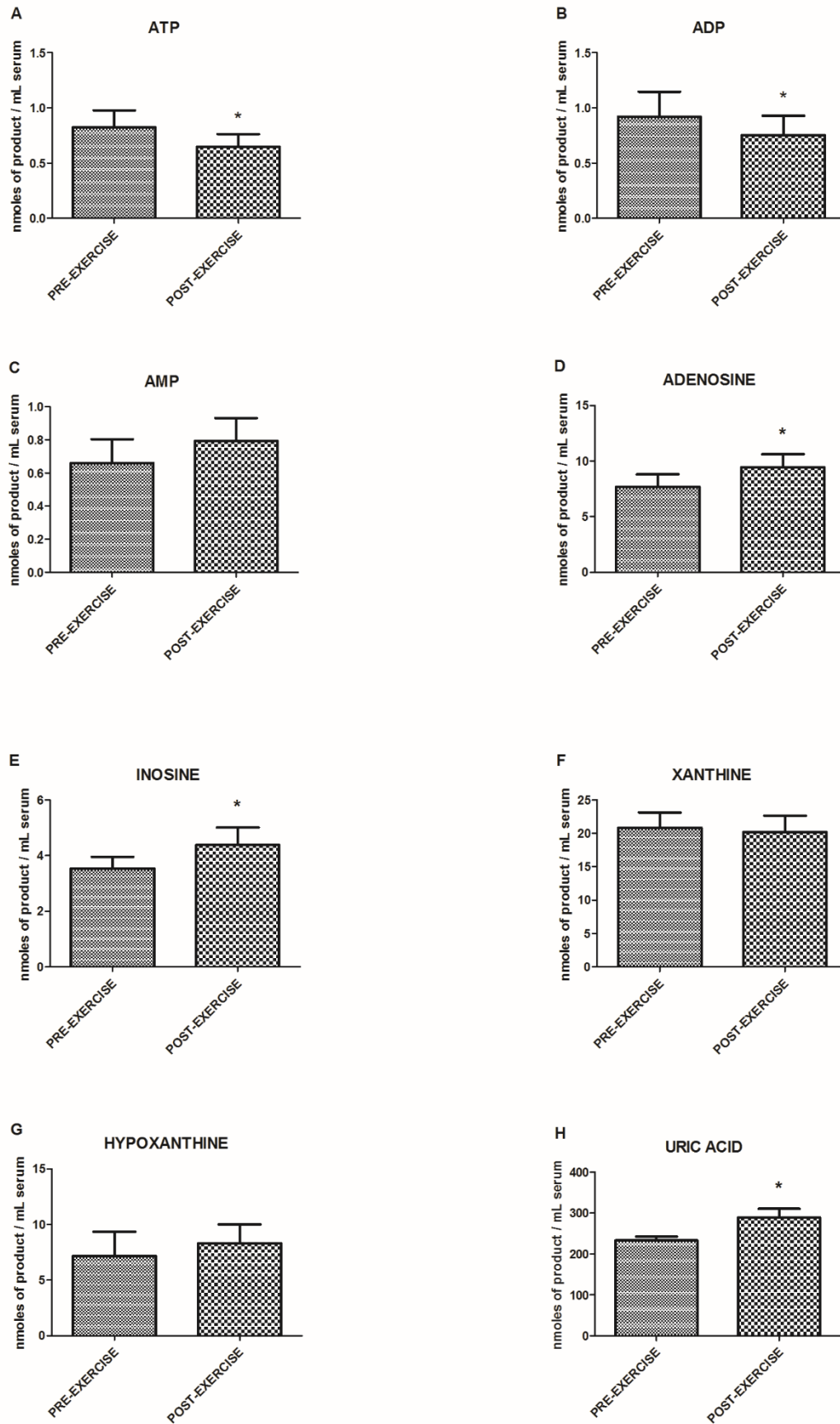
	Pre-exercise	Post-exercise
Glycemia (mg/dL)	85.3 ± 1.89	88.9 ± 3.96
CK (U/L)	189.9 ± 30.06	222 ± 34.21*
Total cholesterol (mg/dL)	181 ± 8.03	187.8 ± 8.08*
Creatinine (mg/dL)	0.85 ± 0.03	0.90 ± 0.03
HDL(mg/dL)	46.33 ± 2.22	47.4 ± 2.20
LDL (mg/dL)	95.7 ± 4.78	99.4 ± 4.52*
Triglycerides (mg/dL)	129.8 ± 28.13	143.1 ± 29.58*

Creatine kinase (CK); high-density lipoprotein (HDL); low-density lipoprotein (LDL). Values are presented as mean ± SEM. \*Indicate difference from pre-exercise ( $p < 0.05$ ).

**Figure 1**

**Fig. 1** (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP and (d) *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis in blood serum of sedentary male individuals pre and post an acute protocol of aerobic exercise. Data are presented in mean  $\pm$  S.E.M. \*Indicate difference from pre-exercise ( $p < 0.05$ ).

Figure 2





**Fig. 2** Blood serum levels of (a) ATP, (b) ADP, (c) AMP, (d) adenosine (ADO), (e) inosine (INO), (f) xanthine (XANT), (g) hypoxanthine (HYPO) and (h) uric acid (UA) from blood serum of sedentary male individuals comparing pre and post-exercise. Data are presented in mean  $\pm$  S.E.M. \*Indicate difference from pre-exercise ( $p < 0.05$ ).

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo analisar e avaliar a hidrólise extracelular de ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'-TMP no soro de indivíduos adultos sedentários, pré e pós-exercício aeróbico agudo de intensidade moderada. Associadamente, os níveis dos nucleotídeos, nucleosídeos da adenina e outros resíduos metabólicos provenientes da hidrólise do ATP foram quantificados pré e pós-exercício.

Nossos resultados demonstram um aumento na hidrólise de ATP, ADP, AMP e *p*-Nph-5'-TMP pós-exercício aeróbico de intensidade moderada no soro de indivíduos sedentários, sugerindo a influência do exercício agudo no comportamento das nucleotidases. Acompanhando as alterações nas atividades enzimáticas pós-exercício, os níveis dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina também foram modificados. As concentrações de ATP e ADP foram reduzidas pós-exercício, em contrapartida, os níveis pós-exercício de ADO, INO e AU foram aumentados.

Os resultados supracitados sugerem uma influência do exercício aeróbico moderado agudo na atividade das nucleotidases, possivelmente gerando uma adaptação bioquímica transitória no comportamento dessas enzimas, alterando os níveis extracelulares nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, na tentativa de gerar um ambiente citoprotetor.

O presente estudo produziu resultados importantes, colaborando no melhor entendimento relacionado à bioquímica do exercício físico e a participação da sinalização purinérgica nesse processo. Futuros trabalhos relacionados a sinalização purinérgica e ao exercício físico, são necessários para proporcionar um melhor entendimento bioquímico sobre a atividade das nucleotidases no exercício físico em humanos, considerando a escassez de trabalhos na literatura sobre esses temas, podendo no futuro proporcionar melhores terapias não-farmacológicas na prevenção e tratamento de doenças crônicas.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

O melhor entendimento da sinalização purinérgica e a influência do exercício físico nesse sistema bioquímico contribui para diferentes áreas das ciências da saúde, assim novos estudos são necessários. Futuros trabalhos devem incluir a pesquisa sobre a identificação de quais enzimas participam da hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina no soro e no plasma sanguíneo. Devemos considerar a importância de definir em que forma essas enzimas estão sendo liberadas, já que classicamente são descritas no sangue em forma solúvel, no entanto, sabe-se que essas enzimas podem ser liberadas por meio de microvesículas e/ou exossomos. A identificação da presença das nucleotidases em microvesículas e/ou exossomos nos instiga a buscar a possível influência do exercício físico na liberação e comportamento desses componentes.

## 10 ANEXOS

### 10.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Esta é uma pesquisa para identificar os efeitos do treinamento físico aeróbico moderado na atividade de enzimas que hidrolisam o ATP no soro sanguíneo de adultos jovens sedentários. Para que haja sua participação no estudo você deve ler com atenção esse documento, observando as explicações a seguir sobre os procedimentos que irão ser realizados, tendo a total liberdade de negar caso não concorde com uma ou mais situações do projeto.

Nesta pesquisa você passará por uma entrevista de aproximadamente 30 minutos com um dos membros responsáveis pelo estudo, onde você deverá responder a perguntas sobre condições suas condições de saúde em geral. Será também realizado um exame de sangue para fazermos a análise de alguns indicadores sanguíneos (colesterol, triglicerídeos, glicose e nucleotídeos).

Esse projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico agudo de intensidade moderada na atividade de enzimas que hidrolisam o ATP atuando em compostos específicos de diversos tecidos corporais, no caso desse estudo, no soro que é uma porção do sangue.

Justifica-se sua realização para entendermos melhor o comportamento dessas enzimas em humanos e sua atuação em processos de manutenção da saúde e no desenvolvimento de doenças, adicionalmente a influência do exercício físico no comportamento dessas enzimas. Ou seja, esse estudo não trará benefícios diretos para você, mas você estará colaborando para que, ao entendermos melhor a função biológica dessas enzimas e as possíveis influências do exercício nelas, para que possamos estabelecer melhores tratamentos no futuro para outras pessoas portadoras de diferentes doenças.

Sua participação consiste em responder ao questionário, realizar a coleta de sangue, fazer uma avaliação física e um protocolo de exercício físicos pré-estabelecido em esteira rolante. Não há riscos à saúde física ou mental em responder aos questionários, mas você deverá estar disposto a gastar cerca de 30 minutos respondendo às questões e na avaliação física. A identificação dos questionários com o nome do paciente e o endereço visa, caso necessário, verificar ou complementar informações para a pesquisa, além de facilitar o encaminhamento a especialistas caso ocorra a necessidade. A coleta de sangue pode causar algum desconforto no momento da picada da agulha. O local será devidamente coberto com um curativo. O sangue retirado será congelado e guardado para posterior análise.

O protocolo de exercício físico que irá compor a sessão aguda de treinamento será realizado de forma gradual e adequado a sua capacidade individual. Dessa forma, você realizará testes físicos para que sejam avaliadas suas condições cardíacas e respiratórias previamente a realização protocolo de exercício.

Os pesquisadores comprometem-se a acompanhar o andamento de sua participação e prestar eventuais informações a qualquer momento do estudo. Também se comprometem, caso houver uma nova informação que altere o que foi previsto durante a obtenção deste consentimento informado, avisar imediatamente aos participantes do estudo e o Comitê de Ética, providenciando uma nova versão deste termo de consentimento.

Qualquer dúvida ou dificuldade você pode entrar em contato com a pesquisadora responsável Ana Maria Battastini, ou com os demais Cesar Eduardo Jacintho Moritz ou Emerson André Casali pelos telefones (51) 9254-7039 ou (51) 3308-5535.

Fica desde já comunicado o caráter confidencial destas informações, ou seja, seu nome não será divulgado em momento algum. Todas as informações serão utilizadas apenas para este estudo.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, e que esta pesquisa não me trará benefícios diretos. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações, obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa face a estas informações, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento.

Este termo de consentimento livre e esclarecido deverá ser preenchido em duas vias, sendo uma mantida com o participante da pesquisa e outra arquivada pelo pesquisador.

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

## 10.2 QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA ATIVIDADE FÍSICA (PAR-Q)

### PAR-Q: QUESTIONÁRIO SOBRE PRONTIDÃO PARA ATIVIDADE FÍSICA

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

O PAR-Q é designado para ajudar você a ajudar a si mesmo. Muitos benefícios de saúde estão associados ao exercício regular, e o preenchimento do PAR-Q é um primeiro passo sensível a ser dado se você está planejando aumentar a quantidade de atividade física em sua vida.

Para muitas pessoas, a atividade física não deve representar qualquer problema ou risco. O PAR-Q tem sido designado para identificar o pequeno número de adultos para quem a atividade física pode ser imprópria ou para aqueles que devem receber orientação médica sobre o tipo de atividade mais adequada para o seu caso.

O bom senso é o seu melhor guia para responder a estas perguntas. Leia-as cuidadosamente e marque (✓) no  SIM ou  NÃO ao lado da questão, dependendo se ela se aplica a você.

#### **SIM NÃO**

- |                          |                          |   |
|--------------------------|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 1. Seu médico alguma vez já lhe disse que você tem problema cardíaco?   |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 2. Você sente freqüentemente dores no coração ou no peito?  |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 3. Você muitas vezes se sente fraco ou tem fortes episódios de tontura?   |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 4. Algum médico já lhe disse que sua pressão arterial estava muita alta?  |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 5. Seu médico alguma vez já lhe disse que você tem um problema ósseo ou articular tal como artrite que tenha sido agravado por exercício ou possa piorar com exercício? |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 6. Há uma boa razão física não mencionada aqui pela qual você não deva seguir um programa de atividade mesmo que quisesse?  |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | 7. Você tem mais de 65 anos e não está acostumado com exercício vigoroso?   |

## 10.3 FICHA DE AVALIAÇÃO INDIVIDUAL

**Ficha de Avaliação Individual – Anamnese**

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

**Dado de Identificação:**Nome: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Telefones para contato: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

**História patológica pregressa:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_**Hábitos de vida:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

<b>Massa corporal</b>	
<b>Estatura</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Circunferência abdominal</b>	
<b>Glicemia capilar</b>	
<b>Pressão arterial</b>	

**Medicamentos / Suplementos alimentares:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Teste de VO<sub>2</sub>máx:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

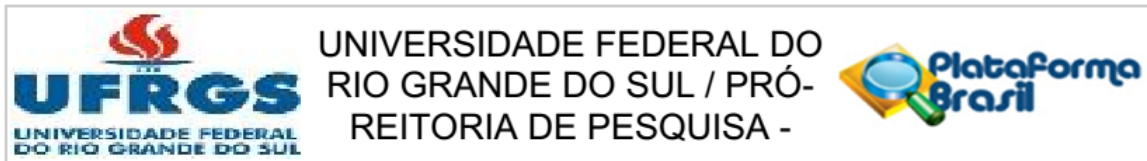
**Observações:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## 10.4 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DA HIDRÓLISE EXTRACELULAR DOS NUCLEOTÍDEOS DA ADENINA EM SORO DE INDIVÍDUOS ADULTOS SEDENTÁRIOS DO SEXO MASCULINO SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO

**Pesquisador:** Ana Maria Oliveira Battastini

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 32622514.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

**Patrocinador Principal:** CNPQ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 760.528

**Data da Relatoria:** 21/08/2014

**Apresentação do Projeto:**

Análise da hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina em soro de indivíduos adultos sedentários do sexo masculino submetidos ao exercício físico agudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral deste estudo é analisar e caracterizar a hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina em soro de indivíduos adultos do sexo masculino submetidos a uma sessão aguda de exercício aeróbico moderado.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos e relacionados a realização de exercícios físico em voluntários jovens e saudáveis. Os benefícios serão uma melhor compreensão da fisiologia do exercício ao nível molecular. Os riscos e benefícios são apresentados pelos autores do projeto.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa acadêmica associada ao programa de mestrado do PPGCM UFRGS.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos necessários foram anexados a essa submissão, que está completa.

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 760.528

**Recomendações:**

Os autores realizaram todas as modificações solicitadas na avaliação anterior, melhorando o TCLE e aspectos do projeto. Sendo assim, recomendo aprovação deste projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências foram adequadamente resolvidas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Encaminhe-se parecer em anexo.

PORTO ALEGRE, 21 de Agosto de 2014

---

**Assinado por:**  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

## 10.5 STROBE (*STRENGTHENING THE REPORTING OF OBSERVATIONAL STUDIES IN EPIDEMIOLOGY*) – CHECKLIST PARA ESTUDOS TRANSVERSAIS

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	<b>Item No</b>	<b>Recommendation</b>
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
<b>Methods</b>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses
<b>Results</b>		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses

<b>Discussion</b>		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
<b>Other information</b>		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

\*Give information separately for exposed and unexposed groups.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).