

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

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE
ENZIMAS DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM
SANGUE DE RATOS HIPERTENSOS**

TESE DE DOUTORADO

ANDRÉIA MACHADO CARDOSO

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE
ENZIMAS DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM
SANGUE DE RATOS HIPERTENSOS**

por

Andréia Machado Cardoso

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

**Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-orientadora: Margarete Dulce Bagatini**

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2014

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE
ENZIMAS DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM
SANGUE DE RATOS HIPERTENSOS**

elaborada por

Andréia Machado Cardoso

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger
(Presidente/Orientador)

Prof^ª Dra Rosélia Maria Spanevello

Prof^ª Dra Elizandra Braganhol

Prof^ª Dra Michele Rechia Fighera

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Santa Maria, 29 de agosto de 2014

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve...”

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Jaime e Laís

Ao meu irmão: Maurício

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais, Jaime e Lais, por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida, participando de minhas decisões, me apoiando, me compreendendo e confiando em meu potencial; pela educação que me concederam. Agradeço aos melhores pais, aos quais tenho um orgulho imenso e uma admiração infinita. Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, Maurício, por todos os momentos de alegrias que me proporcionaram, transformando momentos simples em inesquecíveis; por todo o amor e carinho que sempre me concederam, enfim, por tudo.

À professora Maria Rosa, minha orientadora, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos, atenção e dedicação; a minha eterna gratidão.

A minha co-orientadora, Margarete, a qual dispensei algumas formalidades, pois bem mais do que orientadora, é uma amiga que sempre esteve disposta a me ajudar. Agradeço por todo o apoio e atenção que sempre dedicou a mim, pela paciência, por confiar em mim, por todos os ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho e, principalmente, pela amizade eterna.

À Université Laval e ao Professor Jean Sévigny pela oportunidade ímpar de ter feito parte do “Time do Jean”, no qual fui muito bem recebida, aprendi muito e continuo aprendendo. Período que me propiciou crescer muito como pessoa e como pesquisadora.

Aos amigos de Québec, que fizeram dos meus dias sob a neve, os melhores que alguém pode ter!

À minha amiga e afilhada Carol, pelo companheirismo e dedicação durante este trabalho e, principalmente, pela amizade eterna.

Aos membros da banca examinadora desta tese, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o aprimoramento do mesmo.

Aos amigos e colegas do Laboratório 2208, Fátima, Aline, Daniela, Roberta, Eduardo, Pauline, Victor, Naiara, Jucimara, Luciane, Juliano, Javed, Gustavo, Luana, Diéssica, Fábio, Jessié,... pelos momentos compartilhados e pela amizade durante o período de convívio.

Ao professor Luiz Fernando e aos membros do Laboratório de Bioquímica do Exercício, pela colaboração durante a realização deste trabalho, através do empréstimo dos tanques e auxílio durante as sessões de natação.

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

À CAPES, pela bolsa concedida e pela oportunidade de realizar uma parte do trabalho no exterior.

Ao meu namorado, Gabriel, por sempre ser muito compreensivo e demonstrar total apoio com relação a minha carreira acadêmica. Agradeço também pelos momentos felizes regados de muito amor que estamos vivenciando juntos.

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

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

RESUMO

Tese de Doutorado

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

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DOS SISTEMAS PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM SANGUE DE RATOS HIPERTENSOS

AUTORA: ANDRÉIA MACHADO CARDOSO

ORIENTADORA: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

CO-ORIENTADORA: MARGARETE DULCE BAGATINI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2014.

A hipertensão é uma condição clínica multifatorial que, na maioria dos casos, está acompanhada de um quadro inflamatório de baixo grau e alterações nas funções plaquetárias. Essas modificações podem estar relacionadas a um desequilíbrio na regulação dos níveis de nucleotídeos de adenina (ADP, ADP e AMP), da adenosina e da molécula acetilcolinesterase (ACh), que é realizada pelas enzimas do sistemas purinérgico [NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA)] e colinérgico [Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BuChE)] presentes no sangue, respectivamente. A atividade dessas enzimas pode ser modulada pela prática regular de exercícios físicos, a qual tem sido recomendada para o tratamento da hipertensão. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito de seis semanas de natação sobre a pressão arterial, a atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico em sangue, bem como sobre a agregação plaquetária e marcadores inflamatórios clássicos em ratos com hipertensão induzida através de administração de metila N ω -Nitro-L-arginina cloridrato de éster (L-NAME). Com o objetivo de melhor compreender as alterações crônicas, avaliou-se, também, o efeito de uma única sessão aguda de exercício sobre a atividade das enzimas já mencionadas. Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 10): Controle, Exercício, L-NAME e L-NAME Exercício. Após 60 dias de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia e as plaquetas, os linfócitos, o sangue total e o soro foram usados para as determinações experimentais. Os resultados obtidos mostraram que o treinamento com natação foi capaz de reduzir a pressão sanguínea em ratos hipertensos, além de prevenir o aumento da atividade das enzimas NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA em linfócitos e plaquetas, o que provavelmente contribuiu para prevenir a agregação plaquetária. Cronicamente, a natação também foi eficaz na prevenção do aumento da atividade das enzimas AChE em linfócitos e sangue total e BuChE em soro. Com relação à expressão da NPTDase1, o exercício *per se* gerou a redução da expressão desta enzima, mas não apresentou efeitos significativos nos ratos hipertensos. A prevenção do aumento dos níveis de colesterol, triglicerídeos, proteína C-reativa e mieloperoxidase gerada pela prática da natação reforça o fato de que o exercício reduziu a inflamação em ratos hipertensos. Como resposta a uma única sessão aguda de exercício, verificou-se o aumento da atividade das enzimas dos sistemas colinérgico em sangue total, linfócitos e soro e do

sistema purinérgico em plaquetas. Entretanto, ocorreu a diminuição da atividade da NTPDase e da ADA em linfócitos. Pode-se concluir que este estudo permitiu desvendar em parte os mecanismos relacionados aos processos protetores advindos da prática regular de exercício físicos na hipertensão relativos aos processos inflamatórios e à agregação plaquetária. Os resultados ainda reforçam a importância da dosagem das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico como parâmetros da resposta inflamatória. Conclui-se, também, que a prática regular de exercício físico possui efeitos antitrombóticos e anti-inflamatórios através da modulação da atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico na hipertensão. Sugere-se que estas respostas tenham sido provenientes das adaptações ocorridas no organismo decorrentes de cada estímulo agudo, que gerou estímulos suficientes para quebrar a homeostase do organismo e promover adaptações benéficas. Desta forma, o exercício físico aeróbico moderado possui um papel fundamental na atuação como coadjuvante no tratamento da hipertensão.

Palavras-chave: hipertensão, ectonucleotidases, colinesterases, ratos, sangue, L-NAME, pressão arterial, resposta inflamatória, agregação plaquetária.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

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

EFFECTS OF PHYSICAL TRAINING ON PURINERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEM ENZYMES ACTIVITIES IN BLOOD OF HIPERTENSIVE RATS

AUTOR: ANDRÉIA MACHADO CARDOSO

ADVISOR: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

CO-ADVISOR: MARGARETE DULCE BAGATINI

Place and date of defense: Santa Maria, august 29th, 2014.

Hypertension is a multifactor clinical condition, which is accompanied by a low-grade inflammation and alterations in platelet function. These modifications may be related to an imbalance in the regulation of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP), adenosine and acetylcholine (ACh) levels. This regulation is performed by purinergic [NTPDases, ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA)] and cholinergic [Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE)] system enzymes, present in blood, respectively. These enzymes can be modulated by regular practice of physical exercise, which has been recommended for the treatment of hypertension. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of six swimming training weeks on blood pressure, on purinergic and cholinergic systems enzymes activities in blood as well as on platelet aggregation and classic inflammatory markers in rats with hypertension induced by methyl N ω -nitro-L-arginine ester hydrochloride (L-NAME) administration. In order to better understand chronic changes, we also evaluated the effect of a single acute bout of exercise on the activity of the enzymes already mentioned. The animals were divided into four groups (n = 10): control, exercise, L-NAME and exercise L-NAME. After 60 days of treatment, animals were euthanized and platelets, lymphocytes, whole blood and serum were used for experimental determinations. The results showed that swimming training was able to reduce blood pressure in hypertensive rats, and to prevent the increase in NTPDase, ecto-5'-nucleotidase and ADA activities in lymphocytes and platelets. This probably contributed in preventing platelet aggregation. Chronically, swimming was also effective in preventing the increase in AChE (in lymphocytes and whole blood) and BuChE (in serum) activities. Regarding to the expression of NTPDase1, exercise *per se* triggered a reduction in the expression of this enzyme, but had no significant effects in hypertensive rats. The prevention of the increase in cholesterol, triglycerides, C-reactive protein levels and myeloperoxidase activity generated by swimming practice reinforces the fact that exercise reduced inflammation in hypertensive rats. In response to a single acute bout of exercise, was observed an increase in the activity of cholinergic system enzymes in whole blood, lymphocytes and serum, and purinergic system enzymes in platelets. However, there was a decrease in the activity of NTPDase and ADA in lymphocytes. It can be concluded that this study allowed us to unveil, in part, the mechanisms related to the protective processes arising from regular physical exercise on hypertension related to inflammation and platelet aggregation. The results also reinforce the

importance of measuring the purinergic and cholinergic systems enzymes as parameters of inflammatory response. Also, it is concluded that regular physical exercise has antithrombotic and anti-inflammatory effects by modulating the activity purinergic and cholinergic systems enzymes in hypertension. It is suggested that these responses have been derived from the adaptations that occur in the body due to each acute stimulus that promotes enough impact to break homeostasis and promote beneficial adaptations. Thus, moderate aerobic exercise has a key role in acting as an adjuvant in the treatment of hypertension.

Keywords: hypertension, ectonucleotidases, cholinesterases, rats, blood, L-NAME, blood pressure, inflammatory response, platelet aggregation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Quadro 1** - Classificação da determinação do nível de hipertensão de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBC, 2010)..... 22
- Quadro 2** - Classificação da determinação do nível de hipertensão de acordo com o American Heart Association (2004). 22
- Figura 1** - Mecanismo de vasodilatação mediado pelo ON. 25
- Figura 2** - Membros da família NTPDase. 34
- Figura 3** - Cascata de ectoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina e adenosina. 36
- Figura 4** - Visão geral e simplificada sobre a sinalização gerada pelo ADP e pelo ATP nas plaquetas. 38
- Figura 5** - Vias de sinalização muscarínicas na vasculatura 43
- Figura 6** - Digrama esquemático ilustrando como o ATP derivado dos eritrócitos contribui para o suprimento de O₂ às células musculares ativas. 50
- Figura 7** - Desenho esquemático da ação do ATP, da adenosina e da ACh sobre seus respectivos receptores nas células endoteliais..... 51

ARTIGO 1

- Figura 8**- Final systolic blood pressure (SBP) measurements of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group.....62
- Figura 9** – (a) NTPDase (ATP), (b) NTPDase (ADP) and c ecto-5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. d Ecto-5'-nucleotidase (AMP), NTPDases (ATP and ADP) activities in platelets of rats at rest and after an acute bout of exercise.....63
- Figura 10** - (a) Adenosine deaminase (ADA) activity in platelets of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. (b) Adenosine deaminase (ADA) activity in platelets of rats at rest and after an acute bout of

exercise.....64

Figura 11 – (a) E-NPP activity in platelets of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. (b) E-NPP activity in platelets of rats at rest and after an acute bout of exercise.....64

Figura 12 - Platelet aggregation profile of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. Platelet aggregation was evaluated by using ADP at concentrations of 5 and 10 μ M as agonist.....65

MANUSCRITO

Figura 13 - (A) ecto-NTPDase (hydrolyzing ATP) and (B) ecto-NTPDase (hydrolyzing ADP) activity in lymphocytes of Control group, Exercise group, L-NAME group and Exercise L-NAME group. (C) Expression of ecto-NTPDase1 protein in lymphocytes of Control group, Exercise group, L-NAME group and Exercise L-NAME group. (D) ecto-NTPDase (hydrolyzing ATP and ADP) activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise (E) Pearson's Correlation between ecto-NTPDase (ATP) activity and Systolic Blood Pressure ($r=-0.7923$, $P < 0.05$). (F) Pearson's Correlation between ecto-NTPDase (ADP) activity and Systolic Blood Pressure ($r=-0.7884$, $P < 0.05$).....94

Figure 14. (A) Adenosine deaminase (ADA) activity in lymphocytes of Control group, Exercise group, L-NAME group and Exercise L-NAME group. (B) ADA activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise. (C) Pearson's Correlation between ADA activity and Systolic Blood Pressure ($r=-0.5555$, $P < 0.05$).....98

ARTIGO 2

Figura 15 - Acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes. (a) AChE activity in lymphocytes of Control group, Exercise group, N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) group, and Exercise L-NAME group. (b) AChE activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise. (c) Pearson correlation between AChE activity and systolic blood pressure ($r = 0.5721$; $P < 0.05$).....104

Figura 16 - Acetylcholinesterase (AChE) activity in whole blood. (a) AChE activity in whole blood of Control group, Exercise group, N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) group, and Exercise L-NAME group. (b) AChE activity in whole blood of rats at rest and after an acute bout of exercise. (c) Pearson

correlation between AChE activity and systolic blood pressure ($r = 0.6121$; $P < 0.05$).....105

Figura 17 - Butyrylcholinesterase (BuChE) Activity in serum. (a) BuChE activity in serum of Control group, Exercise group, N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) group, and Exercise L-NAME group. (b) BuChE activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise. (c) Pearson correlation between BuChE activity and systolic blood pressure ($r = 0.5811$; $P < 0.05$).....106

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Agonistas do sistema purinérgico e seus respectivos receptores.....32

ARTIGO 1

Tabela 2 - Swimming protocol, with training time from 1st to 6th week, held from Monday to Friday.....60

Tabela 3- Heart rate values of control group, exercise control group, L-NAME group, and exercise L-NAME group.....62

MANUSCRITO

Tabela 4- Lipid profile and inflammatory markers of Control, Exercise, L-NAME and Exercise L-NAME groups.....91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ac E** – Ácidos Eicosatrienóicos
- ACh** – Acetilcolina
- AChE** – Acetilcolinesterase
- ADA** – Adenosina Desaminase
- ADP** – Difosfato de Adenosina 5
- AMP** – Monofosfato de Adenosina 5'
- AMPc** – Monofosfato de Adenosina- 3',5' -cíclico
- ATP** – Trifosfato de Adenosina 5'
- BuChE** – Butirilcolinesterase
- CAMKII** - Cinase dependente de calmodulina e Ca^{2+}
- cNOS** – Óxido Nítrico sintase constitutiva
- DCV** – Doenças Cardiovasculares
- EDHF** - Fator hiperpolarizador derivado do endotélio
- eNOS** – Óxido Nítrico sintase endotelial
- E-NPP** – Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
- EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio
- FR** – Fatores de Risco
- cGMP** – Monofosfato de Guanosina-3',5'-cíclico
- HAS** - Hipertensão Arterial Sistêmica
- HDL** – Lipoproteína de alta densidade
- IL-1** – Interleucina 1
- IL-10** – Interleucina 10
- IL-17** - Interleucina 17
- IL-6** – Interleucina 6
- IMC** – Índice de Massa Corporal
- IP₃** - Inositol-1,4,5- trifosfato
- IP₃R** - Receptor de Inositol-1,4,5- trifosfato
- L-NAME**- metila N ω -Nitro-L-arginina cloridrato de éster
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade
- MPO** – Mieloperoxidase
- NADPH** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma reduzida)
- ON** – Óxido Nítrico

PA – Pressão Arterial

NF-κB - Fator Nuclear Kappa-B

NTPDase – Ectonucleosídeo trifosfato-difosfodrolase

PA – Pressão arterial

PCR – Proteína C-Reativa

PKG - Proteína-cinase G

PNP – Purina nucleosídeo fosforilase

SOD – Superóxido Dismutase

TNF-α – Fator de necrose tumoral α

Treg – T regulatórias

UDP –Difosfato de Uridina 5'

UTP –Trifosfato de Uridina 5'

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal - UFSM	133
--	------------

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados obtidos durante o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)	134
---	------------

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE APÊNDICES

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	54
2.1 Objetivo geral.....	54
2.2 Objetivos específicos.....	54
3. ARTIGOS E MANUSCRITO.....	57
3.1 Artigo 1	
Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats.....	57
3.2 Manuscrito	
Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from L-NAME-induced hypertension rats.....	68
3.3 Artigo 2	
Swimming Training Prevents Alterations in Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in Hypertensive Rats	100
4. DISCUSSÃO	109
5. CONCLUSÕES	117
6. PERSPECTIVAS	119
7. REFERÊNCIAS	121

ANEXOS

APÊNDICES

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (FAUCI et al., 2009; LLOYD-JONES et al., 2009; DBH, 2010; BRASIL, 2013).

A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle (BRASIL, 2013). É considerada um dos principais fatores de risco (FR) modificáveis para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e um dos mais importantes problemas de saúde pública (LLOYD-JONES et al., 2009; BRASIL, 2013). A mortalidade por DCV aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (SBC, 2010). Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da PA (54% por acidente vascular encefálico e 47% por doença isquêmica do coração) (WILLIAMS, 2010), sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos. No Brasil, as DCV tem sido a principal causa de morte (BRASIL, 2013). Em 2007, ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório (MALTA et al., 2009).

As DCV são ainda responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados (DBH, 2010). Como exemplo, em 2007 foram registradas 1.157.509 internações por DCV no Sistema Único de Saúde (SUS). A doença renal terminal, outra consequência frequente da HAS, ocasionou a inclusão de 94.282 indivíduos em programa de diálise no SUS e 9.486 óbitos em 2007 (DATASUS, 2009).

De acordo com dados do IBGE (2009), as DCV representam mais de 40% das causas de óbito prematuro. Em menos de 40 anos, o Brasil passou de um perfil de mortalidade típico de uma população jovem para um desenho caracterizado por enfermidades complexas e mais onerosas, próprias das faixas etárias mais avançadas (IBGE, 2009).

Os inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de HAS acima de 30% (DBH, 2010). Considerando-se

valores de PA \geq 140/90 mmHg, 22 estudos encontraram prevalências entre 22,3% e 43,9% (média de 32,5%) (DBH, 2010). Entre os gêneros, a prevalência foi de 35,8% nos homens e de 30% em mulheres, semelhante a de outros países. Uma revisão sistemática quantitativa de 2003 a 2009, de 44 estudos em 35 países, revelou uma prevalência global de 37,8% em homens e 32,1% em mulheres (PEREIRA et al., 2009).

Estudos clínicos demonstraram que a detecção, o tratamento e o controle da HAS são fundamentais para a redução dos eventos cardiovasculares (SBC, 2010; BRASIL, 2013). No Brasil, 14 estudos populacionais realizados nos últimos quinze anos com 14.783 indivíduos (PA < 140/90 mmHg) revelaram baixos níveis de controle da PA (19,6%) (JARDIM et al., 2007; DBH, 2010).

Dentre os fatores de risco (FR) para o desenvolvimento da HAS encontram-se: idade, sendo a prevalência de HAS superior a 60% em indivíduos acima de 65 anos; gênero e etnia, nos quais homens negros estão mais suscetíveis; excesso de peso e obesidade; ingestão de sal; consumo exagerado de álcool; sedentarismo e genética (FAUCI et al., 2009). Há evidências de que fatores socioeconômicos também possam ser incluídos como um FR para a HAS, pois já foi observada uma prevalência em indivíduos com menor escolaridade (DBH, 2010).

Os FR cardiovasculares frequentemente se apresentam de forma agregada. A predisposição genética e os fatores ambientais tendem a contribuir para essa combinação em famílias com estilo de vida pouco saudável (DBH, 2010). O Ministério da Saúde (BRASIL, 2013) reforça a importância do diagnóstico precoce e da mudança no estilo de vida, principalmente com relação ao sedentarismo, como fatores de controle e tratamento fundamentais para a qualidade de vida do paciente. Desta forma, a recomendação é que se faça a aferição da PA no mínimo uma vez por ano. Tanto nos atendimentos em unidades básicas de saúde quanto em consultório, preconiza-se que os médicos e/ou enfermeiros tenham a atenção voltada para estas medidas de “rastreamento”, como denomina o Ministério da Saúde (BRASIL, 2013).

Os critérios clínicos atuais para definir hipertensão geralmente baseiam-se na média de duas ou mais aferições da pressão na posição sentada durante cada uma de duas ou mais consultas ambulatoriais. A classificação da determinação do nível de hipertensão varia levemente de acordo com a referência utilizada, como

demonstrada nos quadros abaixo. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2010), os indivíduos podem ser classificados como portadores de pressão ótima, pressão normal, pressão limítrofe, hipertensão estágio 1, hipertensão estágio 2, hipertensão estágio 3 ou hipertensão sistólica isolada (Quadro 1). Tomando como base o *American Heart Association* (2004), os indivíduos são caracterizados como portadores de pressão normal, pré-hipertensão, hipertensão estágio 1 e hipertensão estágio 2 (Quadro 2).

Categoria	PA diastólica (mmHg)	PA sistólica (mmHg)
Pressão ótima	< 80	<120
Pressão normal	< 85	<130
Pressão limítrofe	85-89	130-139
Hipertensão estágio 1	90-99	140-159
Hipertensão estágio 2	100-109	160-179
Hipertensão estágio 3	≥110	≥180
Hipertensão sistólica isolada	< 90	≥140

Quadro 1 - Classificação da determinação do nível de hipertensão de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBC, 2010).

Categoria	PA diastólica (mmHg)	PA sistólica (mmHg)
Pressão normal	< 80	<120
Pré-hipertensão	80-89	120-139
Hipertensão estágio 1	90-99	140-159
Hipertensão estágio 2	≥100	≥160

Quadro 2 - Classificação da determinação do nível de hipertensão de acordo com o American Heart Association (2004).

É importante frisar que, dependendo dos métodos de avaliação do paciente, até 95% dos hipertensos são diagnosticados como tendo hipertensão essencial, também chamada de hipertensão primária ou idiopática (FAUCI et al., 2009; ROGERS et al., 2011). Outros tipos de hipertensão como a secundária e a do jaleco branco são menos prevalentes (FAUCI et al., 2009).

A hipertensão essencial tende a ser familiar e propensa a ser consequência de uma interação entre fatores ambientais e genéticos. A prevalência da hipertensão essencial aumenta com a idade e indivíduos com pressões arteriais relativamente altas, quando mais jovens, apresentam aumento do risco de desenvolvimento subsequente de hipertensão. É provável que a hipertensão essencial represente um espectro de distúrbios com fisiopatologias subjacentes diferentes. Na maioria dos pacientes com hipertensão estabelecida, a resistência periférica encontra-se aumentada e/ou o débito cardíaco com volume elevado (FAUCI et al., 2009).

Diversos estudos relacionados à hipertensão têm sido realizados com foco em pacientes portadores de hipertensão essencial ou em modelos experimentais desta patologia (GARCIA et al., 1995; PANZA et al., 1993; KASHYAP et al., 2005; FURSTENAU et al., 2008; FURSTENAU et al., 2010), provavelmente devido à sua grande prevalência.

Muitos investigadores tem demonstrado que o aumento da PA está associado com uma alteração na função reflexa dos barorreceptores. Essas alterações podem, inclusive, produzir uma bradicardia persistente em pacientes hipertensos devido aos altos níveis da atividade reflexa continuada. Assim, a frequência cardíaca (FC) de indivíduos com a PA elevada geralmente encontra-se pouco alterada ou em níveis normais, refletindo uma adaptação do sistemas barorreflexos a altas pressões (CHRYSANT, 2010).

A hipertensão essencial, na maioria das vezes é associada a importantes alterações metabólicas, incluindo aquelas relacionadas ao metabolismo lipídico (ZICHA et al., 1999). Dentre essas alterações, a dislipidemia, que consiste em níveis plasmáticos elevados de triglicerídeos e colesterol, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento nos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de partículas aterogênicas, geralmente acompanham indivíduos portadores dessa patologia (KULLO et al., 2005; UKOH & OFOROFUO, 2008).

Além disso, há evidências crescentes de uma base genética para a associação da hipertensão com resistência à insulina e dislipidemia. O *locus* genético associado à hipertensão acompanhada de dislipidemia ou diabetes parece estar intimamente ligado ao receptor de LDL e ao receptor de insulina. Por outro lado, os efeitos do genótipo sobre o colesterol LDL foram um aditivo para a influência da desnutrição precoce. O crescimento fetal e infantil prejudicados está associado não apenas com a incidência de hipertensão aumentada, mas também com a resistência à insulina, níveis elevados de triglicérides, colesterol LDL elevado, e diminuição do colesterol HDL (ZICHA et al., 1999).

A HAS também está intimamente ligada à prejuízos na função renal e encontra-se geralmente associada à níveis elevados de ácido úrico na corrente sanguínea (SOLTANI et al., 2013). O nível de uréia sérica é uma das medidas mais comumente utilizadas para a avaliação da função renal. Os fatores que podem influenciar tanto a excreção de uréia pelos rins quanto sua sua geração são complexos e variam muito entre os indivíduos e ao longo do tempo (LESLEY & STEVENS, 2005). A uréia é um produto final do catabolismo protéico. É livremente filtrada pelo glomérulo e passivamente reabsorvida em ambos os néfrons (proximal e distal), e é excretada em altas concentrações na urina. A depleção do volume do fluido extracelular e estados de antidiurese estão associados com o aumento da reabsorção de uréia, levando a uma diminuição da depuração desta (LESLEY & STEVENS, 2005). Em revisão recente sobre hiperuricemia e hipertensão, constatou-se que 75% dos sujeitos hipertensos possuem níveis elevados de ácido úrico circulante e que este quadro também configura-se como um fator de risco independente para o desenvolvimento da hipertensão (SOLTANI et al., 2013). Mazzali et al. (2001) demonstraram uma associação positiva entre o aumento da concentração de ácido úrico e os níveis da PA em ratos. Soltani et al. (2013) alertam para a importância da dosagem deste parâmetro em indivíduos hipertensos, bem como apontam para o fato de que o controle da hiperuricemia é um dos fatores principais para a redução da PA.

Além das alterações renais, é importante ressaltar a importância do óxido nítrico (ON) na patofisiologia da hipertensão (QIAN & FULTON, 2013). A síntese e a liberação de ON pelas células endoteliais desempenham um efeito importante de

relaxamento vascular (KATSUMI et al., 2007), contribuindo para a modulação do tônus vascular e conseqüentemente da pressão sanguínea.

Várias células utilizam a arginina para sintetizar o ON. Nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz o radical livre gasoso, ON, e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (MONCADA et al., 1991). O ON atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a conseqüente formação de cGMP (monofosfato de guanosina-3',5'-cíclico) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (MONCADA et al., 1991) (Figura 1).

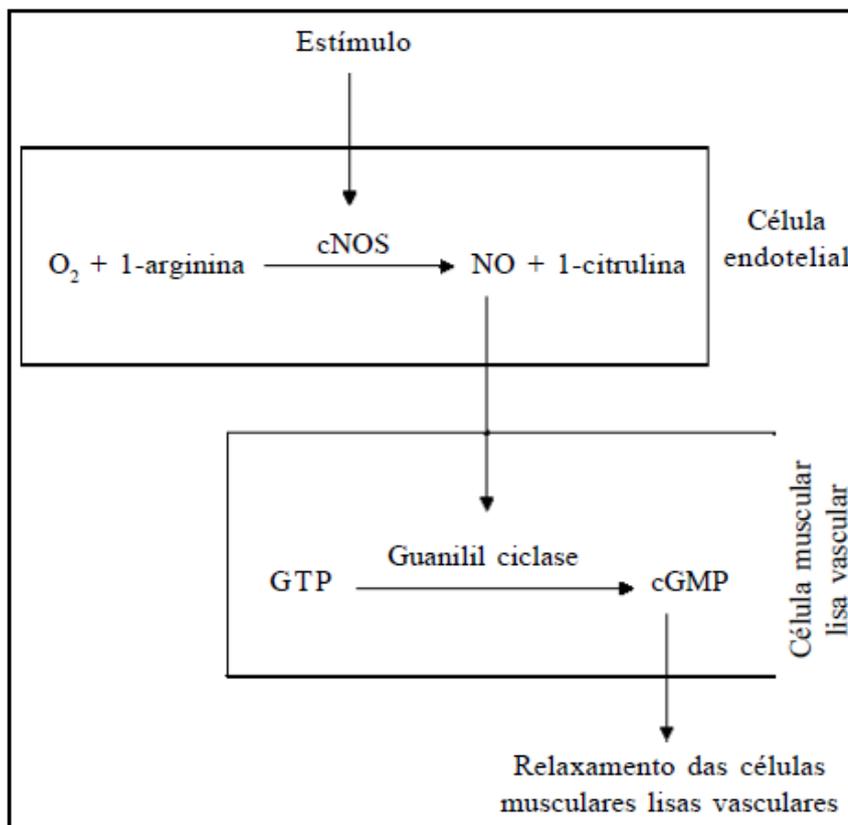


Figura 1 - Mecanismo de vasodilatação mediado pelo ON, em resposta a vários estímulos, como bradicinina ou acetilcolina. A enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) utiliza o oxigênio molecular (O_2) e o aminoácido L-arginina para formar o ON. O ON ativa a guanilil ciclase nas células da musculatura lisa vascular, aumentando o nível de cGMP, produzindo relaxamento e vasodilatação.

Quando o cGMP está alto, o cálcio intracelular aumenta, relaxando as células e a vasodilatação se desenvolve. A vasodilatação se mantém enquanto a difusão do ON para a musculatura lisa vascular estiver ocorrendo. Um aumento no fluxo de ON para a musculatura lisa vascular provoca maior relaxamento celular e maior vasodilatação (QIAN & FULTON, 2013). Se a formação de ON diminuir, ocorre uma vasoconstrição moderada. O efeito vasodilatador do ON parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo pulsátil e força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares (CHESTER et al., 1990). O ON também pode ser produzido pelas células musculares lisas, podendo regular a atividade dessas células por um mecanismo dependente do cGMP (COOKE & TSAO, 1993).

Qian e Fulton (2013) reforçam o fato de que o ON exerce um papel vital na manutenção da homeostase cardiovascular através de sua influência no tônus vascular, na proliferação das células musculares lisas, na adesão de leucócitos e na agregação plaquetária. Sendo assim, diversos estudos tem mostrado que a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) tem efeito protetor em diversas patologias, incluindo a hipertensão (QUIAN & FULTON, 2013).

Através de seus efeitos na função endotelial e no vasorelaxamento, o ON regula o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a PA. Indivíduos hipertensos possuem baixa formação de ON, que pode ser tanto causa quanto consequência da patologia, pois sabe-se que o metabolismo de síntese do ON prejudicado pode ser uma das causas da hipertensão (QUIAN & FULTON, 2013). O déficit de ON é um dos fatores que fazem com que a perfusão tecidual seja reduzida e ocorra a formação de trombo, condição que agrava o quadro hipertensivo (QUIAN & FULTON, 2013).

Além disso, a hipertensão está intimamente ligada à produção de espécies reativas que alteram o metabolismo do ON. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) reage com o ON três vezes mais rápido do que com a enzima superóxido dismutase (SOD). Esta reação efetivamente bio-inativa o ON, e sendo assim, diminui a vasodilatação do endotélio que é dependente de ON. O produto da reação do ON com o $O_2^{\cdot-}$ é o peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual é altamente reativo. Por nitrosilar resíduos de tirosina na prostacilina sintase, o $ONOO^-$ pode por si só prejudicar as respostas de relaxamento (WILCOX, 2003).

A inibição crônica da síntese de ON produz uma elevação volume-

dependente da PA e suas características fisiológicas e patológicas se assemelham a hipertensão essencial (LERMAN et al., 2005; DORNAS & SILVA, 2011). Além disso, é bem estabelecido que ocorre a inibição aguda da biossíntese de óxido nítrico através da administração *in vivo* de metila N ω -Nitro-L-arginina cloridrato de éster (L-NAME), um análogo da L-arginina, levando à vasoconstrição renal e hipertensão arterial (LERMAN et al., 2005; DORNAS & SILVA, 2011). Neste sentido, diversos estudos utilizam a administração de L-NAME para a indução da hipertensão arterial *in vivo* (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992; HUSAIN, 2002; FURSTENAU et al., 2008; FURSTENAU et al., 2010).

Em fases mais avançadas, o modelo é caracterizado por uma função renal deprimida e microangiopatia renal hipertensiva (RIBEIRO et al., 1992), além de dano renal glomerular (BAYLIS et al., 1992, KURU et al., 2005). Foi observado também, o aumento da resistência vascular renal e proteinúria como consequência da hipertensão causada pela administração de L-NAME, coincidindo com o aparecimento de lesão glomerular esclerótica na histopatologia renal e estreitamento arteriolar (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992).

A administração de L-NAME pode ser realizada oralmente, através de gavagem ou na água da dieta; ou através da via intraperitoneal. A dose do inibidor da óxido nítrico sintase varia de 10 mg/kg/dia à 60 mg/kg/dia, dependendo do protocolo experimental (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992; HUSAIN, 2002; KURU et al., 2002; KURU et al., 2009; FURSTENAU et al., 2008). Diante dos dados existentes na literatura é possível afirmar que a via de administração e a dose do composto não exercem alterações significativas com relação ao resultado esperado. Entretanto, observa-se que existe uma correlação positiva entre doses mais altas e/ou tempo de exposição prolongado ao composto e o desenvolvimento de danos renais que variam de leves a severos (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992; AZEGAMI et al., 2012)

Através da utilização de modelos experimentais de hipertensão tem sido possível analisar e melhor compreender as alterações fisiopatológicas que acompanham essa patologia. Neste contexto, é importante destacar que as mudanças vasculares constituem-se como foco importante de pesquisa. A pressão exercida pelo próprio fluxo sanguíneo é um dos fatores responsáveis por causar danos ao endotélio vascular. Em uma visão superficial e resumida observa-se que

estímulos dirigidos às paredes das artérias resultam em rápida ativação do endotélio, agregação plaquetária bem como acúmulo de leucócitos (GLEESON et al., 2011; KANTHI et al., 2014; SCHIFFRIN, 2014).

Nos últimos 20 anos tem sido reconhecido que o quadro inflamatório de baixo grau exerce um papel chave nas DCV. Este estado inflamatório de baixo grau é indicado por níveis elevados de marcadores inflamatórios clássicos como a proteína C-reativa (PCR) (GLEESON et al., 2011). A PCR tem sido reconhecida como preditora de eventos cardiovasculares, principalmente quando seus níveis elevados estão associados à hipertensão (BLAKE et al., 2003). Entretanto, Pirro e Schillaci (2006) sugerem que a PCR elevada em indivíduos saudáveis pode ser um preditor da hipertensão. Sendo assim, ainda não está claro se essa proteína deve ser entendida como um marcador inflamatório ou um fator causal na promoção da hipertensão e suas complicações (PIRRO & SCHILLACI, 2006). A PCR é uma proteína de fase aguda produzida nos hepatócitos em resposta ao estímulo de citocinas, em especial a IL-6, que induz a sua expressão e liberação na corrente sanguínea (PIRRO e SCHILLACI, 2006). Além de inibir a atividade da eNOS, ela possui habilidade de ligação e ativação do sistema complemento, promovendo deposição de C3b nos tecidos, o que poderia induzir à aterosclerose e potencializar a instabilidade da placa de ateroma (PIRRO e SCHILLACI, 2006).

Além disso, a PCR é capaz de induzir a produção de fatores teciduais pró-trombóticos pelos macrófagos, promovendo conexão entre as vias inflamatórias e de coagulação (SCHNABEL et al., 2005). Isso porque o dano causado pelo acúmulo de LDL na íntima do endotélio vascular ativa a inflamação, recrutando macrófagos para o local de injúria. A PCR liberada pelo processo inflamatório estimula os macrófagos a fagocitar lipoproteínas circulantes, favorecendo o aparecimento de lesão vascular com consequente adesão plaquetária e formação de trombos (ROSS, 1999; PIRRO e SCHILLACI, 2006). A partir do exposto, constata-se que a PCR pode ser compreendida tanto como marcador inflamatório quanto como um promotor da hipertensão e das complicações atreladas à patologia.

Além da PCR, a enzima mieloperoxidase (MPO) tem emergido na literatura como um importante marcador inflamatório e preditor de risco cardiovascular e, atualmente, sugere-se que essa enzima deve ser utilizada como uma ferramenta para o diagnóstico e prognóstico na maioria das DCV (ANATOLIOTAKIS et al.,

2013). Considerando que a inflamação de baixo grau está presente na hipertensão e esta é protagonista do processo aterosclerótico, aponta-se o papel da ativação neutrofílica nesse contexto (ANATOLIOTAKIS et al., 2013). A ativação de neutrófilos resulta na liberação dos grânulos intracelulares, gerando dano endotelial e aumentando a atividade pró-coagulante. Sabe-se que a MPO é o maior constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos e é imediatamente liberada após a sua ativação por diferentes agonistas (HANSSON et al., 2006). A liberação da MPO pelos leucócitos ativados afeta o endotélio arterial a partir de diversos mecanismos que incluem a modificação do fluxo de colesterol e prejuízo da produção de ON que induz relaxamento vascular (ANATOLIOTAKIS et al., 2013). Neste sentido, a MPO está implicada tanto na propagação quanto na formação da aterogênese e existem evidências substanciais de que ela também promove isquemia através da desestabilização e movimentação da placa vulnerável (BALDUS et al., 2003).

Além disso, diversos estudos tem adicionado a informação de que a MPO e seus produtos oxidantes são parte da cascata inflamatória iniciada pelo dano endotelial e que eles são significativamente no local da inflamação arterial (ANATOLIOTAKIS et al., 2013). A MPO utiliza ON como substrato, gerando espécies reativas de nitrogênio e sendo catalisadora da peroxidação lipídica. A conversão do LDL em sua forma pró-aterogênica gera aumento da sua captação pelos macrófagos do endotélio vascular, formando as células espumosas que originam a placa de aterosclerose (NICHOLLS et al., 2004). Além disso, a MPO também é capaz de desencadear a produção de fatores pró-inflamatórios, expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas e ativação de metaloproteinasas, promovendo a desestabilização e a ruptura da placa aterosclerótica (BALDUS et al., 2003). Todos esses fatores reforçam o fato de que a MPO deve ser considerada como candidata para a predição de evento cardiovascular, como já salientado por Anatoliotakis et al. (2013).

Além do envolvimento de marcadores inflamatórios nas complicações da hipertensão, atualmente as discussões sobre a participação das respostas imunes inatas e adaptativas nos mecanismos que contribuem para a inflamação nesta patologia estão ganhando grande destaque (SCHIFFRIN, 2014). Diferentes subtipos de linfócitos e suas citocinas estão envolvidos no remodelamento vascular na hipertensão. Entretanto, como essa ativação do sistema imune é desencadeada

permanece desconhecida, mas novos antígenos poderiam estar sendo gerados pela elevação da pressão sanguínea através dos receptores moleculares padrão associados ao dano ou outros mecanismos (SCHIFFRIN, 2014). Uma vez ativadas, as células Th1 podem contribuir para a elevação da pressão através do remodelamento vascular das veias sanguíneas pelos efeitos das citocinas produzidas ou por seus efeitos na gordura perivascular (SCHIFFRIN, 2014). Apesar de estar claro que alterações nos sistema imune acompanham a hipertensão e estão relacionadas com a progressão das doenças cardiovasculares, Schiffrin (2014) em sua última revisão sobre o tema, afirma que os mecanismos para desvendar como estas alterações são desencadeadas e interrelacionadas ainda precisam ser estudados.

A partir disso, maior atenção deve ser voltada para eventos adjacentes às células imunes. De grande importância neste contexto, observa-se que a liberação de nucleotídeos é um potente promotor de trombose e inflamação (KANTHI et al., 2014), condições que, como já referido anteriormente, se relacionam em maior ou menor grau com a hipertensão.

O endotélio mantém a integridade vascular e a fluidez do sangue atuando como um anticoagulante, suprimindo a ativação plaquetária e promovendo a fibrinólise e um estado quiescente (BONNER et al., 2012). Isso ocorre através de diversos mecanismos tromboregulatórios, incluindo o catabolismo de nucleotídeos purinérgicos como o trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) (BONNER et al., 2012). Os nucleotídeos são liberados constantemente pelas células vasculares em baixas taxas, as quais aumentam quando as células são lesadas ou estressadas. Esses nucleotídeos funcionam como potentes sinalizadores parácrinos para ativar programas pró-trombóticos e pró-inflamatórios na vasculatura através da sinalização mediada por receptores em plaquetas, leucócitos (especialmente linfócitos), células endoteliais e células lisas musculares (JUNGER, 2011; KANTHI et al., 2014).

O sistema purinérgico está programado para manter a integridade vascular e esse fenômeno se dá principalmente através da regulação das concentrações de nucleotídeos. Estas concentrações aumentam no meio extracelular após a ativação de células endoteliais e plaquetas, desgranulação de leucócitos, ou de necrose ou apoptose de células vasculares e inflamatórias (HYMAN et al., 2009). A liberação de

nucleotídeos ocorre através da lise celular e de outros mecanismos que não envolvem o rompimento da célula (KANTHI et al., 2014). Esses últimos incluem a exocitose de vesículas contendo nucleotídeos e de canais permeáveis de nucleotídeos os quais podem liberar nucleotídeos em resposta a pequenas perturbações celulares (SCHENK et al., 2008; JUNGER, 2011). Quando liberados, os nucleotídeos exercem efeitos imediatos no meio local a partir da ativação dos seus receptores e são rapidamente inativados através de degradação enzimática. Assim, os nucleotídeos e seus metabólitos funcionam como ligantes para receptores expressos na superfície das células vasculares. A ligação destes aos receptores purinérgicos medeia os efeitos modulatórios na trombose e na inflamação das purinas, entre outros (KANTHI et al., 2014).

É importante destacar que o funcionamento do sistema purinérgico vem sendo desvendado ao longo dos anos. Sua história começou com Drury e Szent-Györgyi em 1929, através da descoberta da possível ação dos compostos de adenina no coração. No início dos anos 60, foi caracterizada a neurotransmissão não-adrenérgica e não-colinérgica no intestino e na bexiga e, nos anos 70, a adenosina 5'-trifosfato (ATP) teve seu papel descrito como um transmissor nesses sistemas (BURNSTOCK, 2009). Entretanto, o conceito da co-transmissão purinérgica foi formulado pela primeira vez em 1976 (BURNSTOCK, 1976) e atualmente é reconhecido que o ATP atua como um co-transmissor em todas as inervações periféricas e no sistema nervoso central (BURNSTOCK, 2009).

Duas famílias de receptores purinérgicos foram reconhecidas em 1978: os receptores P1, sensíveis a ação da adenosina; e os receptores P2, sensíveis ao ATP e à adenosina difosfato (ADP) (BURNSTOCK, 1978). A clonagem desses receptores no início dos anos 90 foi um ponto chave para a aceitação da hipótese da sinalização purinérgica (LUSTING et al., 1993). Atualmente existem 4 subtipos de receptores P1 (A1, A2a, A2b, A3), sensíveis à adenosina; 7 subtipos de receptores P2X (ionotrópicos), sensíveis ao ATP; e 8 subtipos de receptores P2Y (metabotrópicos/acoplados à proteína G) os quais diferem na seletividade entre nucleotídeos e estão relacionados à diferentes vias de sinalização intracelular (BURNSTOCK, 2009; KUKULSKI, LÉVESQUE E SÉVIGNY, 2011). Os receptores P2Y1, P2Y12 e P2Y13 são ativados pelo ADP; o P2Y2 pelo ATP e UTP; o P2Y4 pelo UTP; o P2Y6 pelo UDP em humanos e roedores e pelo UTP em camundongos

(KAUFFENSTEIN et al., 2010); o P2Y11 pelo ATP; e o P2Y14 é sensível à UDP-glicose (KUKULSKI, LÉVESQUE E SÉVIGNY, 2011) (tabela 1).

Agonista	Receptor
ATP	P2X1-7, P2Y2 e P2Y11
ADP	P2Y1, P2Y12 e P2Y13
UTP	P2Y2, P2Y4, P2Y6 (camundongos)
UDP	P2Y6
UDP-glicose	P2Y14
Adenosina	P1 (A1, A2a, A2b, A3)

Tabela 1 – Agonistas do sistema purinérgico e seus respectivos receptores.

Os nucleotídeos e a adenosina extracelular, através de sua ação via receptores P1 e P2, estão envolvidos em um grande número de processos fisiológicos como metabolismo celular, vasodilatação, ativação e migração dos leucócitos e agregação plaquetária (KUKULSKI, LÉVESQUE & SÉVIGNY, 2011; DEAGLIO & ROBSON, 2011). A ativação desses receptores é regulada por ectoenzimas, as quais têm como função eliminar e/ou produzir tais moléculas sinalizadoras (ABBRACCHIO e BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2009; KUKULSKI, LÉVESQUE e SÉVIGNY, 2011).

Como o próprio nome sugere, as ectoenzimas estão acopladas à membrana plasmática da célula e seu sítio ativo encontra-se voltado para o meio extracelular. As referidas enzimas estão envolvidas em múltiplos aspectos da sinalização purinérgica, incluindo: término da ativação dos receptores P2; proteção da suscetibilidade dos receptores P2 à dessensibilização; geração de ligantes para receptores P2 através da hidrólise de moléculas que contém um nucleotídeo em sua estrutura (ex.: NAD⁺, UDP-glicose, etc...) em nucleotídeos, ou trifosfonucleotídeos em difosfonucleotídeos; e produção de adenosina com a finalidade de ativar receptores P1 (KUKULSKI, LÉVESQUE & SÉVIGNY, 2011).

Existem quatro famílias de ectonucleotidases: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases), nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (NPPs),

fosfatases alcalinas e ácidas (ALP e ACP, respectivamente) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73) (ROBSON et al., 2006; STEFAN et al., 2006; YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN, 2000, 2009). Essas enzimas diferem tanto em relação à especificidade pelo substrato e sua hidrólise, quanto em relação à sua localização celular (KUKULSKI, LÉVESQUE & SÉVIGNY, 2011). Corroborando com a importância biológica das ectonucleotidases, doenças neurológicas, cardiovasculares, inflamatórias e autoimunes tem sido associadas com alterações na atividade e/ou na expressão dessas enzimas, o que, em alguns casos, está ligado ao polimorfismo genético (KUKULSKI, LÉVESQUE e SÉVIGNY, 2011).

Em nosso laboratório, os estudos já realizados demonstraram alterações na hidrólise dos nucleotídeos da adenina em patologias como: diabetes (LUNKES et al., 2003; SCHMATZ et al., 2009;), câncer de mama (ARAÚJO et al., 2005), câncer de pulmão (ZANINI et al., 2012), artrite reumatoide (BECKER et al., 2010), esclerose múltipla (SPANVELLO et al., 2010), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2007), infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008), cardiopatia isquêmica (BAGATINI et al., 2011), dentre outras (SCHETINGER et al., 2007).

A família da NTPDase é composta por oito membros. NTPDase1,-2,-3 e -8 hidrolisam todos os nucleotídeos que ativam receptores P2. Em contraste, as NTPDases 4,-5,-6 e -7 estão localizadas em organelas intracelulares e, a priori, não participam do metabolismo dos nucleotídeos extracelulares (ROBSON, SÉVIGNY E ZIMMERMANN, 2006) (Figura 2). Entretanto, as NTPDases 5 e 6 podem aparecer na superfície celular ou ser secretadas no espaço extracelular como exoenzimas e, sendo assim, poderiam regular a ativação de receptores dependentes de ADP, UDP e UTP (BRAUN et al., 2000). Porém, essas duas enzimas possuem um km relativamente alto e uma baixa atividade específica, sugerindo que suas contribuições para a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares são limitadas (KUKULSKI, LÉVESQUE E SÉVIGNY, 2011).

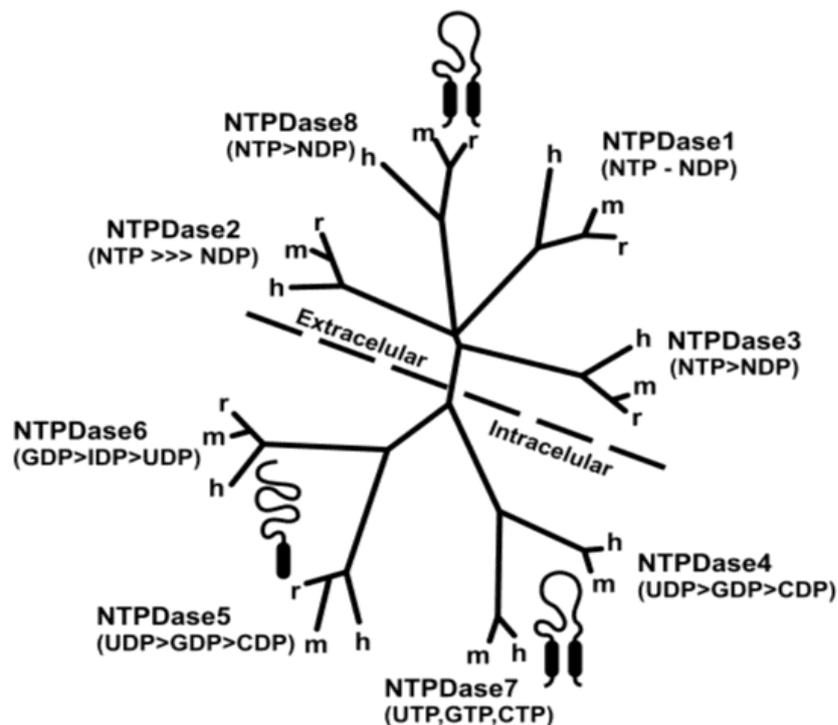


Figura 2 - Membros da família NTPDase.

FONTE: Robson et al. (2006), com adaptações.

A NTPDase1 (EC 3.6.1.5, conhecida também como CD39, apirase, E-NTPDase1 e/ou ecto-NTPDase1) é uma proteína de membrana integral e conservada que hidrolisa ATP e ADP em um modo dependente de cátions para gerar AMP. Constitui-se como a principal responsável pelo término da ativação dos receptores P2Y1,12,13 pois ela não permite a acumulação de ADP durante a hidrólise do ATP (KUKULSKI, LÉVESQUE & SÉVIGNY, 2011). Essa enzima também protege os receptores P2X1 e P2Y1 contra a dessensibilização (KAUFFENSTEIN et al., 2010). É formada por 510 aminoácidos e possui dois domínios transmembrana, um pequeno citoplasmático que contém uma porção amino terminal e segmentos COOH-terminal e um domínio hidrofóbico extracelular. O domínio hidrofóbico extracelular enzimaticamente ativo contém cinco regiões conservadas da apirase responsável pelo nucleotídeo. (KUKULSKI, LÉVESQUE & SÉVIGNY, 2011).

A NTPDase1 é inativa no compartimento citoplasmático até sua localização na superfície celular, onde se torna cataliticamente ativa. Seu deslocamento para a superfície ocorre por mecanismos dependentes de regiões lipídicas. A ecto-5'-nucleotidase também tem sido observada na superfície de regiões lipídicas em tipos celulares diferentes, sugerindo a possibilidade de se co-localizar com a NTPDase1 para gerar eficientemente adenosina a partir de ATP e ADP (KANTHI et al., 2014). Os mecanismos moleculares que regulam a expressão dessa enzima ainda são desconhecidos e são objeto de investigação em diversos grupos de pesquisa (KANTHI et al., 2014). Entretanto, sabe-se que em condições pró-inflamatórias a liberação de IL-6 desencadeia um aumento na expressão da CD39 nos linfócitos. Em contrapartida, este aumento gera mais adenosina e conseqüentemente desencadeia a supressão das funções das células T efectoras CD4+ e CD8+ (CHALMIN et al., 2012).

Além disso, muitas condições estressoras tem sido associadas com a diminuição da expressão da NTPDase1, incluindo citocinas pró-inflamatórias (IL-17 e TNF- α) (HOT et al., 2013), estresse oxidativo e ativação de células endoteliais (ROBSON et al., 1997). Em contraponto, um importante estudo conduzido por Eltzschig et al. (2009) demonstrou um aumento na expressão da NTPDase1 em resposta a hipóxia. É interessante salientar que em condições de hipóxia forma-se um meio propício para a ativação do endotélio, rapidamente iniciando a cascata de processos biossintéticos e de resposta ao estresse, incluindo a expressão de moléculas de adesão celular e fatores pró-trombóticos, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de citocinas pró-inflamatórias (ELTZSCHIG et al., 2009).

Com relação ao papel das NTPDses 2, 3 e 8 na circulação, observa-se que elas promovem a ativação dos receptores de ADP devido à sua preferência pela hidrólise do ATP e, dessa forma, propiciam um acúmulo sustentado ou transitório de ADP na presença de ATP. Entretanto, essas enzimas possuem expressão reduzida nas células endoteliais e sanguíneas (KUKULSKI, LÉVESQUE & SÉVIGNY, 2011). Sendo assim, ainda não se tem informações conclusivas a respeito das suas importâncias relativas quanto às questões inflamatórias e relacionadas à agregação plaquetária (FOUNTAIN & BURNSTOCK, 2009; KUKULSKI, LÉVESQUE & SÉVIGNY, 2011).

De suma importância para o quadro hipertensivo está a relação entre os componentes do sistema purinérgico e os processos trombóticos (KAHNER et al., 2005; DEAGLIO & ROBSON, 2011). A agregação plaquetária é um processo primário na formação do trombo, acompanhada pela deposição do fator tecidual e geração de fibrina para estabilizar o trombo plaquetário. O acúmulo inicial de plaquetas é rápido, seguido de uma diminuição no tamanho do trombo, com um grau de desagregação plaquetária e estabilização do mesmo (MOHEIMANI & JACKSON, 2012). Durante a ativação, grânulos plaquetários se fundem com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo para o meio extracelular, incluindo o ADP proveniente de grânulos densos (DEAGLIO & ROSON, 2011).

A ativação plaquetária culmina em mudança na forma, agregação, liberação de conteúdos granulares e geração de mediadores lipídicos. Esses mediadores geram um mecanismo de feedback positivo potencializando a ativação plaquetária induzida pelos agonistas fisiológicos como colágeno e trombina (KAHNER et al., 2006). Os nucleotídeos de adenina (ATP e ADP), liberados pelas células danificadas e que são secretados pelos grânulos densos das plaquetas, contribuem para esse mecanismo, agindo através dos receptores na superfície das plaquetas. O ADP age através dos receptores P1Y1 e P2Y12. O ATP age através do receptor P2X1. O estímulo das plaquetas pelo ADP leva a mudança no formato, agregação e geração de tromboxano A2. A co-estimulação de ambos os receptores (P2Y1 e P2Y12) é requerida para a indução da agregação plaquetária pelo ADP (KAHNER et al., 2006), embora os últimos estudos enfatizem que o receptor P2Y12 parece ter maior influência quanto à ativação plaquetária (MOHEIMANI & JACKSON, 2012).

O estímulo do receptor P2X1 pelo ATP está envolvido na mudança do formato das plaquetas e ajuda a ampliar as respostas mediadas pelos outros agonistas. A ativação dos receptores purinérgicos resulta em uma via de transdução de sinal que é importante na regulação da trombose e da hemostasia (KAHNER et al., 2005). Em resposta à ligação do ADP ao receptor P2Y12, a subunidade $G_{i\alpha}$ da proteína G, através da inibição da PKA, ativa a fosfoproteína vasodilatadora (VASP). Já, a subunidade $\beta\gamma$ da proteína G estimula a fosfatidil inositol 3 quinase (PI-3K) que fosforila e ativa as atividades da Rap1b e Akt. Essas respostas levam à ativação da integrina. A ligação do ADP nos receptores P2Y1 gera a ativação da fosfolipase A2

(cPLA2) que ativa a geração de tromboxano A2. Tanto a ativação dos receptores P2Y1 quanto a ligação do ATP nos receptores P2X (principalmente o P2X1) gera mobilização e influxo de Ca^{2+} e mudança no formato das plaquetas. Além disso, a ativação da cinase regulada por sinal extracelular (Erk) pelo ATP também atua na ativação do receptor de fibrinogênio e geração de tromboxano A2. Todos esses fatores levam à ativação plaquetária e à estabilização de agregados plaquetários já existentes.

A figura 4 mostra o resumo do mecanismo de ativação plaquetária gerado pelo ADP e pelo ATP de acordo com o exposto por Kahner et al. (2005) e Moheimani e Jackson (2012).

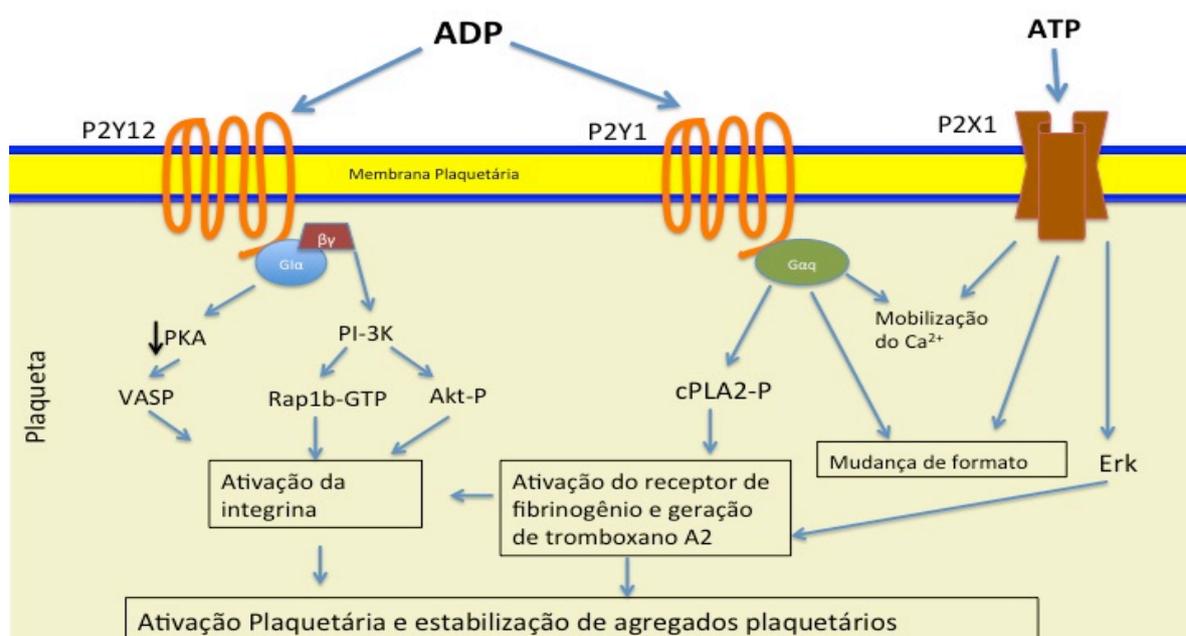


Figura 4 - Visão geral e simplificada sobre a sinalização gerada pelo ADP e pelo ATP nas plaquetas.

FONTE: desenho criado pela autora de acordo com as proposições de Kahner et al. (2005) e Moheimani e Jackson (2012).

Embora esses sinais bioquímicos sejam precursores da propagação do trombo, muitos mecanismos não estão claros (DEAGLIO & ROBSON, 2011). O ADP é reconhecido como uma molécula pró-trombótica e a NTPDase1 tem sido identificada em micropartículas e tem sido proposta como um possível contribuinte para a desagregação plaquetária por hidrolisar o ADP para regular o tamanho do trombo (BANZ et al., 2008; DEAGLIO & ROBSON, 2011). Corroborando com a afirmação anterior, foi observado que micropartículas de camundongos nocaute para CD39 induzem uma resposta pró-trombótica e pró-inflamatória em células endoteliais com a expressão aumentada de moléculas de adesão celular e liberação de TNF-alfa acompanhada de diminuição de mediadores anti-inflamatórios (BANZ et al., 2008).

Contrariamente à ideia de que baixos níveis da NTPDase1 estão relacionados ao aumento da inflamação e de processos trombóticos, em estudo recente, Visovatti et al. (2012) observaram níveis elevados de CD39 em micropartículas de pacientes com hipertensão pulmonar, doença esta que se caracteriza pela presença de resistência vascular, trombose microvascular e inflamação. Os autores concluem que mais estudos são necessários para elucidar se a superexpressão da enzima está relacionada à patogênese da doença ou a mecanismos de resposta compensatória.

Ainda, em diversos estudos realizados em nosso laboratório foi observado que doenças cardíacas com níveis aumentados de agregação plaquetária e presença de inflamação parecem estar associadas à maior atividade das NTPDases (SCHETINGER et al., 2007). Este fato tem sido atribuído a um possível mecanismo compensatório do organismo na tentativa de reduzir as injúrias que podem ser desencadeadas pela ativação das plaquetas devido às altas concentrações de ATP e ADP (pró-agregantes) (SCHETINGER et al., 2007; BAGATINI et al., 2011).

Em estudo realizado com pacientes hipertensos observou-se que a atividade das ectonucleotidases apresenta-se aumentada provavelmente como uma forma de mecanismo compensatório para evitar possíveis complicações advindas da patologia (LUNKES et al., 2003). Já, em estudo realizado com ratos submetidos à administração de L-NAME para a indução da hipertensão, observou-se diminuição na atividade das ectonucleotidases em plaquetas e o aumento da agregação plaquetária (FURSTENAU et al., 2008), o que pode representar um risco adicional para o desenvolvimento da hipertensão e suas complicações. Também em ratos, foi

observado o aumento da atividade e da expressão das ectonucleotidases em rins, possivelmente como uma forma compensatória para evitar danos renais maiores advindos da patologia (FURSTENAU et al., 2010).

Além dos seus efeitos na agregação plaquetária, os nucleotídeos são potentes mediadores inflamatórios, gerando vias de sinalização purinérgica autócrina e parácrina que regulam interações celulares e migração leucocitária (CHEN et al., 2006). Sob condições homeostáticas, a NTPDase1 é encontrada na maioria dos monócitos, neutrófilos e linfócitos B (BONNER et al., 2012). Em linfócitos T e em células natural killer, sua expressão é baixa. Em condições de estresse, especialmente quando existe uma resposta inflamatória robusta, os linfócitos B tornam-se a principal fonte de atividade das ectonucleotidases (BONNER et al., 2012).

Considerando que a NTPDase1 modula as concentrações extracelulares de purinas mas é encontrada na superfície dos leucócitos, os quais em contrapartida migram em resposta a essas concentrações, a NTPDase1 pode ser vista como um auto-regulador da concentração de leucócitos na corrente sanguínea. Em trabalho desenvolvido por Hyman et al. (2009), foi observado que o influxo de neutrófilos e macrófagos para o cérebro foi aumentado na ausência da enzima após a indução de acidente vascular cerebral. Eles identificaram um novo mecanismo pelo qual o infuxo de leucócitos é auto-regulado pela NTPDase1 (HYMAN et al., 2009).

Além disso, atualmente muita atenção tem sido direcionada para o papel da NTPDase1 em contribuir para propriedades anti-inflamatórias das células T. As propriedades imunomodulatórias das células T regulatórias (Treg) tem sido atribuídas em parte à expressão da NTPDase1, resultando na degradação do ATP à adenosina, a qual estimula os receptores A2a nas células T efetoras ativadas culminando em imunossupressão (KANTHI et al., 2014). Além disso, a presença da NTPDase1 na superfície celular parece proteger as células T contra a apoptose induzida pelo ATP e existe uma correlação positiva entre a atividade das ectonucleotidases e a ativação dos linfócitos (DOMBROWSKI et al., 1995; KANTHI et al., 2014).

Além das questões relacionadas ao sistema purinérgico, a inflamação, que acompanha a hipertensão, está intimamente ligada a alterações nos níveis plasmáticos da molécula acetilcolina (ACh). Há aproximadamente cem anos atrás, a

ACh foi proposta como o agente químico responsável pela transmissão nervosa na sinapse, a área de conexão entre um neurônio e sua célula alvo. Desde a comprovação de que a ACh exerce um papel fundamental no funcionamento do sistema nervoso, a transmissão colinérgica se tornou um dos campos de maior importância para a neurociência. (ANGLADE & LARAH-GODINOT, 2010). A histoquímica da sinapse colinérgica nasceu em 1949, quando Koelle e Friedenwald localizaram a atividade da AChE *in situ* a partir de uma ACh artificial. A partir daí, os outros componentes do sistema também foram caracterizados (ANGLADE & LARAH-GODINOT, 2010).

Atualmente, sabe-se que o sistema colinérgico é principalmente composto pela enzima colina acetiltransferase, a qual, a partir da acetil coenzima A e colina, sintetiza a ACh. Uma vez sintetizada, a ACh é direcionada para dentro de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de ACh. Quando liberada na fenda sináptica, a ACh pode ser hidrolisada pela AChE e/ou agir em duas famílias de receptores denominados muscarínicos (acoplados a proteína G) e nicotínicos (dependentes de canais iônicos) (DEAN, 2009).

Diferentes formas da AChE existem em tipos celulares variados (Bl et al., 2014), entretanto, sua expressão é mais pronunciada no cérebro, nas células vermelhas e nos leucócitos (DAS, 2007). Existe ainda uma outra colinesterase, chamada Butirilcolinesterase (BuChE) (também conhecida como “pseudo colinesterase”). Esta é uma colinesterase não específica que hidrolisa outros ésteres de colina além da ACh e está principalmente presente no soro, pâncreas e fígado (DAS, 2007). Ambas as enzimas possuem diversas funções celulares dependendo de sua localização e expressão.

A ACh é conhecida por possuir ações anti-inflamatórias e suprimir a produção de citocinas pro-inflamatórias (DAS, 2007; HARVEY, 2012). As vias de sinalização colinérgicas anti-inflamatórias são mediadas principalmente pelos receptores da ACh nos tecidos e nos macrófagos. Essas vias levam à diminuição da ativação do NF- κ B (fator nuclear kappa B), preservação da localização nuclear do grupo caixa 1 de alta mobilidade (HMGB1) e diminuição da produção de citocinas pro-inflamatórias (DAS, 2007). Além disso, a ACh é capaz de inibir a síntese e liberação de TNF- α , aumentar a produção de ON e, assim, exercer ações anti-inflamatórias (PAVLOV & TRACEY, 2006; DAS, 2007).

Estudos tem salientado a importância da ACh como um modulador inflamatório e a medida das atividades das enzimas AChE e BuChE tem sido descritas como marcadores fidedignos de inflamação sistêmica de baixo grau (DAS, 2007). Das (2007), ao sugerir que as enzimas colinérgicas poderiam ser usadas como marcadores inflamatórios, justificou sua proposição afirmando que existem muitas evidências concretas de que em condições de inflamação de baixo grau, as atividades da AChE e da BuChE estão elevadas, degradando a ACh, que é uma molécula anti-inflamatória. Estas proposições foram confirmadas e reafirmadas em estudos recentes desenvolvidos em nosso laboratório. Zanini et al. (2013), ao estudar pacientes com câncer de pulmão, verificaram um aumento considerável na atividade da AChE em linfócitos, o que correlaciona-se com o estado inflamatório em que os pacientes se encontram. Resultados semelhantes foram encontrados por Battisti et al. (2009) em linfócitos e sangue total de pacientes com leucemia. Em resposta a infecção por parasita e em pacientes diabéticos, foi verificado o aumento da atividade de ambas as colinesterases (DE BONA et al., 2011; COSTA et al., 2012; WOLKMER et al., 2013). Estes estudos, corroborando com a proposta de DAS (2007), revelam que quando as atividades das enzimas AChE e BuChE estão aumentadas ocorre a diminuição dos níveis da ACh, e, conseqüentemente a redução das ações anti-inflamatórias exercidas por esta molécula.

Assim, atividades aumentadas das colinesterases medidas em plasma, linfócitos e/ou soro indiretamente refletem níveis reduzidos de ACh que, em contrapartida, irá aumentar os eventos inflamatórios sistêmicos devido a ausência do controle de *feedback* negativo exercido pela ACh. Até o presente momento, não se tem conhecimento se os níveis dessas enzimas estão elevados mesmo quando outros marcadores inflamatórios como PCR, IL-6 e TNF-alfa ainda não estão elevados, como, por exemplo, na resistência a insulina, hiperlipidemia e hipertensão (DAS, 2007).

Em ampla revisão sobre os receptores muscarínicos, Harvey (2012) evidencia a importância da ACh nas funções cardiovasculares. Nas células endoteliais, a ACh, agindo através dos receptores M3 e M5, estimula a atividade da fosfolipase C (PLC) através da proteína Gq. A subseqüente produção de Inositol-1,4,5- trifosfato (IP₃) age no receptor IP₃ (IP₃R) no retículo endoplasmático para liberar Ca²⁺. O aumento no cálcio citosólico ativa a eNOS levando a produção de ON, o qual se difunde para

as células musculares lisas, onde ele estimula a guanilil ciclase solúvel a produzir cGMP. A proteína-quinase G (PKG) ativada pelo cGMP promove o relaxamento. Já, nas células lisas musculares vasculares, a ACh, através dos receptores M1 e/ou M3 estimula a produção de IP₃ dependente de PLC e a subsequente liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático. Isto resulta na ativação da cinase dependente de calmodulina e Ca²⁺ (CaMKII) que ativa a quinase da miosina de cadeia leve (MLCK), a qual promove contração (HARVEY, 2012) (Figura 5). Mesmo possuindo respostas opostas, a sinalização endotelial e o consequente relaxamento dos vasos sanguíneos se sobressai, sendo fundamental para o funcionamento cardiovascular (HARVEY, 2012). Além disso, diversos estudos mostram que as respostas vasodilatadoras da ACh encontram-se marcadamente reduzidas em indivíduos com doenças cardiovasculares (VIRDIS et al., 2010). Na hipertensão, a redução dos níveis da ACh configura-se como um fator adicional para o aumento da pressão sanguínea (HARVEY, 2012).

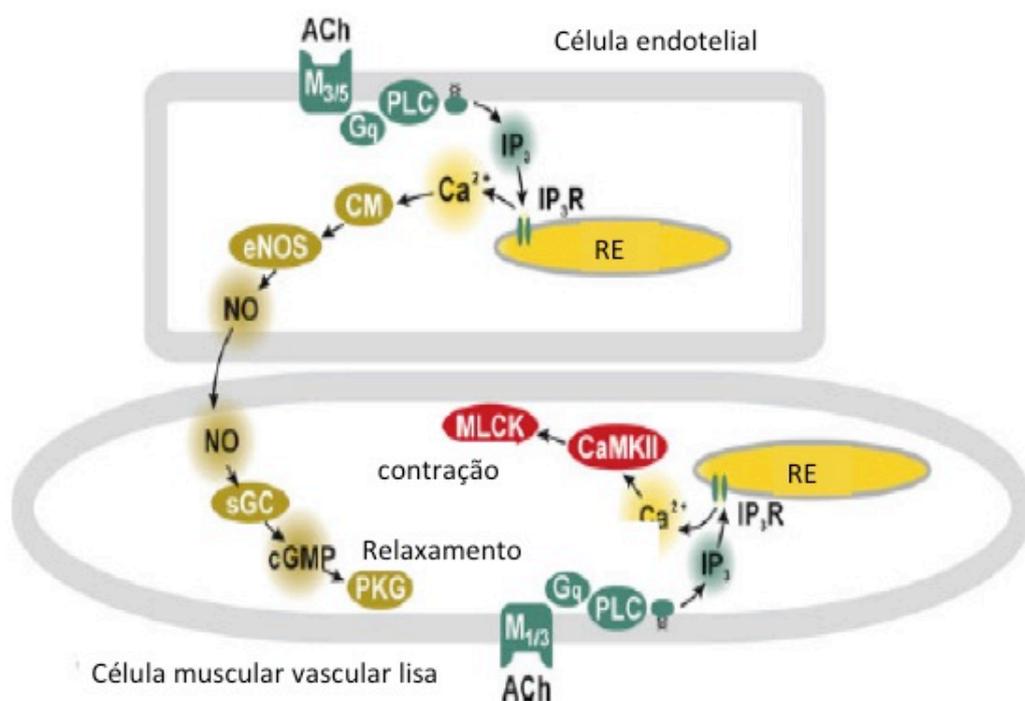


Figura 5 - Vias de sinalização muscarínicas na vasculatura.

FONTE: Harvey (2012), com adaptações.

Este efeito de relaxamento da vasculatura desencadeado pela ACh é claramente observado durante a prática de exercícios físicos. O exercício aumenta a atividade colinérgica com o conseqüente aumento nos níveis de ACh circulantes que induzem relaxamento vascular e maior expressão de eNOS (DAS, 2007).

O exercício físico aeróbico moderado tem sido reconhecido como um dos coadjuvantes no tratamento e na prevenção de doenças cardiovasculares, como a hipertensão (HUMPHREY e BARTELS, 2001; PACE, 2001; BRIFFA & BRIFFA, 2002; WARBURTON et al., 2006; HACKAM et al., 2010). O exercício físico é definido como qualquer atividade física praticada de forma sistematizada, que mantém ou aumenta a aptidão física em geral, podendo ser usado desde a promoção da saúde até a melhora da performance física. A razão da prática de exercícios inclui os benefícios tanto na aptidão física relacionada à saúde (resistência cardiorespiratória, força/resistência muscular e flexibilidade), quanto na aptidão física relacionada à performance (resistência cardiorespiratória, força/resistência muscular, flexibilidade, agilidade, potência, velocidade, coordenação e equilíbrio) (GUEDES & GUEDES, 2005).

A intensidade, o volume e a frequência do exercício exercem papel-chave na determinação das respostas a um esforço e devem variar de acordo com a capacidade do sujeito e com o objetivo deste (GUEDES & GUEDES, 2005; GOMEZ-CABRERA et al., 2008). Embora haja atualmente um grande incentivo para a prática de exercícios físicos, é importante ressaltar que o sedentarismo ainda se configura como o FR modificável predisponente para doenças crônicas que possui maior prevalência quando comparado aos demais (tabagismo, dieta, etc...) (WARBURTON et al., 2006).

Os indivíduos inativos fisicamente, mesmo que sem presença de patologias, estão propensos à maior produção de marcadores inflamatórios como a PCR (GLEESON et al., 2011). O sedentarismo leva ao acúmulo de gordura visceral e isto é acompanhado da infiltração de células imunes pro-inflamatórias no tecido adiposo e aumento da liberação de adipocitocinas e o desenvolvimento de um estado inflamatório sistêmico de baixo grau. Este quadro futuramente pode se configurar como um prognóstico para doenças cardiovasculares (PEDERSEN et al., 2006).

Os efeitos benéficos do exercício físico regular e moderado têm sido descritos desde as décadas passadas (GOMEZ-CABRERA et al., 2008). Existem evidências

irrefutáveis sobre a efetividade da atividade física regular na prevenção primária e secundária de diversas doenças crônicas, como diabetes, câncer, obesidade, depressão, osteoporose, doenças cardiovasculares e hipertensão, além de morte prematura (WARBURTON et al., 2006; GOMEZ-CABRERA et al., 2008; GLEESON et al., 2011).

Dentro dos mecanismos deste tipo de prevenção/tratamento está relacionada a modulação do perfil lipídico, através da diminuição dos níveis de colesterol e LDL e aumento nos níveis de HDL, diminuição do percentual de gordura intra-abdominal, modulações no estado redox da célula e, de suma importância, o exercício exerce papel anti-inflamatório em decorrência às adaptações ao treinamento (GUEDES & GUEDES, 2005; WARBURTON et al., 2006; GOMEZ-CABRERA et al., 2008; PASCHALIS et al., 2010; GLEESON et al., 2011).

A modulação do perfil lipídico através do exercício físico se dá através de uma maior demanda muscular por lipídeos como fontes energéticas tanto no momento da atividade quanto na recuperação para a regeneração das fibras musculares (HERZBERG, 2004; PASCHALIS et al., 2010). Durante o exercício físico, há uma maior atividade da lipoproteína lípase, o que, em última instância aumenta a degradação de triglicérides e a mobilização de ácidos graxos de diversas fontes.

De acordo com Herzberg (2004), o fato de o exercício aeróbico ser relacionado com a redução do risco de doenças cardiovasculares deve-se pelo menos parcialmente por mudanças na circulação de lipoproteínas resultantes de mudanças adaptativas nas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. Acompanhando essa redução na massa gorda (principalmente a visceral), observa-se a redução na liberação de adipocitocinas, o que configura um dos mecanismos anti-inflamatórios relacionados à prática regular de exercícios físicos (GLEESON et al., 2011).

Em recente trabalho de revisão, Gleeson et al. (2011) apontam para outros dois mecanismos anti-inflamatórios decorrentes da prática regular de exercício físicos, que são: aumento da produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias a partir das células do músculo esquelético (moléculas denominadas “miocinas”) e expressão reduzida de Toll-like receptors (TLRs) em monócitos e macrófagos. Este último, configura-se como o fator responsável pelas respostas sistêmicas observadas, como a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuição

dos níveis de PCR e inibição da expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias (GLEESON et al., 2011).

Tendo conhecimentos dos benefícios do exercício, é crescente o número de indivíduos que procuram esta prática como um meio alternativo para o tratamento de doenças crônicas e promoção da saúde. Diversos estudos relatam que o exercício aeróbico moderado tem sido eficaz quanto à redução da PA e da FC de repouso e o tipo de exercício a ser realizado parece não ter influência quanto a esse resultado (BRIFFA & BRIFFA, 2002; FAGARD & CORNELISSEN, 2007, CHRYSANT, 2010).

Os mecanismos responsáveis pela redução da pressão, em indivíduos hipertensos, promovidos pelo exercício moderado aeróbico parecem estar relacionados com a redução na resistência vascular periférica, na qual o sistema simpático e o sistema renina-angiotensina parecem estar envolvidos (O'SULLIVAN & BELL, 2000; FAGARD & CORNELISSEN, 2007). Além disso, foram observados como benefícios do exercício moderado a redução na atividade simpática cardiovascular (IZDEBSKA et al., 2004), redução no débito cardíaco (KINOSHITA et al., 1988; HAGBERG et al., 1989), além do aumento dos níveis de ON, através da indução da enzima óxido nítrico sintase (MAEDA et al., 2004).

Diversos estudos relatam a diminuição da pressão sanguínea em decorrência do exercício físico regular tanto em humanos quanto em animais. Com relação aos modelos experimentais de hipertensão, o condicionamento físico foi capaz de reduzir eficientemente a pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos (TIPTON et al., 1991; VERAS-SILVA et al., 1997), ratos com hipertensão induzida através da dieta rica em sal (NaCl) (SHEPHERD et al., 1982), ratos com hipertensão induzida através da administração crônica de acetato de deoxicorticosterona (FREGLY, 1984), ratos com hipertensão induzida através da manipulação de artérias renais (MARCUS & TIPTON, 1985) e ratos com hipertensão induzida através da administração de L-NAME (HUSAIN, 2002; KURU et al., 2002; KURU et al., 2009).

Com relação aos efeitos do exercício sobre a função renal na hipertensão, observa-se que ainda não existem dados conclusivos. A maioria dos estudos apontam uma correlação positiva entre o nível de condicionamento físico, diminuição da pressão sanguínea e baixos níveis séricos de ácido úrico (medida usada tanto

como marcador inflamatório quanto de dano renal) (TRAPÉ et al., 2013; NETO et al., 2013).

Dentre os numerosos efeitos do exercício, é importante ressaltar que, atualmente, os estudos tem direcionado a atenção para os efeitos do treinamento físico sobre a função endotelial. Em ampla revisão realizada por Skrypnik et al. (2014), observou-se que a atividade física regular reduz em até 70% a inflamação, corroborando com o descrito por Gleeson et al. (2011) sobre os efeitos anti-inflamatórios da prática regular de exercícios. Em importante estudo realizado por Ryan et al. (2014) verificou-se uma clara relação entre a redução da pressão sanguínea e a redução dos níveis de marcadores inflamatórios como a PCR e outras moléculas de adesão celular.

É importante frisar que os efeitos benéficos advindos dessa prática ocorrem não durante uma sessão aguda de exercício, mas sim em decorrência das adaptações que ocorrem no organismo cronicamente, ou seja, após diversos estímulos agudos (GLEESON et al., 2011; DALY et al., 2014; SKRYPNIK et al., 2014). No momento do exercício, ocorrem muitas alterações metabólicas, a maioria delas decorrentes das contrações musculares e da maior demanda por O₂ exigida para o suprimento energético correto, ou seja, maior produção de ATP é necessária para a atividade ATPásica dos filamentos de actina e miosina que compõem as fibras musculares (GUEDES & GUEDES, 2005; GLEESON et al., 2011).

Dessa forma, os efeitos agudos do exercício podem ser compreendidos como deletérios ao organismo, pois envolvem dano tecidual, liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumentos nos marcadores inflamatórios clássicos. Esses fatores estão relacionados a maior produção de EROs (JACKSON, 2000). Essa produção de EROs e o conseqüente dano tecidual resultantes do exercício agudo ocorrem principalmente devido ao fluxo maior de oxigênio intracelular que causa o aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (JACKSON, 2000).

Estes eventos pró-oxidantes estão ligados às alterações pró-inflamatórias decorrentes do exercício. Mais especificamente, estudos recentes apontam para o fato de que durante uma sessão de exercícios, ocorre o aumento dos níveis circulantes de IL-6 proveniente das células do músculo esquelético (GLEESON et al., 2011; SLATTERY et al., 2014). Com o exercício prolongado, estes níveis podem aumentar mais de 100 vezes, mas aumentos mais modestos já são observados em

exercícios de curta duração (GLEESON et al., 2011). Entretanto, com o exercício crônico, observa-se o aumento dos níveis circulantes de IL-10 e do antagonista dos receptores de IL-1, citocinas anti-inflamatórias. Segundo Steensberg et al. (2003), este aumento de citocinas anti-inflamatórias é proveniente do aumento agudo da IL-6.

De acordo com o exposto acima, compreende-se que as alterações pró-inflamatórias que ocorrem através de estímulos agudos são responsáveis pelo fortalecimento na capacidade anti-inflamatória do organismo a longo prazo. Isto porque os estímulos gerados durante o exercício atuam como sinais para o aumento na concentração de moléculas anti-inflamatórias (GLEESON et al., 2011). Sendo assim, é possível afirmar que o exercício aeróbico moderado, quando realizado por um longo prazo, tem a capacidade de atuar como um evento anti-inflamatório.

Entretanto, é importante notar que os mecanismos moleculares diretos e indiretos pelos quais o exercício influencia a função imune ainda precisam ser melhor esclarecidos. Neste sentido, considera-se imprescindível a investigação de sistemas adjacentes relacionados à inflamação, como é o caso dos sistemas purinérgico e colinérgico.

A relação entre a prática de exercícios e o sistema purinérgico configura-se como um campo de pesquisa novo e que necessita ser melhor compreendido. Até o momento, existem muitas informações existentes sobre o papel do ATP e da adenosina na regulação do fluxo sanguíneo em resposta ao exercício (GORMAN & FEIGL, 2012), mas pouco se sabe a respeito do papel das ectonucleotidases neste processo, e há uma grande lacuna na literatura com relação às adaptações crônicas advindas da prática regular de atividades físicas no sistema purinérgico.

Com relação ao exercício agudo, artigos recentes salientam o papel do ATP liberado pelas células vermelhas como sendo fundamental na vasodilatação (GORMAN & FEIGL, 2012). O fluxo sanguíneo, quando o músculo esquelético está se contraindo, é regulado principalmente para suprir os tecidos com oxigênio de acordo com sua utilização, ou o mais próximo disso que for possível para o organismo. As células vermelhas, principais carreadoras de O₂ no sangue, contribuem para a regulação dos processos locais de suprimento e demanda por O₂. Isto é realizado possivelmente pela habilidade das células vermelhas em liberar ATP, que, ligando-se aos receptores P2 nas células endoteliais funciona como uma

substância vasoativa em resposta à redução do O₂ no plasma e nos eritrócitos (ALONSO, 2012). Além da baixa concentração de O₂, as células vermelhas liberam ATP quando expostas a outros estímulos como o “*shear stress*” (que significa o estresse mecânico/de cisalhamento gerado pelo aumento do fluxo sanguíneo) aumentado e deformações mecânicas, condições que também ocorrem na microcirculação do músculo esquelético ativo (ALONSO, 2012).

Após a ligação do ATP aos receptores purinérgicos expressos no endotélio das microveias e nas células musculares lisas, ele estimula a síntese de ON, prostaglandinas e do fator hiperpolarizador derivado do endotélio (EDHF) e possivelmente outros sinais vasoativos. A ativação da eNOS e da via do ácido araquidônico [que leva a formação das prostaglandinas e prostaciclina (PGI₂) e ácidos eicosatrienóicos (Ác E)] se deve principalmente ao aumento da concentração de cálcio intracelular. Nas células musculares lisas, essas moléculas são responsáveis por ativar o monofosfato de guanosina-3',5'-cíclico (cGMP), o qual pode promover o aumento dos níveis de monofosfato de adenosina-3',5'-cíclico (AMPc) através da inibição da fosfodiesterase III (a qual degrada o AMPc), gerando o relaxamento vascular (Figura 6) (ALONSO, 2012; HELLSTEN et al., 2012).

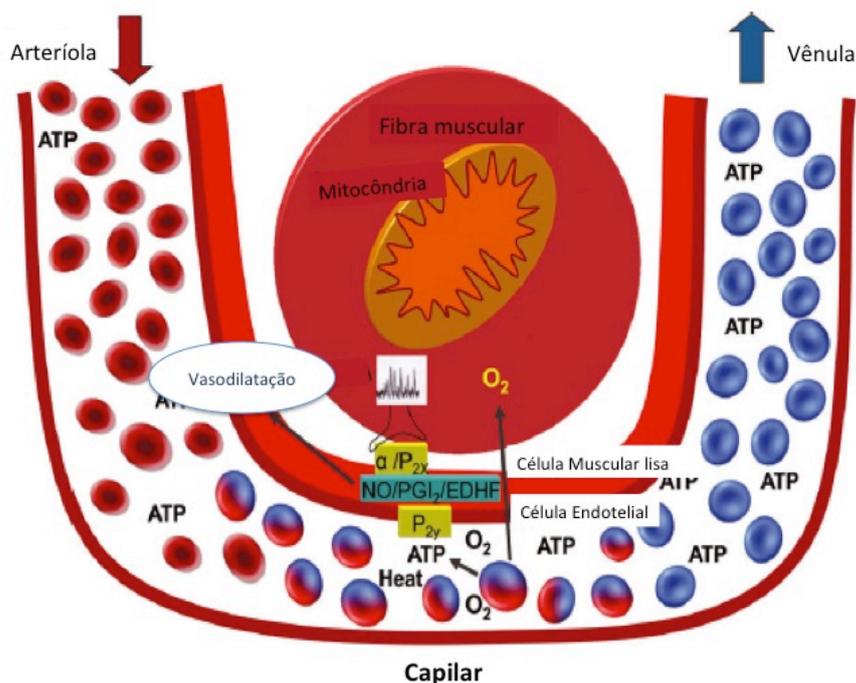


Figura 6 - Digrama esquemático ilustrando como o ATP derivado dos eritrócitos contribui para o suprimento de O₂ às células musculares ativas.

FONTE: Alonso (2012), com adaptações.

Esse ATP liberado também pode ser degradado pelas ectonucleotidases endoteliais (especialmente a NTPDase1 e a ecto-5'-nucleotidase) para formar a adenosina. Esta, por sua vez, tem a habilidade de se ligar aos receptores P1 e exercer os mesmos efeitos do ATP, induzindo a vasodilatação (HELLSTEN et al., 2012).

Durante a ativação muscular, observa-se ainda, que a ACh também funciona como vasodilatador e, através da ativação dos receptores M3 e M5 nas células endoteliais, desencadeia as mesmas respostas observadas com relação ao ATP e à adenosina (HELLSTEN et al., 2012). A sinalização pelos receptores purinérgicos P2 e P1 e pelos receptores colinérgicos M3 e M5 nas células endoteliais ativa o influxo de cálcio e liberação do mesmo de vesículas citoplasmáticas. A partir daí, diversas vias de sinalização são ativadas e ocorre o aumento de substâncias vasoativas como ÁcE, EDHF, ON e PGI₂. Principalmente PGI₂ e ON são responsáveis pela ativação de AMPc e cGMP, respectivamente. Essas moléculas geram o efeito de vasodilatação nas células musculares lisas vasculares (FIGURA 7).

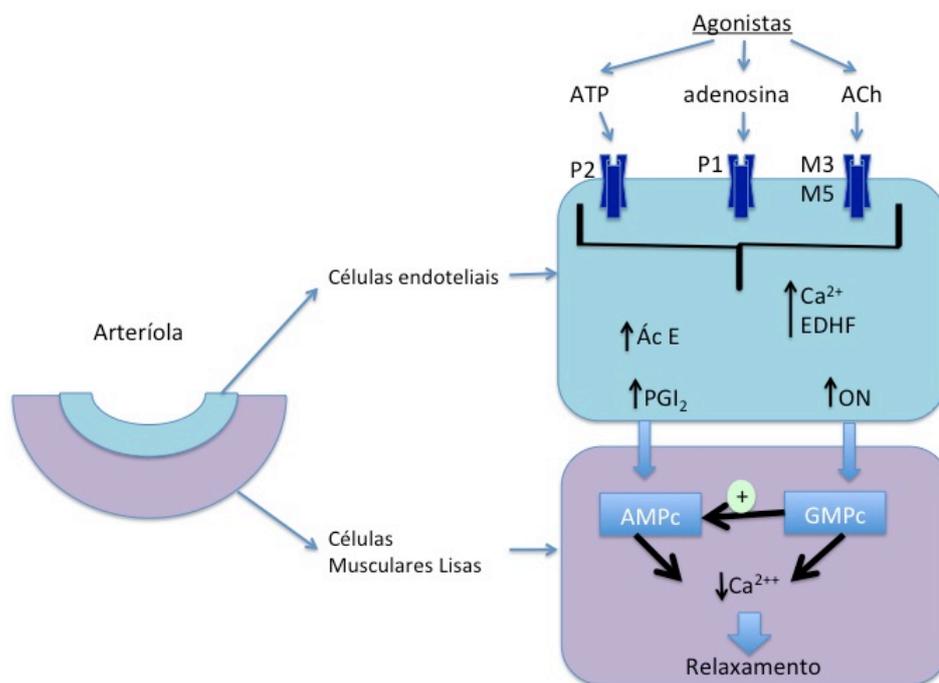


Figura 7 - Desenho esquemático da ação do ATP, da adenosina e da ACh sobre seus respectivos receptores nas células endoteliais.

FONTE: Hellsten et al. (2012), com adaptações.

O ATP e a adenosina são mediadores de sinal interessantes para a regulação do fluxo sanguíneo do músculo esquelético não apenas porque ele age como um potente vasodilatador, mas também em função de suas propriedades simpáticas (ALONSO, 2012; HELLSTEN et al., 2012). Estas propriedades são essenciais para conter os efeitos vasoconstritores concorrentes, provenientes do aumento da atividade nervosa simpática no músculo e de outras substâncias vasoconstritoras que circulam durante o exercício.

A comparação das propriedades vasoativas relativas do ATP sugere que o ATP intravascular exerce seus efeitos vasodilatadores e simpáticos diretamente e não através de seus produtos (ROSENMEIER et al., 2008). Entretanto, a maioria dos estudos continua pontuando a adenosina como um dos principais responsáveis pela indução da vasodilatação (HELLSTEN et al., 2012).

Alterações nas funções plaquetárias e aumento nas concentrações de ADP também foram encontrados em resposta ao exercício agudo (YEGUTKIN et al.,

2007). Singh et al. (2006) analisaram a reatividade das plaquetas em resposta a uma sessão de exercício agudo moderado em sujeitos treinados e sedentários. Os autores observaram que ambos os grupos tiveram um aumento na agregação plaquetária, mas esta foi mais pronunciada em indivíduos sedentários, o que aponta para risco de evento cardiovascular em resposta a sessão aguda de exercício em indivíduos sedentários que já tenham alguma pré-disposição às DCV.

De maior relevância, o estudo acima referido reforça o fato de que, cronicamente, o exercício físico é capaz de produzir adaptações plaquetárias que geram a redução de sua ativação, sendo, dessa forma, cardioprotetor (SINGH et al., 2006). Entretanto, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre possíveis efeitos do exercício físico aeróbico moderado sobre as funções plaquetárias e a atividade das ectonucleotidases na hipertensão.

Levando-se em conta que durante o exercício, existe uma grande liberação de ATP por parte das células vermelhas e o ATP funciona como um sinal de dano (causando ativação de linfócitos), isto pode favorecer o desencadeamento das respostas pró-inflamatórias verificadas durante uma sessão de exercício (produção de IL-6, por exemplo).

Por outro lado, tendo em vista que o exercício gera um aumento da atividade colinérgica e maior liberação da ACh, e esta molécula é conhecida por ter ações anti-inflamatórias e suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (DAS, 2007), este efeito agudo do exercício em aumentar a produção de moléculas pró-inflamatórias não seria esperado. Entretanto, está claro na literatura que o exercício agudo, em intensidade moderada e/ou intensa, produz efeitos pró-inflamatórios (GLEESON et al., 2011). Dessa forma, especula-se que mesmo que a ACh esteja sendo liberada em maior quantidade, no momento do exercício ela pode estar agindo apenas nas células endoteliais para induzir o relaxamento vascular e não está exercendo suas ações nos linfócitos.

O que fica claro a partir das proposições já descritas é que muitos mecanismos estão implicados nos efeitos do exercício físico sobre o organismo. Existe uma diferença entre as respostas agudas e crônicas que são, em sua maioria, opostas. Observa-se, claramente, que o envolvimento dos sistemas purinérgico e colinérgico são imprescindíveis para estas respostas e que as adaptações benéficas relativas à prática regular de exercícios físicos moderados é dependente do

envolvimento desses sistemas. O mesmo pode se concluir com relação aos nucleotídeos de adenina, a adenosina e a acetilcolina na hipertensão. Estas moléculas possuem papéis fundamentais nas respostas geradas pela patologia e seus desequilíbrios podem contribuir para as complicações advindas da mesma, embora isto ainda não esteja claro na literatura.

Desta forma, observa-se que as enzimas responsáveis pela hidrólise dessas moléculas e que, conseqüentemente regulam os níveis destas, possuem papel chave na manutenção e regulação das respostas por elas produzidas, sendo fundamentais quando se analisa as condições fisiológicas e patofisiológicas relativas à esses sistemas.

Tendo em vista que a hipertensão é acompanhada de alterações em marcadores inflamatórios sistêmicos, e, dessa forma, pode estar relacionada à mudanças nas atividades das ectonucleotidases e colinesterases em componentes sanguíneos, e que o exercício físico pode ter um papel modulador sobre estas variáveis, torna-se importante o estudo dos mecanismos patofisiológicos desta doença e a possível contribuição do exercício físico no controle da mesma, como uma forma de tratamento não-medicamentoso.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito do exercício físico sobre a atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico em sangue, bem como sobre a agregação plaquetária, em ratos com hipertensão induzida através de administração de L-NAME.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar, em ratos com hipertensão induzida através da administração de L-NAME, o efeito de seis semanas de natação sobre:
 - Os parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial sistólica e frequência cardíaca).
 - A atividade das enzimas NTPDase, E-NPP, ecto-5'-nucleotidase e ADA em plaquetas, bem como sobre a agregação plaquetária.
 - A atividade das enzimas NTPDase e ADA e a expressão da enzima NTPDase1 em linfócitos.
 - A atividade das enzimas AChE em linfócitos e sangue total e BuChE em soro.
 - O perfil lipídico (colesterol total e triglicerídeos) e os níveis de marcadores inflamatórios em soro (PCR, MPO e ácido úrico).

- Analisar o efeito agudo de uma sessão de natação sobre a atividade das enzimas NTPDase e ADA em plaquetas e linfócitos, E- NPP e ecto-5'-nucleotidase em plaquetas, AChE em linfócitos e sangue total e BuChE em soro de ratos saudáveis.

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos publicados e um manuscrito, os quais encontram-se no item “**ARTIGOS E MANUSCRITO**”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios artigos e no manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados apresentados nos artigos e no manuscrito contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

3. ARTIGOS E MANUSCRITO

3.1 Artigo 1

**O exercício regular previne alterações nas ecto-nucleotidases em
plaquetas de ratos hipertensos**

**Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in
platelets of hypertensive rats**

Andréia Machado Cardoso, Margarete Dulce Bagatini, Caroline Curry Martins, Fátima Hussein Abdalla, Daniela Zanini, Roberta Schmatz, Jessié Gutierrez, Victor Camera Pimentel, Gustavo Thomé, Claudio Alberto Martins Leal, Juliano Marchi Vieira, Naiara Stefanello, Fernando da Silva Fiorin, Jucimara Baldissareli, Luiz Fernando Freire Royes, Adriane Bello Klein, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger

Publicado na revista “Molecular and Cellular Biochemistry

Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats

Andréia Machado Cardoso · Margarete Dulce Bagatini · Caroline Curry Martins ·
Fátima Hussein Abdalla · Daniela Zanini · Roberta Schmatz · Jessié Gutierrez ·
Victor Camera Pimentel · Gustavo Thomé · Claudio Alberto Martins Leal ·
Juliano Marchi Vieira · Naiara Stefanello · Fernando da Silva Fiorin ·
Jucimara Baldissareli · Luiz Fernando Freire Royes · Adriane Bello Klein ·
Vera Maria Morsch · Maria Rosa Chitolina Schetinger

Received: 25 April 2012 / Accepted: 3 August 2012 / Published online: 23 August 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract In this study, we investigated the effect of 6 weeks of swimming training on the ecto-nucleotidase activities and platelet aggregation from rats that developed hypertension in response to oral administration of L-NAME. The rats were divided into four groups: control ($n = 10$), exercise ($n = 10$), L-NAME ($n = 10$), and exercise L-NAME ($n = 10$). The animals were trained five

times per week in an adapted swimming system for 60 min with a gradual increase of the workload up to 5 % of animal's body weight. The results showed an increase in ATP, ADP, AMP, and adenosine hydrolysis, indicating an augment in NTPDase (from 35.3 ± 8.1 to 53.0 ± 15.1 nmol Pi/min/mg protein for ATP; and from 21.7 ± 7.0 to 46.4 ± 15.6 nmol Pi/min/mg protein for ADP as substrate), ecto-5'-nucleotidase (from 8.0 ± 5.7 to 28.1 ± 6.9 nmol Pi/min/mg protein), and ADA (from 0.8 ± 0.5 to 3.9 ± 0.8 U/L) activities in platelets from L-NAME-treated rats when compared to other groups ($p < 0.05$). A significant augment on platelet aggregation in L-NAME group was also observed. Exercise training was efficient in preventing these alterations in the exercise L-NAME group, besides showing a significant hypotensive effect. In conclusion, our results clearly indicated a protector action of moderate intensity exercise on nucleotides and nucleoside hydrolysis and on platelet aggregation, which highlights the exercise training effect to avoid hypertension complications related to ecto-nucleotidase activities.

A. M. Cardoso · 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 · V. M. Morsch ·
M. R. C. Schetinger
Post-Graduation Program in Toxicological Biochemistry,
Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences,
Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

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 ·
M. R. C. Schetinger
Health Basic Sciences Institute, Department of Physiology
of Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

M. D. Bagatini
Collegiate of Nursing, University of Southern Frontier,
Chapecó Campus, Chapecó, SC, Brazil

M. D. Bagatini (✉)
Curso de Enfermagem, Universidade Federal da Fronteira Sul,
Chapecó, SC 89812-000, Brazil
e-mail: margaretebagatini@yahoo.com.br

M. R. C. Schetinger (✉)
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e
Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima,
Santa Maria, RS 97105-900, Brazil
e-mail: mariachitolina@gmail.com

Keywords Hypertension · L-NAME · Ecto-nucleotidases · Platelet aggregation · Exercise training

Introduction

Currently, hypertension affects more than 1 billion adults worldwide and 90–95 % of these patients have essential hypertension [1]. This disease is considered an independent risk factor for stroke, myocardial infarction, heart failure, and arterial aneurysm, besides being the leading cause of chronic renal failure [2].

It is well established that nitric oxide (NO) produced in the vascular endothelial cells shows a potent vasodilator

effect [3] and plays an important role in the local regulation of platelet–vessel wall interactions as well as in vascular resistance and growth [4]. On the basis of these effects, NO has been proposed to have antihypertensive, antithrombotic, and anti-atherosclerotic properties [3].

The chronic inhibition of NO produces volume-dependent elevation of blood pressure and its physiological and pathological characteristics resemble essential hypertension [5]. Several studies have administered in vivo an inhibitor of nitric oxide biosynthesis, the *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), which is an L-arginine analog, to induce hypertension in rats [6–8].

Extracellular nucleotides and nucleosides released by platelets in vasculature have an important participation in the regulation of thrombus formation, being some of the most important blood molecules involved in the regulation of blood flow [9, 10]. Platelet aggregation can be described as having a central role in hypertension complications and ADP released by platelets is a molecule that exhibits a potent induction of this phenomenon, even in micromolar concentrations. On the other hand, adenosine, which is the final product of ATP hydrolysis, plays an important role in the purinergic metabolism, inhibiting platelet aggregation and exerting a reduction of the vascular injury [9]. ATP seems to have a dual role in the induction and/or inhibition of platelet activation, i.e., at low concentrations, ATP can induce platelet aggregation, whereas at high concentrations, it can inhibit such situation [11, 12].

Recent studies [7, 8] and works developed by our group [13, 14] have correlated alterations in extracellular nucleotides and nucleosides and hypertension, suggesting that the purinergic system is altered in this pathology. Moreover, it is important to underline that these extracellular molecules are important signaling that mediate diverse biological and pathological processes in several tissues as already demonstrated by our research group [15–18]. This way, the levels of these molecules must be carefully controlled.

The importance of adenine nucleotides in homeostasis and thrombosis is greatly correlated with the essential role of an enzymatic system that provides an adequate control of these signaling molecules in the vascular system. This complex is composed by the enzymes NTPDase (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase), that hydrolyzes ATP and ADP to AMP [20]; E-NPP (nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) that converts 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives producing AMP [21]; ecto-5'-nucleotidase, that hydrolyzing AMP produces adenosine [10, 19]; and, ecto-adenosine deaminase (ADA) that converts adenosine to inosine and is described as the last enzyme in the purinergic cascade, having an important role in the regulation of platelet activation [22].

People exercise daily to maintain good cardiovascular health. Many people with cardiovascular diseases are

engaged in organized group exercise rehabilitation programs or pursue individual exercise with or without medication [23]. However, the effects of physical training on ecto-nucleotidase activities in platelets are still unknown, although it has been recently evidenced that when red blood cells are exposed to a low oxygen tension environment, as in an exercise session, they release ATP and its metabolites, and there is the involvement of nucleotidases in this process as a way to control blood flow [24]. Indeed, the information available about exercises, mainly their chronic effects, and ecto-nucleotidases is very scarce, highlighting the importance of this study.

According to what was described above, the enzymes E-NTPDase, E-NPP, ecto-5'-nucleotidase, and ADA are present on the surface of intact platelets [7, 19] and their activities are altered in hypertension [7]. On the other hand, physical exercise is recognized by having hypotensive effects and it has been hypothesized that it could contribute to the ecto-nucleotidase modulation in favor of maintaining good cardiovascular health. This way, in this study we investigated the ecto-nucleotidase activities in the platelets of rats that developed hypertension in response to the oral administration of L-NAME and the effect of physical exercise on ecto-nucleotidase activities of these hypertensive rats comparing with normotensive control animals and normotensive exercised animals. Moreover, we investigated changes in the ecto-nucleotidase activities after an acute single bout of swimming in order to explain exercise chronic alterations.

Materials and methods

Chemicals

The substrates ATP, ADP, AMP, *p*-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP), adenosine, as well as Trizma base, sodium azide HEPES, L-NAME, and Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) and bovine serum albumin, K₂HPO₄, from Reagen (Colombo, PR, Brazil). All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days; 220–300 g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23 ± 1 °C) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria

Table 1 Swimming protocol, with training time from 1st to 6th week, held from Monday to Friday

Week	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
1st	20 min. wo	30 min. wo	40 min. wo	50 min. wo	60 min. wo
2nd	40 min. 2 % bw	50 min. 2 % bw	60 min. 2 % bw	60 min. 2 % bw	60 min. 2 % bw
3rd	40 min. 5 % bw	50 min. 5 % bw	60 min. 5 % bw	60 min. 5 % bw	60 min. 5 % bw
4th, 5th, 6th	60 min. 5 % bw				

wo without overload, bw body weight ($n = 10$ to each group)

(protocol under number: 029/2011). All protocols are in accordance with the guidelines of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council) and all efforts were made to minimize the number of animals used in this study and their suffering.

Experimental protocol

Rats were randomly divided into four groups, normotensive (Control), normotensive plus exercise (Exercise), hypertensive (α -NAME), and hypertensive plus exercise (Exercise α -NAME). In the hypertensive groups, hypertension was induced by the oral administration of the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor α -NAME (30 mg/kg bodyweight/day) [7] by gavage during all experiment (α -NAME-treated groups). In the normotensive groups, the animals received water by gavage throughout the entire experiment to be submitted to the same stress (control groups). These rats were euthanized 24 h after the last exercise session [25] and blood was collected by cardiac puncture.

Exercise protocol

Swimming was the exercise chosen for this study. The protocol used was according to the protocols adapted from Medeiros et al. [26] and Gobatto et al. [27] as follows.

Swimming protocol

All rats were adapted to water before training beginning. The adaptation was to keep the animals in shallow water at 31 ± 1 °C [26, 27] for 5 days, with duration of 1 h. This procedure was performed in the same time of the day. The adjustment reduces stress, without, however, promoting adaptations to the training.

The animals were trained five times per week in an adapted swimming system with water heated to 31 ± 1 °C for 6 weeks with duration of 60 min. The workload

(weight on the back) was gradually increased up to 5 % of the animal's body weight (Table 1).

According to Medeiros et al. [26], this protocol is regarded as training of moderate intensity and long duration, and it is effective in promoting cardiovascular adaptations and increased muscle oxidative capacity.

The sedentary animals were placed in shallow water, heated to 31 ± 1 °C, 30 min, 5 days a week to be subjected to the same stress, however, without suffering the effects of physical training.

Acute exercise protocol

With the purpose to complement the work and explain chronic changes in ecto-nucleotidase activities, we aimed to verify changes in these enzymes due to an acute bout of exercise. A number of ten healthy normotensive rats were randomly divided into two groups: a group which should remain at rest ($n = 5$) and a group which was submitted to an adaptation training week before the swimming test. In the swimming session test rats performed 60 min of swimming with 5 % animal's body weight workload (weight on the back). Rats were killed immediately after the acute swimming test, blood was collected and platelets were separated to further analysis.

Hemodynamic parameter determination

In all rats, systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were measured in awake animals, by tail-cuff plethysmography (Kent Scientific; RTBP1001 Rat Tail Blood Pressure System for rats and mice, Litchfield, USA). Rats were conditioned with the apparatus before measurements were taken. SBP was recorded at the end of experiment (last treatment week). The heart rate values were derived from the pulsations detected by SBP.

Platelet preparation

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al. [28] with the following minor modifications.

Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant. The total blood-citrate system was centrifuged at $160\times g$ during 15 min. After this, one part of PRP was used for determine platelet aggregation. The rest of PRP was centrifuged at $1,400\times g$ for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl, and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activity determination

As described by Lunkes et al. [28], the NTPDase measure was performed in a medium containing 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose, and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 μL . The ecto-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described by Lunkes et al. [28] to measure AMP hydrolysis. However, the 5 mM CaCl_2 was replaced by 10 mM MgCl_2 to perform the assay. The enzyme activities were expressed as nmol Pi released/min/mg of protein. In brief, 20 μL of the enzyme preparation were added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and AMP at a concentration final of 2 mM. The time of incubation was 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μL of 10 % trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5 %. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [29] using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after TCA addition.

E-NPP activity determination: measurement of *p*-Nph-5'-TMP hydrolysis in platelets

As previously described by Fürstenu et al. [19], the Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) determination was measured using *p*-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (*p*-Nph-5'-TMP) as substrate and was expressed as nmol of *p*-nitrophenol released per minute per milligram of protein (nmol *p*-nitrophenol released/min/mg protein). The reaction medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 60 mM glucose, and 5.0 mM CaCl_2 , pH 8.9, was preincubated with approximately 20 mg per tube of platelet protein for 10 min at 37 °C in a final volume of 200 μL . The enzyme reaction was started by the addition of *p*-Nph-5'-TMP at a

final concentration of 0.5 mM. After 80 min of incubation, 200 μL NaOH 0.2 N was added to the medium to stop the reaction. The amount of *p*-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of $18.8 \times 10^{-3}/\text{M}/\text{cm}$.

Adenosine deaminase activity determination (ADA)

ADA activity determination was performed as described by Guisti and Galanti [22] which is based on the direct measurement of the formation of ammonia, produced when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. In brief, 50 μL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7 and 0.9 mg/mL. Results were expressed in units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Platelet aggregation test

Sample was prepared according to Yun-Choi et al. [30]. The preparation of platelet-rich plasma (PRP) was obtained as previously described. After, the remained was once more centrifuged for 15 min at $2,000\times g$, to obtain the platelet poor plasma (PPP). A platelet count was performed in the PRP and it was adjusted to 300×10^3 platelets/mL, by dilution with PPP, obtaining the platelet equalized plasma (PEP).

For ex vivo platelet aggregation, the Born and Cross [31] technique was performed by turbidimetric measurement with a Chrono-log optical aggregometer, with AGGRO/LINK® Model 810-CA software for Windows version 5.1. After calibration of the aggregometer, the rats data concerning the assays and reagents were entered on a computer coupled to the equipment, and the test was then performed. Aggregation was measured at 37 °C and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline at 5 min after the addition of the agonist adenosine diphosphate (ADP) 10 and 5 μM , with platelet poor plasma as a reference.

Protein determination

Protein content was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [32], using bovine serum albumin as the standard. This assay is based on the binding of the dye Coomassie blue G-250 to protein, and this binding is accompanied by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SD and were analyzed statistically by two-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. For comparison of the two groups of acute protocol, was used student *t* test. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

In this study, the oral administration of L-NAME by gavage was associated with a significant rise in SBP when compared with the control groups, validating the hypertensive model. On the other hand, we could observe that exercise clearly possesses hypotensive effect, reducing significantly SBP in the exercise L-NAME group (Fig. 1).

No difference was observed in the food and water consumption after the administration of L-NAME among the experimental groups (data not shown). Moreover, the heart rate, expressed as cycles per minute (cpm), remained unchanged in the L-NAME-treated group and in the exercised groups compared with the respective control group. However, although not statistically significant, we could observe that in the exercised groups, heart rate values were lower than the control and L-NAME-treated groups, which was an expected result (Table 2). Regarding body weight (BW), no difference was observed among the experimental groups (data not shown).

Results obtained for NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in platelets are shown in Fig. 2. As can be

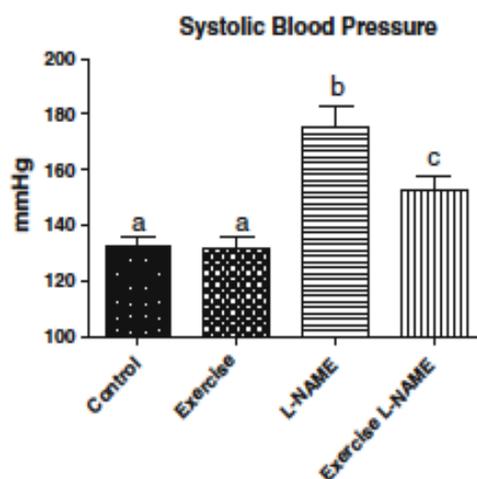


Fig. 1 Final systolic blood pressure (SBP) measurements of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. SBP was followed as described in materials. Data are presented as mean \pm SD. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 10$ to each group)

Table 2 Heart rate values of control group, exercise control group, L-NAME group, and exercise L-NAME group

	Control	Exercise	L-NAME	Exercise L-NAME
Heart rate (cpm)	469 \pm 57	435 \pm 47	481 \pm 56	452 \pm 51

Results are presented as mean \pm SD ($n = 10$ to each group)

observed, ATP, ADP, and AMP hydrolysis were significantly increased in the L-NAME-treated group when compared with the control groups and exercised L-NAME group ($p < 0.05$) (Fig. 2a–c). However, it is interesting to note that exercise per se had the ability to increase ADP hydrolysis in the exercise group and decrease ADP hydrolysis in the exercise L-NAME group (Fig. 2b). Regarding acute effect of a single bout exercise (Fig. 2d), we observed a significant rise in ATP, ADP, and AMP hydrolysis ($p < 0.05$).

Figure 3 shows ADA activity on chronic treatment (Fig. 3a) and acute exercise session (Fig. 3b). An increase in the ADA activity was observed in L-NAME-treated group when compared with other groups ($p < 0.05$) and swimming training was efficient in keeping the activity of this enzyme in levels close to normotensive groups (Fig. 3a). An acute bout of exercise clearly results in a significant rise in the ADA activity (Fig. 3b, $p < 0.05$).

Regarding E-NPP activity, no significant changes could be observed. However, there is an indicative that the E-NPP activity had an increase in the L-NAME-treated group when compared with other groups and that the exercise could prevent this, although these values did not reach significant levels (Fig. 4a). As a result of an acute bout of swimming, we also observed just an indicative of a rise in the E-NPP activity, but without statistic relevance (Fig. 4b).

Results obtained for platelet aggregation are shown in Fig. 5. As can be observed, there is a significant augment in platelet aggregation related to L-NAME-treated group at the two different concentrations of ADP (Fig. 5a, b), which was prevented by exercise in exercise L-NAME group.

Discussion

Several studies have shown the beneficial effects of regular physical activity in reducing the elevated blood pressure in both human [1, 33] and animal hypertension models. Regarding experimental models of hypertension, physical training was efficient in reducing blood pressure in spontaneously hypertensive rats [34], Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats [35], deoxycorticosterone acetate (DOCA)-induced hypertension [36], hypertension due to manipulation of kidney arteries [37], and hypertension induced by L-NAME administration [6, 38, 39].

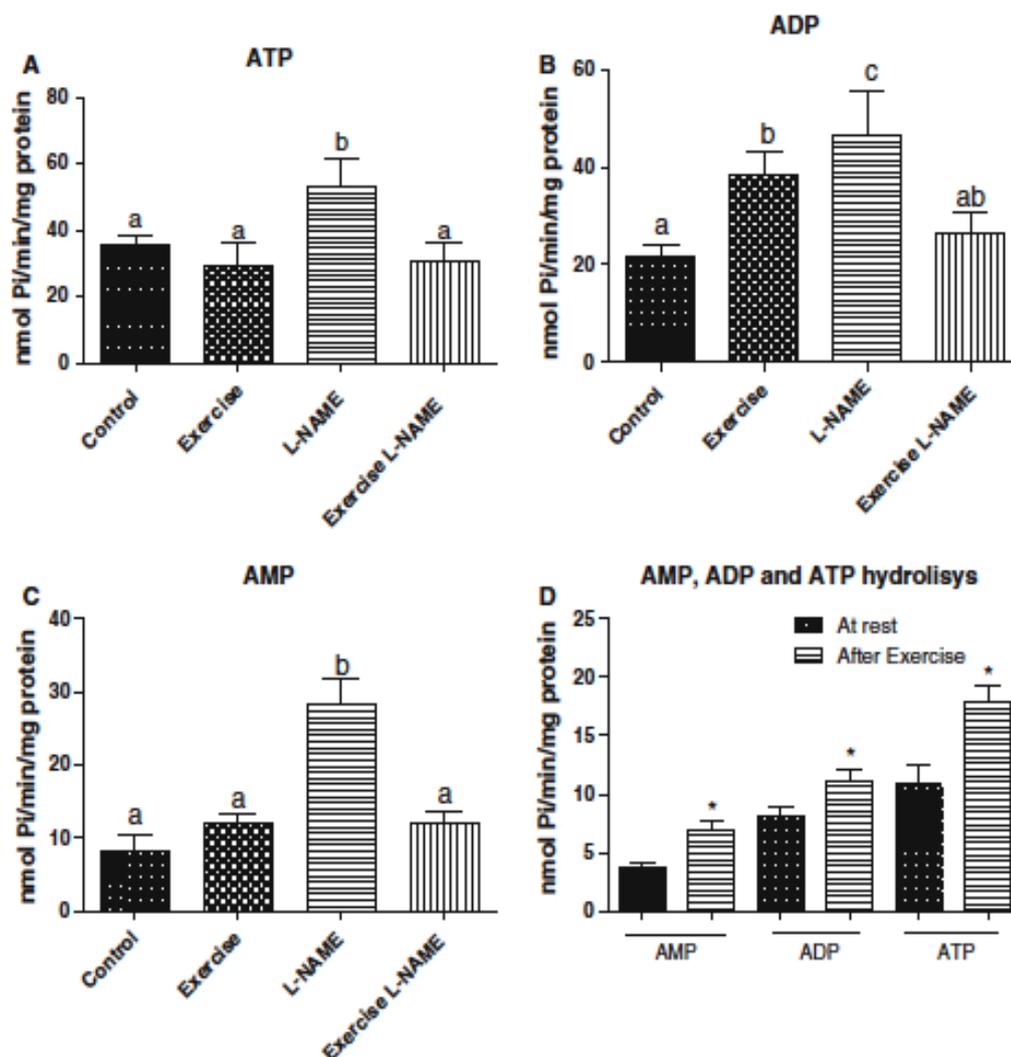


Fig. 2 a NTPDase (ATP), b NTPDase (ADP) and c ecto-5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. Data are presented as mean \pm SD. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 10$ to each group). d Ecto-5'

nucleotidase (AMP), NTPDases (ATP and ADP) activities in platelets of rats at rest and after an acute bout of exercise. Data are presented as mean \pm SD. *Mean difference between each nucleotide hydrolysis ($p < 0.05$, $n = 5$ to each group)

Encouraging regular physical exercise has been recommended by health professionals to maintain good cardiovascular fitness and prevent or treat hypertension. For the evaluation of training-related effects in hypertension models, several kinds of exercise protocols have been applied. Regularly performed aerobic exercises significantly reduce the high blood pressure in rats with spontaneous hypertension [36, 40] and in rats with hypertension induced by L-NAME administration [6, 38, 39] corroborating our results obtained with rats performing 6 weeks of swimming protocol, which corresponds to a moderate aerobic exercise.

The beneficial effects of physical exercises on hypertension have been explained by several pathways, including, for example, an increase in the nitric oxide production, which has a vasodilatation effect [41]. However, until now there are no studies proposing to assess ecto-nucleotidase activities, even noting that these enzymes are known as having cardioprotector effects [10]. This way, this is the first study that aimed to evaluate the ecto-nucleotidase activities related to exercise benefits in hypertension.

Ecto-nucleotidases are enzymes that have an interesting role in thromboregulation mechanisms. Alterations in their activities have been verified in various studies from our

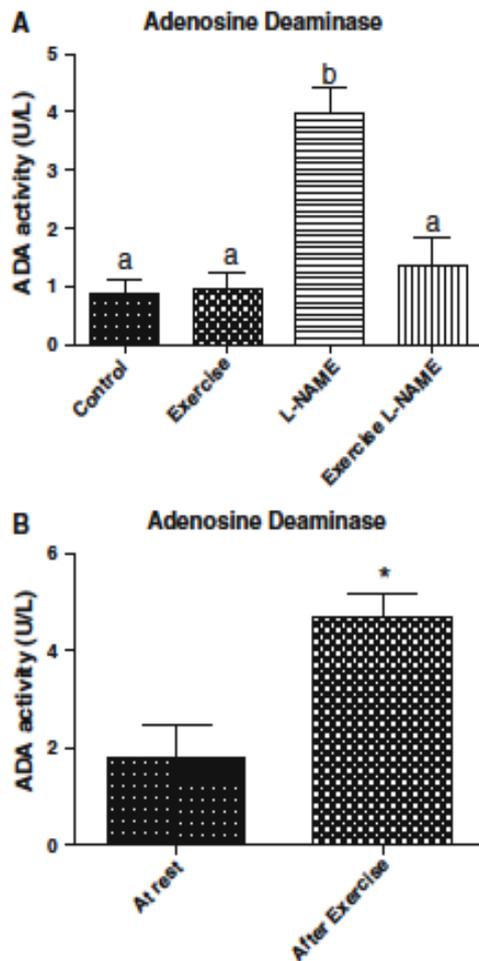


Fig. 3 **a** Adenosine deaminase (ADA) activity in platelets of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. Data are presented as mean \pm SD. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 10$ to each group). **b** Adenosine deaminase (ADA) activity in platelets of rats at rest and after an acute bout of exercise. Data are presented as mean \pm SD. *Mean difference between nucleoside hydrolysis ($p < 0.05$, $n = 5$ to each group)

group [34], suggesting that they could be important physiological and pathological parameters of several pathologies, including hypertension [14].

Regarding L-NAME-induced hypertension in rats, it has recently been demonstrated that ecto-nucleotidase activities are altered and a decrease was found in these enzyme activities [7] after 15 days of L-NAME administration. In contrast, our results showed an increase in the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in L-NAME treated rats after 60 days treatment in ATP, ADP, and AMP hydrolysis. These differences between studies could be related to the duration of L-NAME administration, since our study had a long-term duration when compared to Fürstenau et al. [7] study. Furthermore, is important to highlight that in

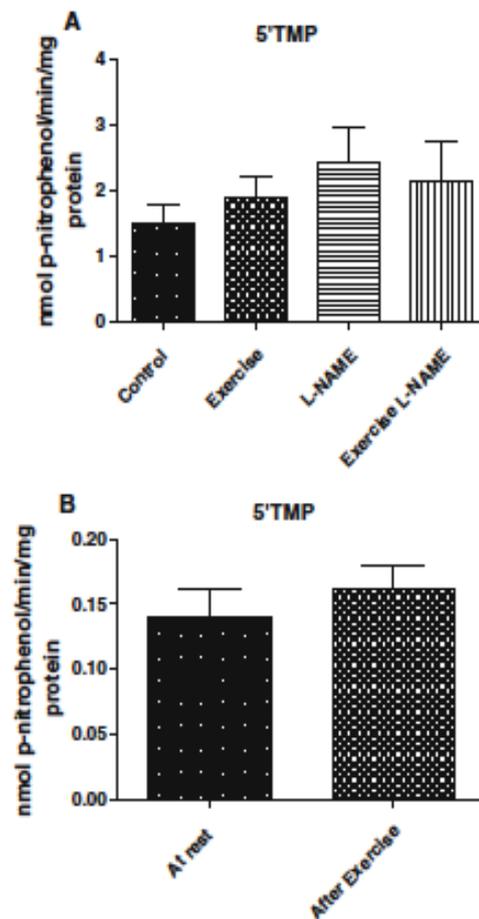


Fig. 4 **a** E-NPP activity in platelets of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group ($n = 10$ to each group). **b** E-NPP activity in platelets of rats at rest and after an acute bout of exercise ($n = 10$ to each group). Data are presented as mean \pm SD

Fürstenau et al. [7] study, they found a decreased in purine levels and suggested a compensatory mechanism of endothelial NTPDase 1 that could be activated in order to justify the depletion of ADP and AMP levels. This information can help us to clarify why in our study platelet ecto-nucleotidases are activated. With the prolonged time of L-NAME administration, these platelet enzymes, in L-NAME-treated rats of our study, can be doing the same role as endothelial NTPDase 1.

In this line of thought, we suggest that a compensatory mechanism of NTPDase (ATP and ADP) and ecto-5'-nucleotidase in platelets could be acting concerning the development of hypertension in the L-NAME group. Since ATP and ADP hydrolysis favors adenosine production, a rapid hydrolysis of these nucleotides is beneficial to hypertension control because of the vasodilatation and the inhibition of platelet aggregation

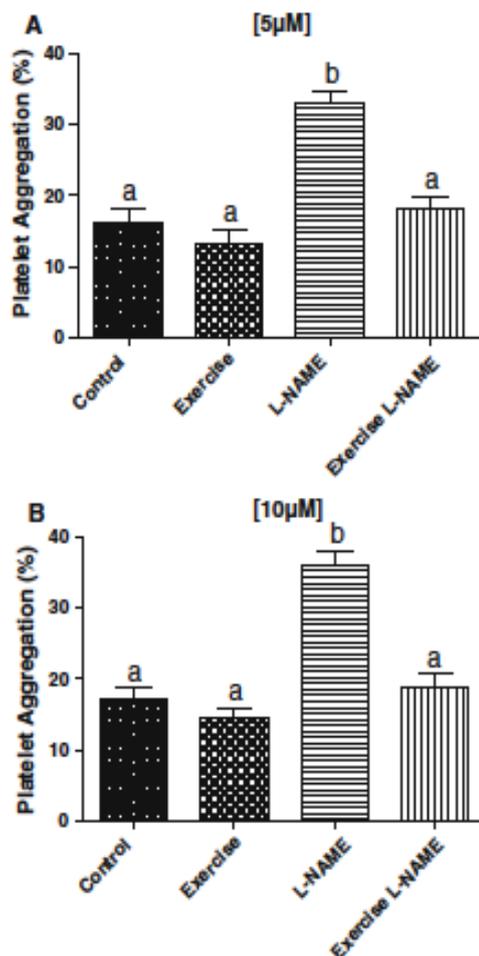


Fig. 5 Platelet aggregation profile of control group, exercise group, L-NAME group, and exercise L-NAME group. Platelet aggregation was evaluated by using ADP at concentrations of 5 and 10 μM as agonist (graphs a and b, respectively). The results are expressed as percentage of aggregation. Groups with different letters are statistically different ($p < 0.05$, $n = 10$ to each group)

properties of adenosine. Consequently, the organism could be avoiding thrombotic processes by compensatory ADP depletion and adenosine production.

Other point that has to be highlighted is that platelet aggregation also can be regulated by the NTPDase 1 present in vasculature. This enzyme has a great importance in controlling vascular tone and hydrolyzing circulating nucleotides as it faces the blood circulation [42]. According to Sévigny et al. [42], vascular NTPDase 1 abrogates platelet aggregation by depleting ADP and, this way, precludes the activation of specific ADP receptors in platelets, such as P2Y1 and P2Y12. Thus, NTPDase 1 present in vasculature and in platelets can be acting together to avoid hypertension complications. As such, further studies are necessary in order to clarify the induction raised here.

E-NPPs are another group of enzymes that participate in the cascade of nucleotide hydrolysis resulting in the production of nucleotide monophosphate. It is made up of three members (NPP1–3) responsible for the conversion of cyclic AMP to AMP, ATP to AMP, and ADP to AMP and responsible for hydrolyzing 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives, having both purines and pyrimidines as substrates [19, 21].

In our study, no significant changes were found regarding the E-NPP activity, even though a little tendency could be observed in favor of its activation in L-NAME-treated rats. From this trend, we could speculate that the same compensatory mechanism of NTPDase (ATP and AMP) could be acting, and the E-NPP activity could be statistically activated if rats stayed more time in this pathological condition. An increase in the E-NPP activity may lead to an increase in AMP levels, which can be hydrolyzed by ecto-5'-nucleotidase action into adenosine [12].

However, the ADA activity in L-NAME-treated rats is augmented, i.e., the same adenosine formed as a compensatory mechanism to avoid hypertension complications is being hydrolyzed and will probably not exert its effects. This could be understood because in hypertension there is a predisposition to thrombus formation [14]. There is an intrinsic cell–cell interaction between platelets, neutrophils, erythrocytes, and endothelial cells in this kind of complication [43]. This way, it would not be fair to say that the enhancement in platelet NTPDase activity could totally avoid thrombus formation, since the augment on ATP and ADP hydrolysis could not be sufficient to prevent this action in the microenvironment of such pathological condition.

Adenosine is involved in thromboregulation, which is a process or group of processes by which circulating blood cells and cells of the vessel wall interact to regulate or inhibit thrombus formation [43]. As we see through the great increase in the ADA activity and, consequently, the decrease in adenosine levels, thromboregulation did not occur efficiently in L-NAME-treated rats, which can be a great factor of hypertension development observed in this study.

Reinforcing this line of reasoning, we investigated platelet aggregation. We observed an increase in the platelet aggregation in hypertensive rats at different concentrations of ADP as agonist. Since adenosine plays an important role in the purinergic metabolism inhibiting platelet aggregation and exerting a reduction of vascular injury [9], this increase in platelet aggregation observed in L-NAME-treated rats can be explained by the probable absence of adenosine levels in consequence of ADA activation. Even adenosine levels were not measured in this study, the strong activation of ADA allows us to infer that

the amount of adenosine is diminished in L-NAME-treated rats, this way, contributing to the platelet activation.

Regarding exercise effects in L-NAME-treated rats, a protector action of moderate intensity exercise (swimming) in ecto-nucleotidase activities could be clearly observed, since in the L-NAME-exercised group, NTPDase (ATP and ADP), ecto-5'-nucleotidase, E-NPP, and ADA activities kept similar to control group. We have to underline the effect of exercise on the adenosine hydrolysis, leaving a larger amount of extracellular adenosine available in the middle, which can explain the prevention of platelet aggregation in the L-NAME-exercised group. These findings confirm the great protector of exercise training effects to avoid hypertension complications.

With the purpose of complementing the work and explaining chronic changes in ecto-nucleotidase activities, we verified changes in these enzymes due to an acute bout of exercise (Figs. 2d, 3b, 4b). Some studies [24, 44, 45] have shown that during exercise, red blood cells may control coronary blood flow by releasing ATP in areas of low oxygen tension caused by increased myocardial oxygen extraction. This increase in ATP and its metabolite (ADP, AMP, and adenosine) concentrations in the bloodstream, although being released by erythrocytes, may explain the rise in ecto-nucleotidase activities as a result of a single bout exercise found in our work, since these enzymes are present on the surface of platelets and probably are in contact with nucleotides released from red cells.

A study developed by Yegutkin et al. [46] is the unique that have assessed changes in platelet ecto-nucleotidase activities in response to an acute exercise. They showed that strenuous exercise significantly augments platelet activity via transient ADP release, producing acute pro-thrombotic responses. In contrast, our study indicated an augment in the whole nucleotide hydrolysis, including ADP. These differences on findings probably are related to the intensity of exercises, suggesting that ecto-nucleotidases, regarding moderate exercise, respond differently from ecto-nucleotidases regarding strenuous exercise.

As reported before, chronic exercise in hypertensive rats prevented ecto-nucleotidase alterations, platelet aggregation and reduced blood pressure in the L-NAME-exercised group. It is reasonable to assume that the augment of the ecto-nucleotidase activities as a result of an acute exercise can produce an adaptation by the organism, i.e., with several exercise sessions ecto-nucleotidases became prepared to receive an exercise stimulus. This way, they keep with low activity when the organism is at rest as showed by our results, probably because low ATP is being released from red cells or other sources [24] in an organism already adapted to training as in our study. However, this possible mechanism is encouraged to be more investigated in further studies.

It is interesting to note that exercise per se was able to increase NTPDase (ADP) activity on normotensive rats. Since NTPDase (ADP) activity is augmented, it means that more ADP is being hydrolyzed [10] and it could explain one of the training mechanisms on trombo-regulation. Since less concentration of ADP is in the microenvironment and ADP is the most important molecule that pursues pro-aggregant action, the platelet aggregation occurs in low intensity [10, 13]. This training effect could be understood as one of the main protector actions of swimming in L-NAME-treated rats.

In conclusion, our study suggests that moderate exercise training prevents ecto-nucleotidase alterations in platelets of rats that developed hypertension in response to oral administration of L-NAME, probably for the adaptation of these enzymes to stimuli caused by the exercise sessions that can modulate ecto-nucleotidase activities and inhibit platelet activation, highlighting the great protector exercise training effects to avoid hypertension complications.

This modulation can be involved in the hypotensive effect of exercise and the mechanisms of this link are encouraged to be investigated in further studies.

Acknowledgments The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) and Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net). Furthermore, the authors would like to thank to the members of BioEx (Laboratório de Bioquímica do Exercício—UFMS) and to professor Cristina Ribas Fürstenau for the help during the experiment.

References

1. Rogers VL, Go AS, Lloyd-Jones DM et al. on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2011) Heart disease and stroke statistics-2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123:180–209
2. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M et al (2009) Heart disease and stroke statistics-2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119(3):480–486
3. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109–142
4. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1990) Characterization of the L-arginine-nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 101:325–328
5. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C (2005) Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 146:160–173
6. Husain K (2002) Exercise conditioning attenuates the hypertensive effects of nitric oxide synthase inhibitor in rat. *Mol Cell Biochem* 231:129–137
7. Fürstenau CR, Trentin DS, Gossenheimer AN et al (2008) Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol Dis* 41:223–229

8. Fürstenau CR, Ramos DB, Vuaden FC et al (2010) L-NAME-treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats. *Life Sci* 87:325–332
9. Bakker WW, Poelstra A, Barradas K, Mikhailidis MA (1994) Platelets and ectonucleotidases. *Platelets* 5:121–129
10. Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson SC (2006) Ectonucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 36:217–222
11. Soslau G, Youngprapakorn D (1997) A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1355:131–140
12. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2:351–360
13. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan C, Wyse A (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *BioFactors* 31:77–98
14. Lunkes GL, Lunkes D, Stefanello F et al (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 109:189–194
15. Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, Thome G, Morsch VM, Becker L, Belle L, Oliveira L, Schetinger MRC (2010) Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol* 257:24–30
16. Schmatz R, Schetinger MRC, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PA, Gutierrez J, Corrêa MC, Giroto E, Moretto MB, Morsch VM (2009) Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 84:345–350
17. Bagatini MD, Martins CC, Gasparetto D, Spanevello RM, Becker LV, Rosa CS, Battisti V, Bellé L, Gonçalves JF, Schetinger MRC, Santos RB, Oliveira LZ, Morsch VM (2011) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta* 412:159–164
18. Bagatini MD, Martins CC, Spanevello RM, Rosa CS, Gonçalves JF, Schetinger MRC, Santos RB, Morsch VM (2008) Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 41:1181–1185
19. Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JF (2006) Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 17:84–91
20. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430
21. Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30:542–550
22. Guisti G, Galanti B (1984) Colorimetric method. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, pp 315–323
23. Dunbar CC (1992) The antihypertensive effects of exercise training. *NY State J Med* 92(6):250–255
24. Gorman MW, Feigl EO (2011) Control of coronary blood flow during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 40(1):37–42. doi:10.1097/JES.0b013e3182348cdd
25. Kuru O, Sentürk ÜK, Koçer G (2009) Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 107:896–902
26. Medeiros A, Gianolla RM, Kalil LMP et al (2000) Efeito do treinamento físico de natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Rev Paul Ed Física* 14:7–15
27. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY et al (2001) Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A* 130:21–27
28. Lunkes G, Lunkes D, Morsch V et al (2004) NTPDase e 5'-nucleotidase activities in rats alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 65:1–6
29. Chan K, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
30. Yun-Choi HS, Park KM, Pyo MK (2000) Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. *Thromb Res* 100(6):511–518
31. Born GVR, Cross MJ (1963) The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 95:1:68–78
32. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218–254
33. Tsai J, Liu J, Kao C et al (2002) Beneficial effects on blood pressure and lipid profile of programmed exercise training in subjects with white coat hypertension. *AJH* 15:571–576
34. Veras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS et al (1997) Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 273:2627–2631
35. Shepherd RE, Kuehne ML, Kenno KA et al (1982) Attenuation of blood pressure increases in Dahl salt-sensitive rats by exercise. *J Appl Physiol* 52(6):1608–1613
36. Fregly MJ (1984) Effect of an exercise regimen on development of hypertension in rats. *J Appl Physiol* 56(2):381–387
37. Marcus KD, Tipton CM (1985) Exercise training and its effects with renal hypertensive rats. *J Appl Physiol* 59(5):1410–1415
38. Kuru O, Sentürk UK, Demir N et al (2002) Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur J Appl Physiol* 87(2):134–140
39. Kuru O, Gulkesen H, Demir N, Gunduz F (2005) Physical training increases renal injury in rats with chronic NOS inhibition. *Ren Fail* 27:459–463
40. Tipton CM, Sebastian LA, Overton JM et al (1991) Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. *J Appl Physiol* 71(6):2206–2210
41. Maeda S, Miyachi T, Kakiyama T (2001) Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sci* 69:1005–1016
42. Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase 2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99:2801–2809
43. Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H (2000) Contribution of ecto-5' nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96:2157–2162
44. Farias M, Gorman MW, Savage MV, Feigl EO (2005) Plasma ATP during exercise: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:1586–1590
45. Gorman MW, Rooke GA, Savage MV, Jayasekara MPS, Jacobson KA, Feigl EO (2010) Adenine nucleoside control of coronary blood flow during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:1981–1989
46. Yegutkin GG, Samburski SS, Mortensen SP, Jalkanen S, Gonzalez-Alonso J (2007) Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. *J Physiol* 579:553–564

3.2 Manuscrito

A natação previne alterações na atividade das ecto-NTPDases e da adenosina desaminase em linfócitos de ratos com hipertensão induzida através da administração de L-NAME

Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from L-NAME-induced hypertension rats

Andréia Machado Cardoso, Fátima Hussein Abdalla, Margarete Dulce Bagatini, Caroline Curry Martins, Daniela Zanini, Roberta Schmatz, Jeandre Augusto Jaques, Daniela Bitencourt Leal, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger

Este manuscrito foi submetido para a revista “Journal of Hypertension” e encontra-se em revisão.

Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from L-NAME-induced hypertension rats

Andréia Machado CARDOSO¹, Fátima Hussein ABDALLA¹, Margarete Dulce BAGATINI², Caroline Curry MARTINS¹, Daniela ZANINI¹, Roberta SCHMATZ¹, Jeandre Augusto JAQUES³, Daniela Bitencourt LEAL¹, Vera Maria MORSCH¹, Maria Rosa Chitolina SCHETINGER¹

¹ Post-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences of the Federal University of Santa Maria - Santa Maria / RS – Brazil

² Collegiate of Nursing, University of Southern Frontier, Chapecó Campus – SC- Brazil.

³ Center of Biological and Health Science of the Federal University of Mato Grosso do Sul – Campo Grande/MS - Brazil

Short title: Exercise prevents inflammatory process in hypertension

Support: CAPES, CNPq

Conflict of Interest:

It is an academic work and there is no conflict of interest.

Corresponding authors:

Andréia Machado Cardoso

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Word count: 6.276

Number of Tables: 2

Number of figures: 3

CONDENSED ABSTRACT

Six weeks of swimming training were able to prevent alteration in lymphocytic purinergic system enzymes in hypertensive rats ($P < 0.05$) and keep the blood pressure in the same level of normotensive group. Exercise *per se* was associated with a decrease in the expression of ecto-NTPDase1 in lymphocytes (-23.4%, $P < 0.05$). Exercise was also efficient in preventing the rise in classic inflammatory markers observed in hypertensive group ($P < 0.05$). This work highlighted the link between purinergic signaling and inflammatory process and suggests a novel mechanism in which moderate aerobic exercise possesses the potential to attenuate inflammation caused by hypertension.

INTRODUCTION

Essential hypertension is an important public health challenge because of its high prevalence, which is estimated to increase to 29% by the year 2025 [1]. This disease represents a major risk factor for stroke, myocardial infarction, heart failure, aneurysm of the arteries and chronic kidney disease, being associated with a shortened life expectancy [1].

It is well established that a chronic low-grade inflammation accompanies hypertension [2] and subsets of lymphocytes have been implicated in the pathogenesis of this disease and vascular remodeling [2]. The activation of lymphocytes and other immune cells can be regulated by purinergic signaling [3]. Nucleotides such as ATP, ADP and AMP, adenosine, the enzymes that degrade these nucleotides as well as its receptors are the main components of purinergic system [3, 4, 5]. The ATP that is released from damaged tissues and dying cells is recognized by the specific purinergic receptors as a danger signal that elicits a variety of inflammatory responses [4, 5]

Following its release into the extracellular space, ATP can be rapidly hydrolysed in a stepwise manner to ADP and AMP by ecto-NTPDases (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) family. After, AMP produced can be converted into adenosine by the action of adenosine deaminase (ADA) [6]. These enzymes are expressed on immune cells cellular membrane [3].

ATP has a major role in elicit immune responses while adenosine has a major role in suppressing it [3]. T cells express many members of the P2X, P2Y and P1 receptor families, and ecto-NTPDase1 is the most expressed ectonucleotidase [3]. Thus, the complex network of enzymes that regulates the ligand availability for P1 and P2 receptors has a central role in defining the immune responses in different tissues [7,8] and the activity of ecto-NTPDases and ADA are particularly important for the balance between the pro and anti-inflammatory effects of released cellular ATP [3].

Moreover, it is well known that hypertension development can come accompanied by changes in lipid profile [7, 8] and classic inflammatory markers, such as myeloperoxidase enzyme (MPO) [9], C-reactive protein (CRP) [8] and uric acid [10]. The augment in MPO activity has been considered one of the most important markers of inflammation in several pathologies [9].

Physical training has been highlighted as the major lifestyle change responsible to cardiovascular health improvement. One of the main effects as a coadjuvant in the hypertension treatment is related to its anti-inflammatory properties [11, 12]. The reduction in

visceral fat mass, increased production and release of anti-inflammatory cytokines and reduced expression of Toll-like receptors (TLRs) on monocytes and macrophages have been described as the possible mechanisms responsible for the anti-inflammatory effects of exercise [12].

We have recently evidenced that there is a modulation in ectonucleotidase activities in platelets in response to chronic and acute exercise [13]. Furthermore, in a low oxygen tension environment, as in an exercise session, red cells release ATP and its metabolites, and there is the involvement of nucleotidases in this process as a way to control blood flow [14]. Indeed, the effects of physical training on ectonucleotidase activities and expression in lymphocytes are still unknown, highlighting the importance of this study.

Studies have reported the relation between hypertension and alterations in platelets ectonucleotidases and adenosine deaminase activities [15, 16, 17] and in kidney ectonucleotidases activities [18]; and we have recently shown the great potential of exercise in preventing alterations in platelets ectonucleotidases in hypertensive rats [13]. However, the relationship between hypertension and purinergic system in lymphocytes as well as the possible contribution of physical training in this context remains unknown.

Considering the importance of purinergic system in modulating immune functions and that exercise is being considered one of the major lifestyle changes that contributes to the cardiovascular health, in this study we investigated the effect of chronic swimming training on purinergic system enzymes activities related to inflammatory process, as well as in lipid profile and classic inflammatory markers. The study was conducted with rats that developed hypertension in response to the oral administration of N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME). Moreover, in order to explain and clarify exercise chronic alterations, we investigated acute changes in purinergic enzymes activities after a single bout of swimming

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), Coomassie Brilliant Blue G, nucleotides and Trizma base were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Ficoll-Histopaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Ecto-NTPDase1 mouse monoclonal antibody was obtained from eBioscience (Anti-rat Ecto-NTPDase1 polyclonal antibody). Laemmli sample buffer and polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane were obtained from Bio-Rad Laboratories. The bovine serum albumin was obtained from Reagen (Colombo, PR, Brazil). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days; 220–300 g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23±1 °C) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 029/2011). All protocols are in accordance with the guidelines of the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) and all efforts were made to minimize the number of animals used in this study and their suffering.

Experimental protocol

Rats were randomly divided into four groups: normotensive (Control), normotensive plus exercise (Exercise), hypertensive (L-NAME) and hypertensive plus exercise (Exercise L-NAME). In the hypertensive groups, hypertension was induced by the oral administration of the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (L-NAME). L-NAME administration via includes drinking water, gavage and subcutaneous via. Although most of the works induce hypertension through drinking water, Ribeiro et al. [19] observed that average dairy water intake per box was 26% lower in L-NAME-treated rats than in controls. This way, we chose gavage administration to be sure on the dose ingested by rats and to be sure all rats were

receiving the same dose. In addition, despite of hypertension induction, high doses [19, 20] or long term administration [21] of L-NAME may induce severe proteinuria and renal injury. This way, we decided to use a medium dose as used by Furstenu et al. (30 mg/kg/day) [15] and at relative medium time [13, 22], understanding that our rats would become hypertensive but the renal injury would happens and not be too deleterious. L-NAME administration started one week before the exercise protocol and lasted throughout the experiment [13]. In the normotensive groups, the animals received water by gavage throughout the entire experiment to be submitted to the same stress (control groups). These rats were euthanized 24 h after the last exercise session [13, 22]. Blood was collected by cardiac puncture (further described).

Exercise Protocol

Swimming was the exercise chosen for this study. The use of swimming rats as a model of exercise presents advantages over treadmill running, since swimming is a natural ability of the rats and it avoids the selection of animals, which is necessary in experimental protocols using treadmill running. Furthermore, the animals are not likely to suffer from foot injuries and physical trauma. An additional advantage is that swimming provides a uniform type of physical activity with the use of ankle and flexor muscles [23]. The protocol is described bellow, according to our previous works [13,22].

Swimming Protocol

All rats were adapted to water before training beginning. The adaptation was to keep the animals in shallow water at $31 \pm 1^\circ\text{C}$ [13] for 5 days, with duration of 1h. This procedure was performed always at the same time, between 10:00 and 12:00 a.m. The adjustment reduces stress, without, however, promoting adaptations to the training.

Animals were trained 5 times per week in an adapted swimming system with water heated to $31 \pm 1^\circ\text{C}$ for 6 weeks with duration of 60 min, performed always between 10:00 and 12:00 am. The training tank used for this study was 80 cm in length, 50 cm in width and 90 cm in depth [13]. The workload (weight on the back) was gradually increased up to 5% of the animal's body weight (Table 1).

Sedentary animals were placed in shallow water (5 cm in depth), heated to $31\pm 1^\circ\text{C}$, for 60 min, 5 days a week without the work load (5% of body weight) to be subjected to the same stress, however, without being submitted to the effects of physical training.

Acute Exercise Protocol

With the purpose to complement the work and explain chronic changes in ectonucleotidase activities, it was aimed to verify changes in these enzymes due to an acute bout of exercise. A number of 10 healthy normotensive rats were randomly divided into 2 groups: a group which should remain at rest ($n=5$) and a group which was submitted to an adaptation training week before the swimming test. In the swimming session test rats performed 60 min of swimming with 5% animal's body weight workload (weight on the back). Rats were killed immediately after the acute swimming test, blood was collected, and lymphocytes were separated to further analysis.

Hemodynamic parameter determination

In all rats, systolic blood pressure (SBP) was measured in awake animals, by tail-cuff plethysmography (Kent Scientific; RTBP1001 Rat Tail Blood Pressure System for rats and mice, Litchfield, USA). Rats were conditioned with the apparatus before measurements were taken. SBP was recorded at the end of experiment (last treatment week).

Blood Collection

Twenty-four hours after the last swimming session, the animals were previously anesthetized with halothane and submitted to euthanasia. Halothane was administered by inhalation, by the closed technique, in a dose of 0.5%, according to Halothane bull (Tanohalo 1:1mL; CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA) adapted to rats. The animals were kept in a closed chamber, becoming an environment saturated with anesthetic, for approximately 2 minutes [22]. The exact time spent in the chamber depended on the clinical signs of each animal. Blood was collected by cardiac puncture in tubes with EDTA as anticoagulant, for lymphocytes and plasma separation. Tubes without anticoagulant were used to obtain serum. Immediately after, the rats were killed by decapitation.

Isolation of mononuclear cells

Mononuclear leukocytes were isolated from blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [24].

Ecto-NTPDase activity determination

After lymphocyte isolation, ecto-NTPDase activity was determined as described by Leal et al. [25] where the reaction medium contained 0.5 mmol/L CaCl₂, 120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 6 mmol/L glucose and 50mmol/L Tris-HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200 µL. Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution were added to the reaction medium (2-4 µg of protein) and pre-incubated for 10 min at 37 °C and incubation proceeded for 70 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mmol/L and stopped with 200 µL of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [26] using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Western blot of protein ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (ecto-NTPDase1)

Electrophoresis was performed using 12% polyacrylamide in a Bio-Rad Mini-Protean III apparatus. For Western blotting assays, peripheral blood lymphocytes were lysated inside microtubes containing an extraction buffer (50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,5), glass pearls and vortexed for a minute, twice, on ice. Samples were centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C. The protein present in the supernatant, determined by colorimetric assay (Bradford, 1976), was diluted (1:1, v:v) in the Bio-Rad Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris HCl, pH 6,8; 25% glycerol, 2% SDS, 0,01% Bromophenol Blue) and then loaded (10 ug) and size-separated in 15% sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 100V). The running buffer used contained 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 0,5% SDS. The proteins were blotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for 1h

(Bio-Rad) in blotting buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol. Subsequently, the membrane was incubated with anti-rat ecto-NTPDase1 polyclonal antibody (primary antibody used at a dilution of 1:400; eBiosciences) at room temperature overnight. The sensitivity and specificity of this antibody for rat antigen has been previously validated. The amount of protein was corrected in order to load a fixed concentration of protein (1 ug) in 12% SDS-PAGE, and it was determined based on preliminary experiments by using different concentrations of proteins. Membranes were developed using the substrate of alkaline phosphatase, nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate [27].

Adenosine Deaminase (ADA) activity determination

ADA activity from lymphocytes was determined according to Guisti [28] based on the Bertholet reaction, that is, the formation of a colored indophenol complex from ammonia released from adenosine and quantified spectrophotometrically. Briefly, 25 μ L of lymphocytes reacted with 21 mmol/L of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The protein content for lymphocytes experiment was adjusted between 0.1- 0.2 mg/mL. Results were expressed in U/L. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Mieloperoxidase (MPO) activity determination

MPO activity was measured in plasma from blood collected with EDTA and followed by centrifugation at 1800 x g for 10 min. The MPO activity was analyzed spectrophotometrically by a modified peroxidase-coupled assay system involving phenol, 4-aminoantipyrine (AAP) and H₂O₂ [29]. Briefly, 390 μ L of 2.5 mM AAP and 20 mM phenol were placed in each tube, followed by 450 μ L of 1.7 mM H₂O₂. In the presence of H₂O₂ as oxidizing agent, MPO catalyzed the oxidative coupling of phenol and AAP yielding a colored product, quinoneimine, with a maximum absorbance at 500 nm. The millimolar absorbance coefficient for the quinoneimine was determined to be $\sum = 14 \pm 0.1/\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, close to the previously reported values [30]. The results were expressed in micromolar of quinoneimine produced at 30 min.

Lipid Profile and Inflammatory Markers

Serum total cholesterol and triglyceride concentrations were measured using standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics® reagents on the fully automated analyzer (Vitros 950® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). The levels of C-Reactive protein (CRP) was determined in serum by nephelometry (Dade Behring, Newark, DE, USA), and uric acid was determined by dry chemistry method standardized by the Cobas MIRA ®.

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [31] using serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically using two-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS 18.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA), followed by Tukey's multiple range tests. Some data were analyzed using Student t test and others by Pearson's correlation. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Variables are presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS

In the present study, the oral administration of L-NAME by gavage was associated with a significant rise in systolic blood pressure (SBP) when compared with the other groups, revalidating the hypertensive model (31.3% higher than control group, $P < 0.05$). On the other hand, we can observe that exercise clearly possesses hypotensive effect, reducing significantly SBP in the exercise L-NAME group (interaction between factors $F=(3,28) = 7.63$, $P < 0.05$, 13.9% of diminution when compared to L-NAME group) (Figure 1). No difference was observed in the body weight and food and water consumption after the administration of L-NAME among the experimental groups (data not shown).

Results obtained for ecto-NTPDase (hydrolyzing ATP and ADP) activity and expression in lymphocytes are shown in Figure 2. As can be observed, ATP and ADP hydrolysis was significantly increased in the L-NAME-treated group when compared with the control groups (71.7% for ATP and 90.1% for ADP, $P < 0.05$) and exercised L-NAME group ($F(3,36) = 5.09$, $p < 0.05$) (Figure 2A and 2B). However, it is interesting to note that exercise *per se* had the ability to diminish ecto-NTPDase (hydrolyzing ATP) activity in the exercise group (diminution of 40% when compared to control group, $P < 0.05$) (Figure 2A). Corroborating with this result, the expression of ecto-NTPDase1 was significant decreased in Exercise group (23.4% less expression when compared to control group, $P < 0.05$) (Figure 2C). In figure 2C, we can also observed that, although not reach statistical significance, the expression of ecto-NTPDase1 is higher in L-NAME group when compared to others (17.02% higher than control group).

Regarding to acute effect of a single bout exercise (Figure 2D), we observed a significant decrease in ecto-NTPDase (ATP and ADP) activity immediately after exercise (61.8% less for ATP hydrolysis and 36.7% less for ADP hydrolysis, $P < 0.05$). Figure 2 (E and F) shows a positive Pearson's correlation between ecto-NTPDase (ATP and ADP) activity and Systolic Blood Pressure ($r=0.7923$ and $r=0.7884$, respectively, $P < 0.05$), indicating that the ecto-NTPDase activity rises as the augment of blood pressure.

ADA activity results in lymphocytes are shown in Figure 3. Statistical analysis showed a significant hypertension vs. exercise interaction ($F(3,36) = 6.80$; $P < 0.05$). *Post hoc* comparison revealed that the hypertension development was associated with a significant rise in ADA activity in the L-NAME group when compared with the other groups (Figure 3A) (105.5% higher than control group, $P < 0.05$). Regarding to acute effect of a single bout exercise (Figure 3B), we observed a significant decrease in ADA activity (-55.8%, $p < 0.05$).

Figure 3 (C) shows a positive Pearson's correlation between ADA activity and Systolic Blood Pressure ($r=0.5555$, $P< 0.05$), indicating that the ADA activity rises as the augment of blood pressure.

Table 2 shows lipid profile and inflammatory markers of Control, Exercise, L-NAME and Exercise L-NAME groups. As can be observed, all variables tested, including cholesterol, triglycerides, CRP, uric acid and MPO activity had a significant increase in L-NAME-treated group when compared with other groups ($P<0.05$), strongly indicating the presence of inflammatory process in hypertensive rats. Swimming training was able to prevent almost all of these alterations in exercise L-NAME group ($P<0.05$), except for uric acid, showing a protector effect against hypertension-induced inflammation.

DISCUSSION

Hypertension is accompanied by vascular inflammation that is characterized by infiltration of immune cells [8]. In addition to vascular growth and proliferation of vascular smooth muscle cells, inflammation plays a key role in the vascular remodeling that participates in the mechanisms leading to blood pressure (BP) elevation [2, 8, 32]. On the other hand, regular physical activity has been shown as having a central role in hypertension prevention or treatment and one of the main mechanisms are its anti-inflammatory effects [11, 12, 14].

Several studies [13, 14, 22] have shown the beneficial effects of regular physical activity in reducing the elevated blood pressure and regular physical exercises have been recommended by health professionals to maintain good cardiovascular fitness and prevent or treat hypertension. It has become evident that regularly performed aerobic exercise significantly reduces the high blood pressure in rats with spontaneous hypertension [33] and in rats with hypertension induced by L-NAME administration [34, 35, 36]. Similar responses were found in recently published works developed by our group using the same experimental design [13, 22, 37] and in the present study, where rats performed six weeks of swimming protocol, corresponding to moderate aerobic exercise.

The role of purinergic signaling as a mechanism of intercellular communication among immune cells has been widely recognized [3, 38]. The enzymes ecto-NTPDase and ADA have a central role in modulating immune responses, since extracellular ATP exhibits pro-inflammatory properties and adenosine acts inhibiting immune responses [3]. Evaluating the relevance of purinergic system and hypertension-induced inflammation, it has to be pointed out the applicability of this study, since this is the first study aiming to analyze the involvement of lymphocytic purinergic signaling in hypertension and the effects of physical training in this system.

In the present study, hypertension (L-NAME-treated rats) was strongly associated with an increase in lymphocytic ecto-NTPDases (hydrolyzing ATP and ADP) activities when compared to other groups, and enzyme activities displayed a positive correlation with BP. Since the presence of high ATP amounts in extracellular medium is a consequence of inflammation and damaged cells [3, 38, 39], this augment in enzyme activities can indicate that in hypertension stressed cells are releasing a large quantity of ATP.

Furthermore, T cell activation also induces the release of ATP through pannexin 1 channels that translocate with P2X receptors to the immune synapse, where they promote

calcium influx and cell activation through autocrine purinergic signaling [39]. Activation in lymphocytic ecto-NTPDase was also observed by our research group in multiple sclerosis [40], HIV [41] and rheumatoid arthritis [42] patients as a result of immune system alterations. Kauffenstein et al. [42-43] findings suggest that the increased endothelial nucleotidases activity may diminish the potency of vasodilator effect of nucleotides, and, as a consequence, increase vascular tone. This information allows us to infer that the augment in lymphocytic ecto-NTPDase also can diminish nucleotides-mediating vasodilatation and can also be responsible to impairment vascular tonus in hypertension.

Hypertension was also positive correlated with an augment in ADA activity in lymphocytes from L-NAME-treated rats, what possibly indicates that a low concentration of adenosine is available in extracellular medium. As adenosine is a molecule that has a role in suppresses effector cells through A2A receptor mediated signaling, its less availability can indicate that an inflammatory process is occurring due to hypertension development. Taken together, these data suggest that the increased ecto-NTPDase and ADA activities in lymphocytes of hypertensive rats are occurring due to the activation of pro-inflammatory mediators. Alterations in purinergic system enzymes related to other pathologies, such as lung cancer, Chagas' disease, experimental sepsis and multiple sclerosis as well as in nicotine exposition were already found in recent works developed by our research group [27, 40, 44, 45, 46].

Regarding to the effects of six weeks of swimming training on purinergic signaling in lymphocytes, our results clearly shows that exercise was efficient on preventing ecto-NTPDase and ADA alterations in L-NAME-treated rats when compared to other groups. A recent review showed that the anti-inflammatory effects regular exercise may be mediated via induction of an anti-inflammatory environment with each bout of exercise [12]. Various mechanisms may contribute to the generation of this anti-inflammatory environment, including: increased release of cortisol and adrenaline from the adrenal glands; increased production and release of IL-6 and other myokines from working skeletal muscle; reduced expression of TLRs on monocytes and macrophages (with subsequent inhibition of downstream pro-inflammatory cytokine production); inhibition of adipose tissue infiltration by monocytes and macrophages; phenotypic switching of macrophages within adipose tissue; a reduction in the circulating numbers of pro-inflammatory monocytes; and an increase in the circulating numbers of TReg cells [12].

However, the contribution of exercise on ectonucleotidases-regulating immune responses is shown by the first time in the present study. We demonstrated that chronic

exercise training in normotensive rats (exercise group) had the ability to decrease ecto-NTPDase (hydrolyzing ATP and ADP) activity, besides prevented the increase in ecto-NTPDase and ADA activities and reduced BP in exercise L-NAME group. These data suggest that chronic exercise training can modulates purinergic signaling-related to inflammation in hypertension.

To better understand the mechanisms involved in these effects, we evaluated enzymatic changes due to an acute exercise session. We observed that immediately after an acute exercise bout, lymphocytic purinergic system enzymes activities had a significant decrease. According to Gorman and Feigl [14], during exercise, ATP in plasma is rapidly broken down to ADP, AMP, and adenosine by nucleotidases in the plasma and on the surface of red blood cells in order to promote vasodilatation (caused mainly due to AMP concentration that binds to endothelial P1 purinergic receptors). Indeed, according to Kauffenstein et al. [42] ecto-NTPDase1 constitutes the major ectoenzyme hydrolysing extracellular nucleotides at the surface of the vascular endothelium. Its absence allows a facilitated relaxation and a hypotensive effect because ATP becomes available to bind in endothelial P2X receptors and promotes vasodilatation [42]. Despite of a little conflict between above findings, what becomes clearly evident is that during exercise, there is a great involvement of purinergic system and less amount of ATP is available in extracellular medium.

This way, a reduced ecto-NTPDase activity in lymphocytes verified in our study was probably promoted by the reduced amount of ATP accessible in the extracellular medium, since the availability of this molecule can be diminished by either hydrolysis by red blood cells ectonucleotidases in order to augment AMP concentration [14], or the ATP is binding in endothelial P2X receptors [42]. In turn, the reduction in ADA activity can be explained by both reduced adenosine available and/or reduction in ADA activity in order to promote more available adenosine in the medium, which has anti-inflammatory properties. Taken together, it suggests that the modulation of purinergic signaling can be described as another mechanism that contributes to the anti-inflammatory microenvironment due to an acute exercise bout and can be related to the release of anti-inflammatory cytokines and the modulation of immune cells already described by Gleeson review [12], although this last statement must be further investigated.

Moreover, we showed that chronic swimming training has the ability to modulate ADA activity in hypertensive rats, and, this way, possibly the increase of adenosine levels in

extracellular medium. The modulation of ADA activity through exercise may represent an approach to antihypertensive therapy via inhibition of inflammatory process.

Complementing our work, we verified important metabolic abnormalities including those concerning to lipid metabolism that accompanies hypertension and inflammatory process [7, 47]. Dyslipidemia consists of elevated plasma triglycerides, low HDL cholesterol, and increased levels of atherogenic LDL cholesterol particles [47, 48]. The altered membrane microviscosity seen in hypertensive subjects reflects the changes of membrane lipid composition resulting from the intensive exchange between circulating and membrane lipids, as well as from abnormal cellular lipid synthesis and metabolism, which includes oxidative stress and lipid peroxidation [7, 47], that was already verified in one of our previous studies [22].

Our results show a significant rise in serum cholesterol and triglyceride levels in L-NAME-treated rats. However, exercise training was efficient to prevent lipid alterations. This prevention may be explained by the increased demand of the working muscle for fatty acids as an energy-yielding substrate as well as the replenishment of fatty acid containing stores for the regeneration of damaged muscle fibers [49, 50]. Lower cholesterol and triglyceride levels can also be explained through the biochemistry of exercises because there is an increased activity of lipoprotein lipase, which augments the degradation of triglycerides from very low-density lipoproteins and causes the lipoprotein particles to shrink [49, 50]

According to Herzberg [49], aerobic exercise has been shown to reduce the risk of cardiovascular disease and this reduction is at least partially mediated by changes in circulating lipoproteins resulting from adaptive changes in enzymes involved in their metabolism. Although aerobic exercise can cause oxidative damage when performed acutely [51], there are adaptive changes resulting from chronic exercise, as in our study, which can result in the improvement of the lipid profile [49, 50, 51].

In addition to dyslipidemia, in the current study, hypertensive rats also presented alteration in inflammatory markers, evidenced by the elevation in MPO activity, CRP and uric acid levels, which are considered as significant markers of inflammatory process [11, 32]. The increased inflammatory markers verified in our study in hypertensive rats, together with ecto-nucleotidases and ADA results and changes in lipid profile confirm that inflammation is accompanying hypertension and highlights the importance of purinergic signaling in this process as well as their interrelation.

Of great importance, physical training prevented the increase in MPO activity and

levels of CRP in exercise L-NAME-treated rats, but was not able to prevent the augment in uric acid levels. The effects of exercise training related to renal health in hypertension seem to be controversial. While there are some updated works showing that physical training attenuates renal damage in hypertensive rats [52], and low levels of uric acid correlates positively with performance and low blood pressure [53], Kuru et al. [54] showed that physical training increases renal injury in rats with chronic NOS inhibition. Taken together, these information allow us to infer that we did not reach improvement in acid uric levels probably due to L-NAME administration and the consequent higher levels of nitric oxide that are known to causes elevated uric acid release [53]. Even though, the relationship between exercise and renal functions in hypertension remains to be better understood.

In conclusion, exercise was powerful in preventing alterations in ecto-NTPDases and ADA activities in lymphocytes from hypertensive rats and displayed an improvement in dyslipidemia as well as attenuated the augment in standard inflammatory markers. These findings highlight the link between purinergic signaling and inflammatory process and suggest a novel mechanism in which moderate aerobic exercise possesses the potential to attenuate inflammation caused by hypertension.

References

- [1] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, et al. (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365: 217–223.
- [2] Schiffrin EL (2010) T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19(2): 181-186.
- [3] Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nature Rev Immunol* 11(3): 201-212.
- [4] Di Virgilio F (2005) Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal* 1: 205–209.
- [5] Ravichandran KS (2010) Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med* 207: 1807–1817.
- [6] Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673–694.
- [7] Zicha J, Kunes J, Devynck MA (1999) Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension. *Am J Hypertens* 12: 315–331.
- [8] Savoia C, Schiffrin EL (2007) Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci* 112: 375–384.
- [9] Veen BS, Winther MPJ, Heeringa, P (2009) Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal* 11: 11.
- [10] Hwu CM, Lin KH (2010) Uric acid and the development of hypertension. *Med Sci Monit* 16(10): 224-230.
- [11] Obisesan TO, Leeuwemburgh C, Phillips T et al. (2004) C-Reactive protein genotypes affect baseline, but not exercise training-induced changes, in C-reactive protein levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1874–1879.
- [12] Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA (2011) The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Rev Immunol* 11: 607-615.
- [13] Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D et al. (2012) Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 371(1-2): 147-156.
- [14] Gorman MW, Feigl EO (2012) Control of coronary blood flow during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 40(1): 37-42.
- [15] Fürstenau CR, Trentin Dda S, Gossenheimer AN, Ramos DB, Casali EA et al. (2008) Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood*

Cells Mol Dis 41(2): 223-229.

[16] Schetinger MR, Morsch VM, Bonan C, Wyse A (2007). NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31: 77–98.

[17] Lunkes GL, Lunkes D, Stefanello F et al. (2003). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 109: 189–194.

[18] Fürstenau CR, Ramos DB, Vuaden FC, Casali EA, Monteiro Pde S et al. (2010) L-NAME-treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats. *Life Sci* 87(9-10): 325-232.

[19] Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R (1992) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20(3): 298–303.

[20] Azegami T, Sasamura H, Hayashi K, Itoh H (2012) Vaccination against the angiotensin type 1 receptor for the prevention of L-NAME-induced nephropathy. *Hypertens Res* 35(5): 492-499.

[21] Baylis C, Mitruka B, Deng A (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90(1): 278–281.

[22] Cardoso AM, Martins CC, Fiorin Fda S, Schmatz R, Abdalla FH et al. (2013) Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. *Cell Biochem Funct* 31(2): 136-151.

[23] Jolitha AB, Subramanyam MMV (2009) Age-related responses of the rat cerebral cortex: influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system. *Biogerontology* 10: 53–63.

[24] Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 97: 77–89.

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

[26] Chan K, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375–378.

[27] Souza Vdo C, Schlemmer KB, Noal CB, Jaques JA, Zimmermann CE et al. (2012) E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. *Parasitol Int* 61(4): 690-6.

[28] Giusti G, Gakis C (1971) Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme*;12:417–25.

[29] Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK (1986) Laboratory manual of neutrophil function. Raven Press, New York.

- [30] Kayyali US, Moore TB, Randall JC, Richardson RJ (1991) Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions based on detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophore spectrum. *J Anal Toxicol* 15: 86–89.
- [31] Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- [32] Viridis A, Schiffrin EL (2003) Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:181–187.
- [33] Tipton CM, Sebastian LA, Overton JM (1991) Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. *J Appl Physiol* 71: 2206–2210.
- [34] Husain K (2002) Exercise conditioning attenuates the hypertensive effects of nitric oxide synthase inhibitor in rat. *Mol Cell Biochem* 231:129–137.
- [35] Kuru O, Senturk UK, Demir N (2002) Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur J Appl Physiol* 87: 134–140.
- [36] Kuru O, Sentürk UK, Koçer G (2009) Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 107: 896-902.
- [37] Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, da Silva Fiorin F et al. (2013) Swimming Training Prevents Alterations in Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in Hypertensive Rats. *Am J Hypertens* doi: 10.1093/ajh/hpt030 [Epub ahead of print]
- [38] Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358–404.
- [39] Schenk, U. Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M et al. (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 1(39): ra6.
- [40] Spanevello RM, Mazzanti CM, Schmatz R, Thomé G, Bagatini M et al. (2010) The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Chim Acta* 411(3-4): 210-214.
- [41] Leal DB, Streher CA, Bertincheli Cde M, Carli LF, Leal CA et al. (2005) HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1746: 129-134.
- [42] Dos Santos Jaques JA, Becker LV, Souza Vdo C, Leal CA, Bertoldo TM et al. (2013). Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 31(5): 395-359.

- [43] Kauffenstein G, Fürstenau CR, D'Orléans-Juste P, Sévigny J (2010) The ectonucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation. *Br J Pharmacol* 159: 576–585.
- [44] Zanini D, Schmatz R, Pelinson LP, Pimentel VC, da Costa P et al. (2013) Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. *Mol Cell Biochem* 374(1-2): 137-148.
- [45] Bertoncheli Cde M, Zimmermann CE, Jaques JA, Leal CA, Ruchel JB et al. (2012) Increased NTPDase activity in lymphocytes during experimental sepsis. *Scientific World Journal* 941906.
- [46] Thomé GR, Oliveira LS, Schetinger MR, Morsch VM, Spanevello RM et al. (2012) Nicotine alters the ectonucleotidases activities in lymphocytes: In vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother* 66(3): 206-212.
- [47] Flesch M, Sachinidis A, Ko YD, Kraft K, Vetter H (1994) Plasma lipids and lipoproteins and essential hypertension. *Clin Invest* 72: 944–950.
- [48] Ukoh VA, Oforofuo IA (2008) Plasma lipid profiles in Nigerians with normal blood pressure, hypertension and other acquired cardiac conditions. *East Afr Med J* 84: 264–270.
- [49] Herzberg GR (2004) Aerobic exercise, lipoproteins, and cardiovascular disease: benefits and possible risks. *Can J Appl Physiol* 29: 800–807.
- [50] Paschalis V, Nikolaidis MG, Giakas G, Theodorou AA, Sakellariou GK et al. (2010) Beneficial changes in energy expenditure and lipid profile after eccentric exercise in overweight and lean women. *Scand J Med Sci Sports* 20: 103–111.
- [51] Cardoso AM, Bagatini MD, Roth MA, Martins CC, Rezer JFP et al. (2012) Acute effects of resistance exercise and intermittent intense aerobic exercise on blood cell count and oxidative stress in trained middle-aged women. *Braz J Med Biol Res* 45: 1172-1182.
- [52] Trapé AA, Jacomini AM, Muniz JJ, Sertorio JT, Tanus-Santos JE et al. (2013) The relationship between training status, blood pressure and uric acid in adults and elderly. *BMC Cardiovasc Disord* 21;13(1):44.
- [53] Neto OB, Abate DTRS, Júnior MM, Mota GR, Orsatti FL et al. (2013) Exercise Training Improves Cardiovascular Autonomic Activity and Attenuates Renal Damage in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Sports Sci Med* 12: 52-59.
- [54] Kuru O, Sentürk UK, Gülkesen H, Demir N, Gündüz F (2005) Physical training increases renal injury in rats with chronic NOS inhibition. *Ren Fail* 27(4): 459-463.

TABLES AND FIGURES

Table 1 Swimming protocol, with training time from 1st to 6th week, held from Monday to Friday.

Week	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
1st	20 min. wo	30 min. wo	40 min. wo	50 min wo	60 min. wo
2nd	40 min. 2% bw	50 min. 2% bw	60 min. 2% bw	60 min. 2% bw	60 min. 2% bw
3th	40 min. 5% bw	50 min. 5% bw	60 min. 5% bw	60 min. 5% bw	60 min. 5% bw
4th, 5th, 6th	60 min. 5% bw				

(wo) = without overload (bw) = body weight (n=10 to each group).

Table 2 Lipid profile and inflammatory markers of Control, Exercise, L-NAME and Exercise L-NAME groups.

	Control	Exercise	L-NAME	Exercise L-NAME
Cholesterol (mmol/L)	1.51±0.17 ^a	1.39±0.21 ^a	2.21±0.13 ^b	1.65±0.20 ^a
Triglycerides (mmol/L)	0.83±0.05 ^a	0.78±0.07 ^a	1.17±0.06 ^b	0.94±0.04 ^c
C Reactive Protein(mg/Dl)	51.2±9.7 ^a	47.1±4.5 ^a	87.2±7.5 ^b	59.9±8.2 ^a
Uric Acid (mg/Dl)	4.43±0.97 ^a	4.09±1.09 ^a	5.94±0.93 ^b	5.38±0.95 ^b
MPO activity (µM Quinoneimine)	0.89±0.05 ^{a,c}	0.81±0.06 ^a	1.79±0.16 ^b	1.24±0.09 ^c

Data are expressed as means ± S.D. Different letters in the same line indicate differences among the groups ($P < 0.05$; n = 10 animals per group). Two-way ANOVA.

Figure 1. Final Systolic blood pressure (BP) measurements of Control group, Exercise group, L-NAME group and Exercise L-NAME group. SBP was followed as described in materials. Data are presented as means \pm SD. Groups with different letters are statistically different (two-way ANOVA, $p < 0.05$, $n = 10$ to each group).

Figure 2. (A) ecto-NTPDase (hydrolyzing ATP) and (B) ecto-NTPDase (hydrolyzing ADP) activity in lymphocytes of Control group, Exercise group, L-NAME group and Exercise L-NAME group. Data are presented as means \pm SD. Groups with different letters are statistically different (two-way ANOVA, $p < 0.05$, $n = 10$ to each group). (C) Expression of ecto-NTPDase1 protein in lymphocytes of Control group, Exercise group, L-NAME group and Exercise L-NAME group. Data are presented as means \pm SD. Groups with different letters are statistically different (two-way ANOVA, $p < 0.05$, $n = 5$ to each group). (D) ecto-NTPDase (hydrolyzing ATP and ADP) activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise. Data are presented as means \pm SD. *Indicates statistical difference (Student t test, $p < 0.05$, $n = 5$ to each group). (E) Pearson's Correlation between ecto-NTPDase (ATP) activity and Systolic Blood Pressure ($r = -0.7923$, $P < 0.05$). (F) Pearson's Correlation between ecto-NTPDase (ADP) activity and Systolic Blood Pressure ($r = -0.7884$, $P < 0.05$).

Figure 3. (A) Adenosine Deaminase (ADA) activity in lymphocytes of Control group, Exercise group, L-NAME group and Exercise L-NAME group. Data are presented as means \pm SD. Groups with different letters are statistically different (two-way ANOVA, $p < 0.05$, $n = 10$ to each group). (B) ADA activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise. Data are presented as means \pm SD. *Indicates statistical difference (Student t test,

p<0.05, n=5 to each group). (C) Pearson's Correlation between ADA activity and Systolic Blood Pressure ($r=-0.5555$, $P< 0.05$).

Figure 1:

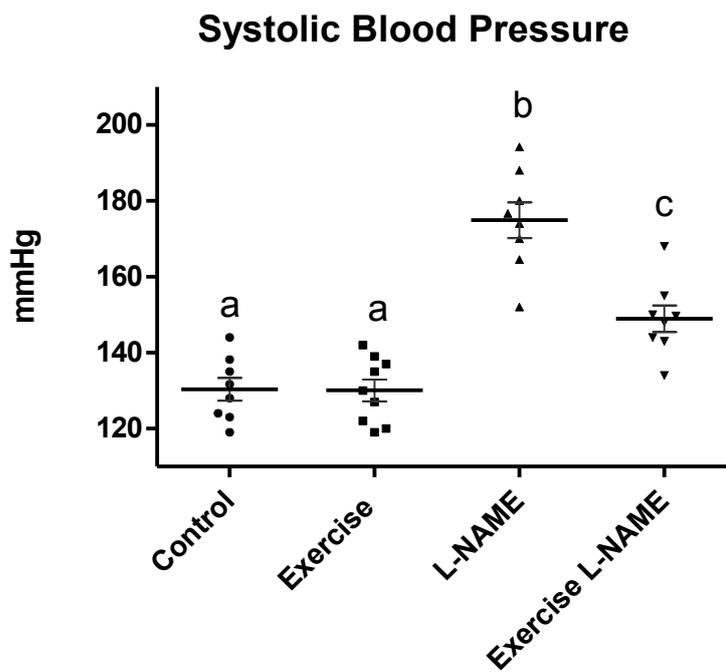
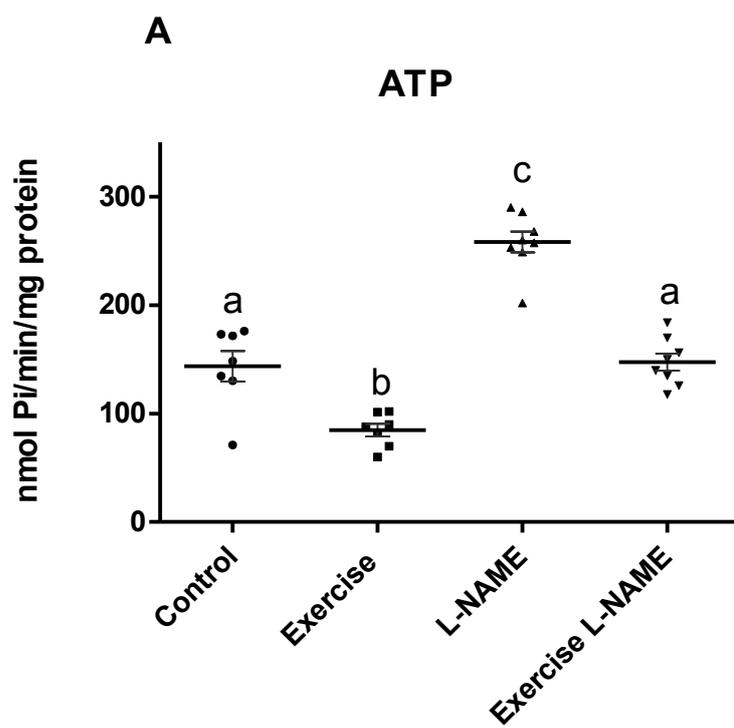
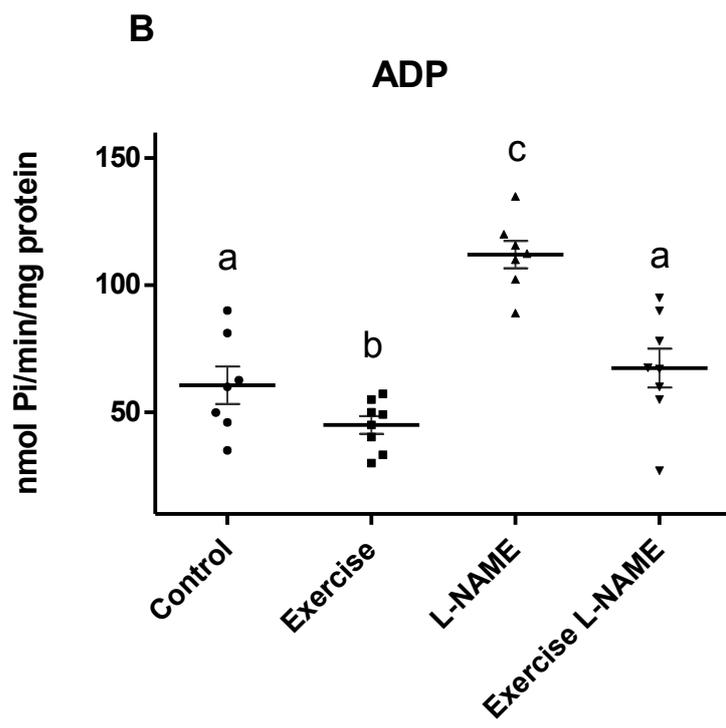
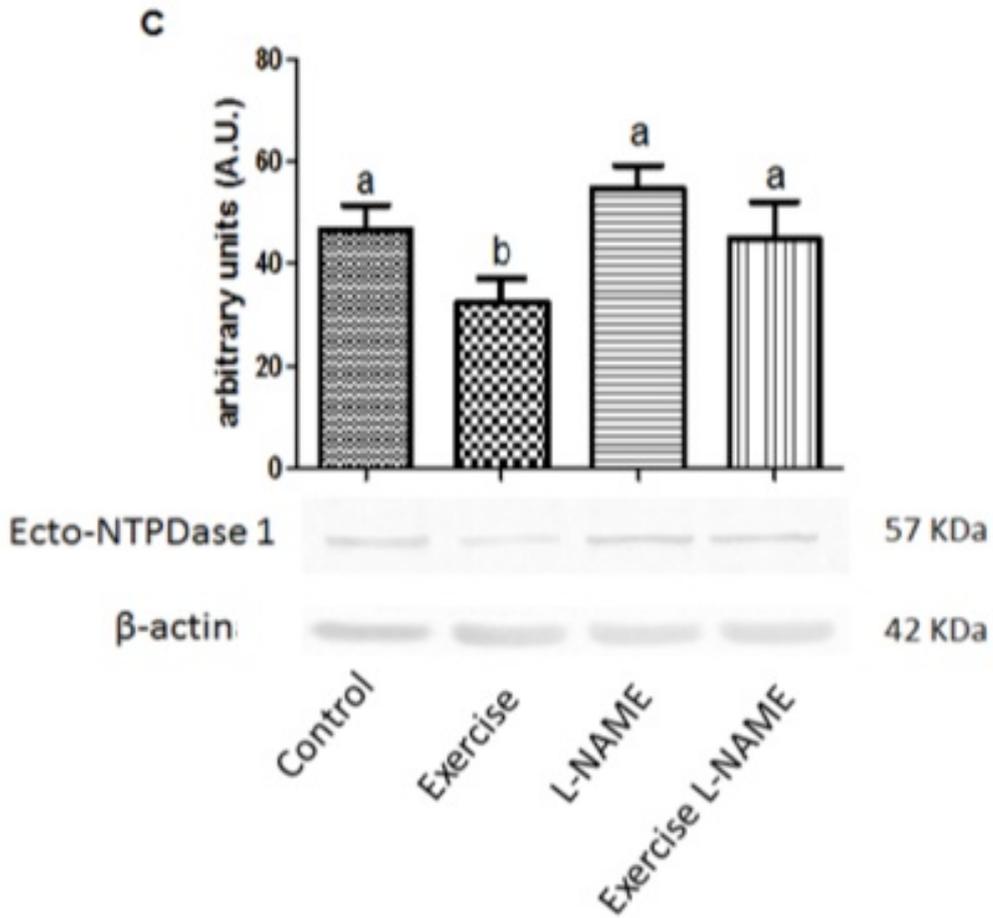


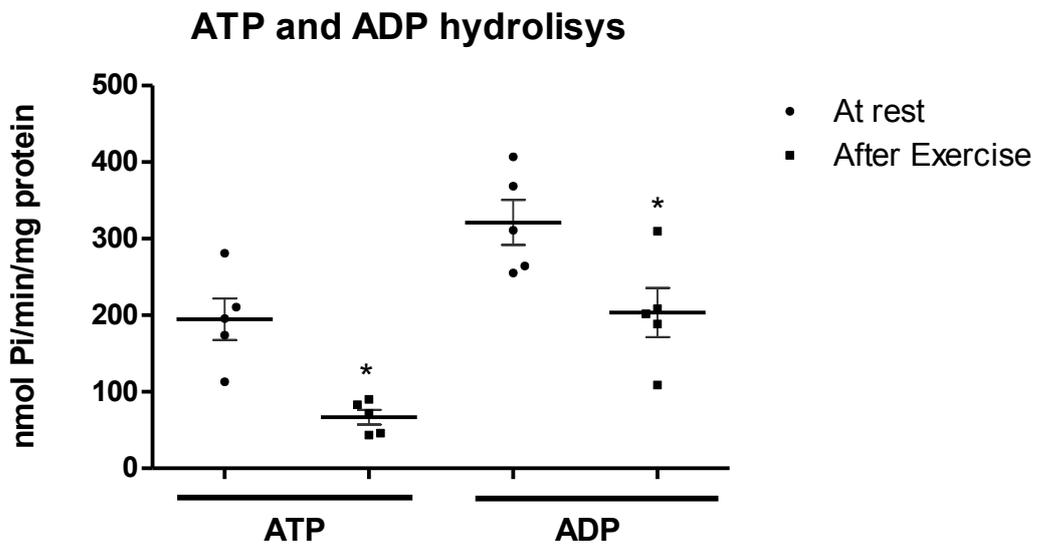
Figure 2:







D



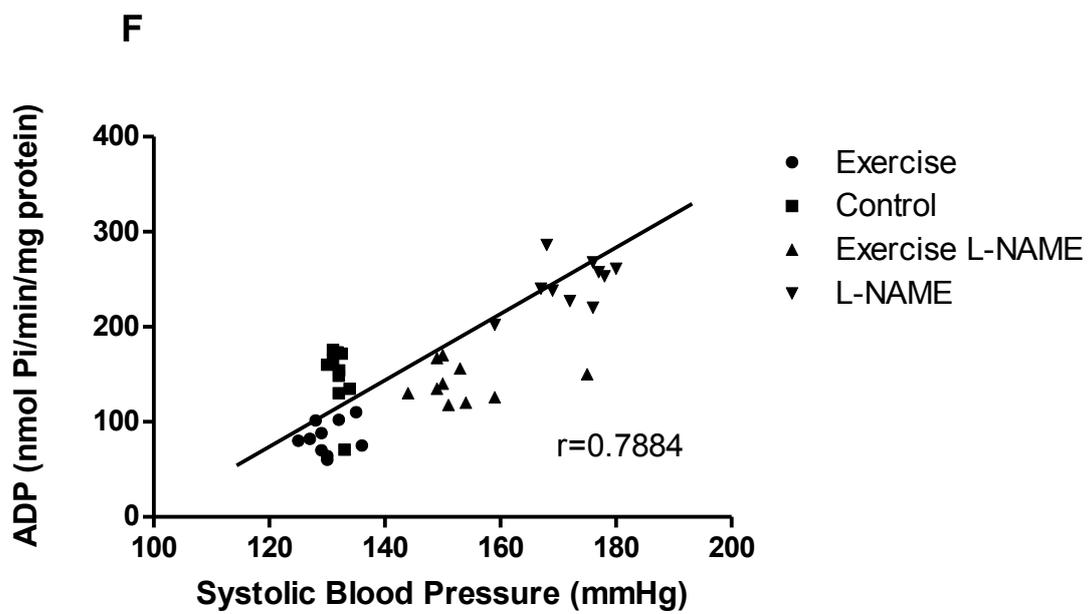
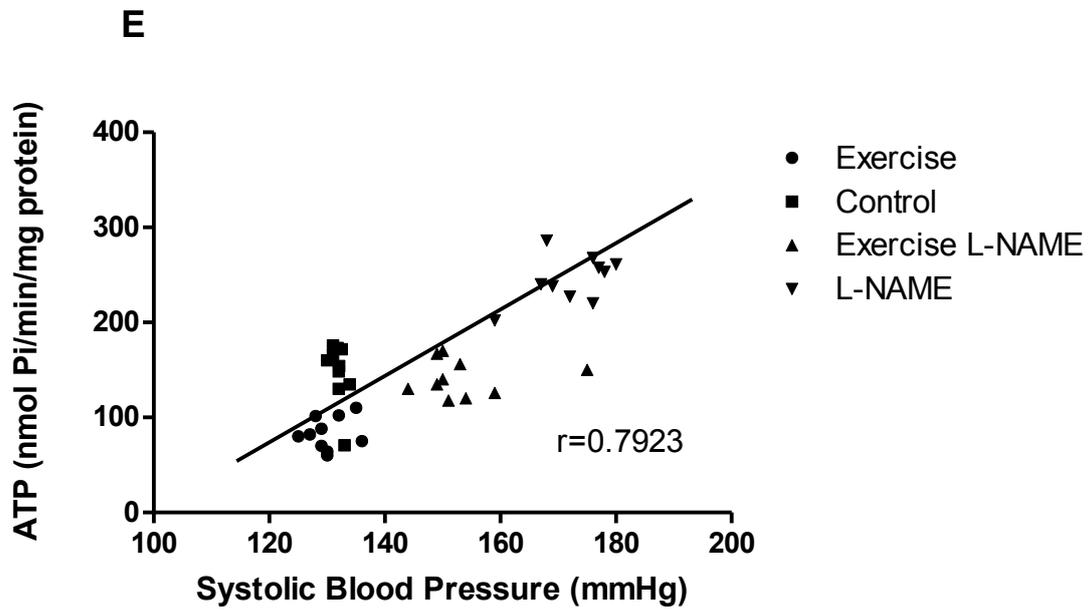
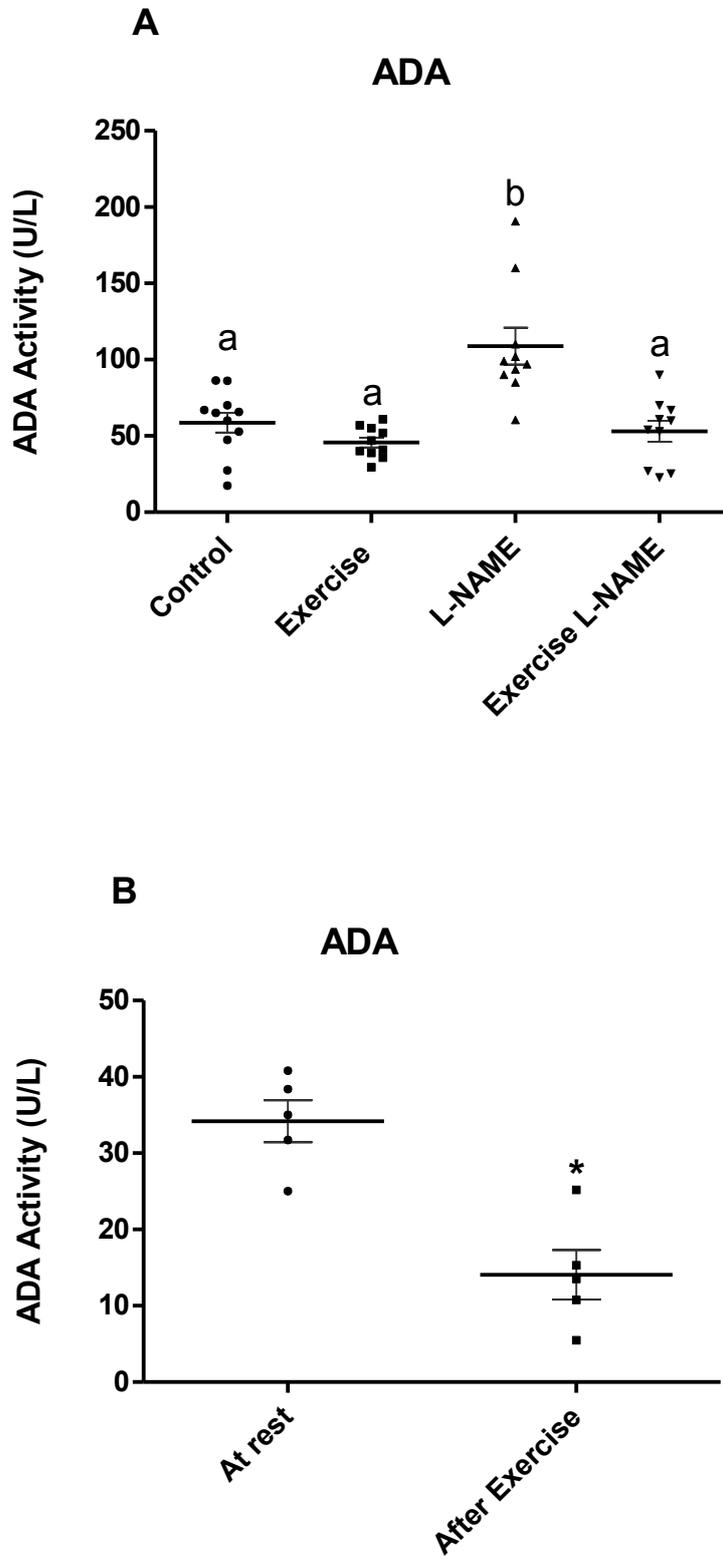
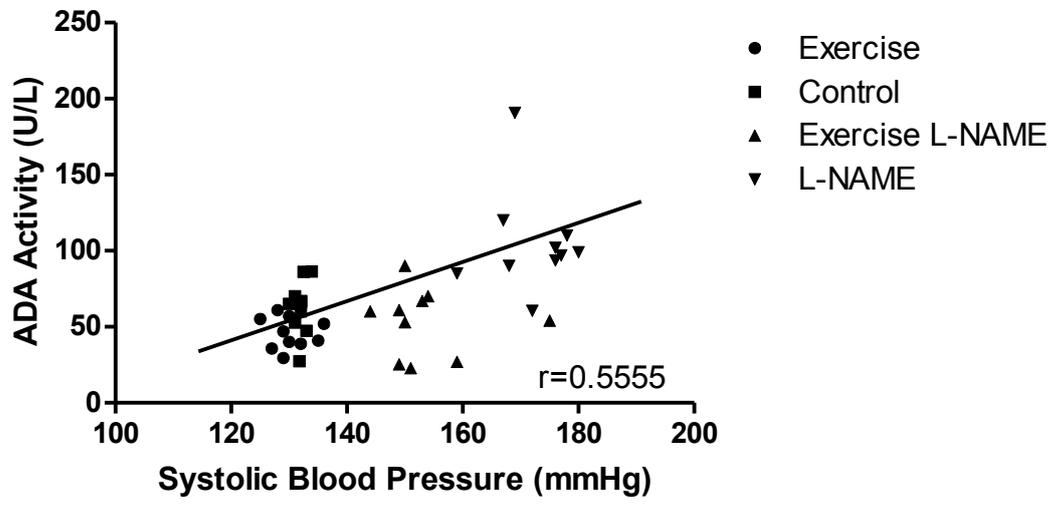


Figure 3:



C



3.3 Artigo 2

A natação previne alterações na atividade da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase em ratos hipertensos

Swimming Training Prevents Alterations in Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in Hypertensive Rats

Andréia Machado Cardoso, Fátima Hussein Abdalla, Margarete Dulce Bagatini, Caroline Curry Martins, Fernando da Silva Fiorin, Jucimara Baldissarelli, Pauline Costa, Fábio Fernandes de Mello, Amanda Maino Fiorenza, Jonas Daci da Silva Serres, Jamile Fabbrin Gonçalves, Heloísa Chaves, Luiz Fernando Freire Royes, Adriane Belló-Klein, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger

Publicado na revista “American Journal of Hypertension”

Swimming Training Prevents Alterations in Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in Hypertensive Rats

Andréia Machado Cardoso,¹ Fátima Husein Abdalla,¹ Margarete Dulce Bagatini,² Caroline Curry Martins,¹ Fernando da Silva Fiorin,¹ Jucimara Baldissarelli,¹ Pauline Costa,¹ Fábio Fernandes de Mello,¹ Amanda Maino Fiorenza,¹ Jonas Daci da Silva Serres,¹ Jamile Fabbri Gonçalves,¹ Heloísa Chaves,¹ Luiz Fernando Freire Royes,¹ Adriane Belló-Klein,³ Vera Maria Morsch,¹ and Maria Rosa Chitolina Schetinger¹

BACKGROUND

Cholinergic enzyme activities are altered in hypertension, reflecting a low-grade inflammation. Regular physical exercise exerts anti-inflammatory effects and has been described as a coadjutant in the treatment of hypertension. In this study, we investigated the effect of 6 weeks of swimming training on cholinergic enzyme activities (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase) in N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)-induced hypertensive rats.

METHODS

The rats were divided into 4 groups: control (n = 10), exercise (n = 10), L-NAME (n = 10), and exercise L-NAME (n = 10). The animals were trained 5 times per week in an adapted swimming system for 60 minutes with a gradual increase of the workload up to 5% of animal's body weight. Enzyme activities were measured spectrophotometrically in lymphocytes, whole blood, and serum.

RESULTS

A significant rise in acetylcholinesterase activity was observed in lymphocytes and whole blood as well as in serum butyrylcholinesterase

activity in the L-NAME group when compared with the other groups ($P < 0.05$), and the increase in cholinesterase activities was positively correlated with the rise in blood pressure ($r = 0.5721$, $r = 0.6121$, and $r = 0.5811$, respectively). Swimming training was efficient in preventing these alterations in the exercise L-NAME group, which displayed values similar to those of the control group. Exercise training demonstrated a significant hypotensive effect in hypertensive rats.

CONCLUSIONS

Exercise training was shown to prevent increased cholinesterase related to inflammatory processes in hypertensive rats, providing a new insight about protective exercise mechanisms to avoid hypertension-related inflammation.

Keywords: acetylcholinesterase; blood pressure; butyrylcholinesterase; hypertension; inflammation; swimming training.

Hypertension represents a major risk factor for stroke, myocardial infarction, heart failure, aneurysms of the arteries, and chronic kidney disease, making it an important public health challenge.¹ It is well established that a chronic low-grade inflammation accompanies hypertension^{2,3} and the release of proinflammatory cytokines modifies the normal state of vasodilatation mainly because of a low availability of nitric oxide (NO).⁴ The chronic administration of N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), which

is an L-arginine analogue, has been widely used to induce hypertension in rats because it produces a volume-dependent elevation of blood pressure (BP) through the inhibition of NO production.⁵⁻¹²

Several studies have highlighted the relationship between the cholinergic system, inflammatory processes, and the development of hypertension. Lymphocytes express most of the cholinergic components, and the neurotransmitter acetylcholine (ACh) has been described as possessing

Correspondence: Margarete Dulce Bagatini (margaretebagatini@yahoo.com.br) and Andréia Machado Cardoso (deiaa.mc@gmail.com).

Initially submitted September 19, 2012; date of first revision February 8, 2013; accepted for publication February 9, 2013.

¹Post-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, Department of Chemistry of the Center of Natural and Exact Sciences of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria/Rio Grande do Sul, Brazil;

²Collegiate of Nursing, University of Southern Frontier, Chapecó Campus, Santa Catarina, Brazil; ³Health Basic Sciences Institute, Department of Physiology of Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

© American Journal of Hypertension, Ltd 2013. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

anti-inflammatory properties.^{2,13} ACh can act by inhibiting the production of tumor necrosis factor, interleukin 1, macrophage migration inhibitory factor, and high mobility group box 1. Also, it suppresses the activation of nuclear factor-kappa B expression.² The enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) are also responsible for ACh hydrolysis and thus can modulate immune response.^{2,13} However, although studies have reported the relationship between hypertension and alterations in plasma cholinesterase activities,² the relationship between hypertension and the alteration in AChE and BuChE activities in lymphocytes remains unknown.

Concerns about increased stroke, myocardial infarction, and heart failure frequency in patients with hypertension have led many health-care professionals to adopt protective measures. In this context, a large number of studies have shown that lifestyle changes can improve BP control and decrease the risk of associated health complications.^{5,14–16} Physical training has been prescribed as a coadjuvant treatment for hypertension, mainly because of its anti-inflammatory effects.¹⁷ A recent review addressing this issue has focused on 3 possible mechanisms: reduction in visceral fat mass, increased production and release of anti-inflammatory cytokines, and reduced expression of Toll-like receptors on monocytes and macrophages.¹⁷

However, the effects of physical training on cholinesterase activities related to the inflammatory process are still unknown. Furthermore, there is no information about exercise (mainly its chronic effects) and hypertension-induced changes in cholinesterase activities. There are few studies elucidating the influence of exercise on these enzymes in other systems and/or contexts.^{15,18,19} This study investigated the effect of chronic swimming training on AChE activity in lymphocytes and whole blood as well as in serum BuChE activity in rats who developed hypertension in response to the oral administration of L-NAME. Moreover, we investigated changes in cholinergic enzyme activities after an acute single bout of swimming to explain chronic exercise alterations.

METHODS

Chemicals

L-NAME, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), Triton X-100, and ethopropazine hydrochloride were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Ficoll-Histopaque (Lymphoprep) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and the highest purity.

Animals

Adult male Wistar rats (aged 70–90 days; 220–300 g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23 ± 1 °C) on a 12-hour light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (protocol number: 029/2011).

Experimental protocol

Rats were randomly divided into 4 groups, normotensive (Control, $n = 10$), normotensive plus exercise (Exercise, $n = 10$), hypertensive (L-NAME, $n = 10$) and hypertensive plus exercise (Exercise L-NAME, $n = 10$). In the hypertensive groups, hypertension was induced by the oral administration of NO synthase inhibitor (L-NAME). Although most studies induce hypertension through drinking water, Ribeiro *et al.*¹⁰ observed that average dairy water intake per box was 26% lower in L-NAME-treated rats than in controls. Thus, gavage administration was used to be certain about the dose ingested by rats and to be certain that all rats received the same dose. In addition, despite hypertension induction, high doses^{7,10} or long-term administration⁸ of L-NAME may induce severe proteinuria and renal injury. Thus, a moderate dose of L-NAME, as used by Furstenau *et al.* (30 mg/kg/day),⁹ was given for a moderate length of time under the assumption that our rats would become hypertensive and that renal injury would occur but it would not be overly deleterious. Gavages with L-NAME started 1 week before physical training. After 1 week⁹ (day 8), BP was measured in all groups. L-NAME-treated animals presented elevated BP (data not shown). After the certification that the animals were hypertensive, the physical training program started. In the normotensive groups, the animals received water by gavage throughout the entire experiment to undergo the same level of stress. These rats were anesthetized and killed 24 hours after the last exercise session.^{11,12} Blood was collected by cardiac puncture.

Exercise protocol

Swimming was the exercise chosen for this study. The use of swimming rats as a model of exercise presents advantages over treadmill running because swimming is a natural ability of rats and it circumvents the need to select animals, which is necessary in experimental protocols using treadmill running.²⁰ Furthermore, the animals are not likely to suffer from foot injuries and physical trauma. An additional advantage is that swimming provides a uniform type of physical activity with the use of ankle and flexor muscles.¹⁶

Swimming protocol

All rats were adapted to water before training began. The adaptation consisted of keeping the animals in shallow water at 31 ± 1 °C²⁰ for 1 hour during 5 days. This procedure was performed between 10:00 AM and 12:00 PM. The adjustment reduces stress without promoting adaptation to the training.

Animals were trained for 60 minutes 5 times per week for 6 weeks in an adapted swimming system with water heated to 31 ± 1 °C. The training occurred between 10:00 AM and 12:00 PM. The training tank used for this study was 80 cm in length, 50 cm in width, and 90 cm in depth.²⁰ The workload (weight on the back) was gradually increased to up to 5% of the animal's body weight (Table 1).

Sedentary animals were placed in shallow water (5 cm in depth) heated to 31 ± 1 °C, for 60 minutes 5 times per week without the work load to undergo the same level of stress without being submitted to the effects of physical training.

Table 1. Swimming protocol, with training time from week 1 to week 6, held from Monday to Friday

Week	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
1	20 min WO	30 min WO	40 min WO	50 min WO	60 min WO
2	40 min 2% BW	50 min 2% BW	60 min 2% BW	60 min 2% BW	60 min 2% BW
3	40 min 5% BW	50 min 5% BW	60 min 5% BW	60 min 5% BW	60 min 5% BW
4–6	60 min 5% BW				

There were $n = 10$ rats per group.

Abbreviations: BW, body weight; WO, without overload.

Acute exercise protocol

As a complement to the study and to explain chronic changes in cholinesterase activities, we aimed to verify changes in these enzymes due to an acute bout of exercise. For this purpose, a subset of healthy normotensive rats were randomly divided into 2 groups: a group that would remain at rest ($n = 5$) and a group that was submitted to an adaptation training week before the swimming test ($n = 5$). In the swimming session test, rats performed 60 minutes of swimming with a workload (weight on the back) of 5% of the animal's body weight.⁵ Rats were anesthetized and killed immediately after the acute swimming test, blood was collected, and lymphocytes and serum were separated for further analysis. The same acute protocol was performed with hypertensive rats, but because there was no difference between hypertensive and normotensive groups, we omitted these results.

Hemodynamic parameter determination

In all rats, systolic BP was measured in awake animals by tail-cuff plethysmography (RTBP1001 Rat Tail Blood Pressure System for rats and mice; Kent Scientific, Torrington, CT). Rats were conditioned with the apparatus before measurements were taken. BP was recorded at the end of experiment (last treatment week).

Blood collection

Twenty-four hours after the last swimming session, the animals were anesthetized with halothane and killed. Halothane was administered by the closed technique in a dose of 0.5%, according to Halothane bull (Tanohalo 1:1 ml; CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos) adapted to rats. The animals were kept in a closed chamber, which became an environment saturated with anesthetic, for approximately 2 minutes. Blood was collected by cardiac puncture in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid as anticoagulant for lymphocytes separation. Tubes without anticoagulant were used to obtain serum.

Isolation of mononuclear cells

Mononuclear leukocytes were isolated from blood collected with ethylenediaminetetraacetic acid and separated

on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum.²¹ Despite the methodology described above to be used for separating mononuclear cells, the work done by Jaques *et al.*²² demonstrated that there is a high incidence of lymphocytes in separate samples and the amount of monocytes is almost insignificant. For this reason, we will consider the samples as containing only lymphocytes.

AChE activity determination

Whole blood AChE activity was determined by the method of Ellman *et al.*²³ modified by Worek *et al.*²⁴ To achieve temperature equilibration and complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated for 10 minutes before addition of substrate. Enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. The BuChE was inhibited by ethopropazine. AChE activity was measured at 436 nm and 37 °C using polystyrol cuvetts.

AChE activity in lymphocytes was determined according to the method described by Ellman *et al.*²³ modified by Fitzgerald and Costa.²⁵ Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1–0.2 mg/ml. Then 0.2 ml of intact cells were added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine (ATC), 0.1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30 minutes at 27 °C, the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. The results are expressed as $\mu\text{mol/h/mg}$ of protein.

BuChE activity determination

The BuChE enzymatic assay was determined in serum by a modification of the spectrophotometric method of Ellman *et al.*²³ The reaction mixture (2 ml final volume) contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2 minutes of incubation at 25 °C. Enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol BuSch/h/mg}$ of protein.

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford²⁶ using serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically using 2-way analysis of variance using SSPS 18.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL), followed by Tukey's multiple range tests. Some data were analyzed using Student *t* test and others by Pearson correlation. Differences were considered significant when $P < 0.05$, and variables are presented as mean \pm SD.

RESULTS

Oral administration of L-NAME induced a significant increase in BP when compared with the other groups,

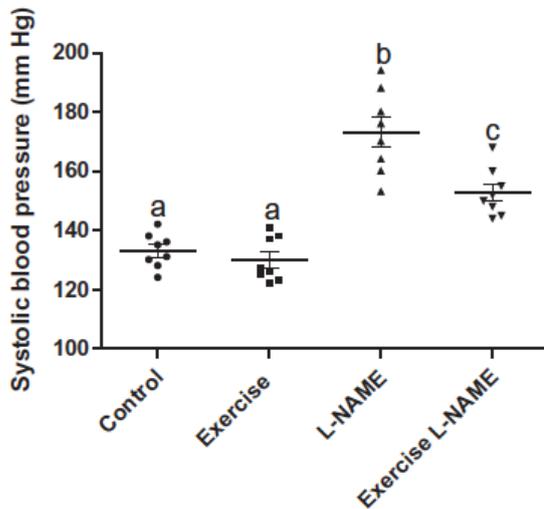


Figure 1. Final systolic blood pressure measurements of Control group, Exercise group, Nw-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) group, and Exercise L-NAME group. Systolic blood pressure was followed as described in the Methods section. Data are presented as means \pm SD. Groups ($n = 10$ per group) with different letters are statistically different (2-way analysis of variance, $P < 0.05$).

corroborating previous studies that have demonstrated the same effect.^{5,8-10} On the other hand, exercise clearly affords a hypotensive effect, significantly reducing BP in the Exercise L-NAME group (interaction between factors $F(3,28) = 7.63$; $P = 0.01$) (Figure 1). No difference was observed in the body weight and food and water consumption after the administration of L-NAME between the experimental groups (data not shown).

Results obtained for the AChE activity in lymphocytes are shown in Figure 2. Statistical analysis showed a significant hypertension vs. exercise interaction ($F(3,36) = 4.80$; $P = 0.049$). Post hoc comparison revealed that the hypertension development was associated with a significant rise in AChE activity in the L-NAME group when compared with the other groups ($P < 0.05$). Also, swimming training protected against the L-Name-induced BP increase in the Exercise L-NAME group ($P < 0.05$) (Figure 2a). Regarding the acute effect of a single bout of exercise (Figure 2b), we observed a significant increase in the AChE activity after exercise ($P = 0.01$). Figure 2c shows a positive Pearson correlation between AChE activity and systolic BP ($r = 0.5721$; $P = 0.01$), indicating that AChE activity rises as blood pressure rises.

Figure 3 shows results obtained for AChE activity in whole blood. Statistical analysis showed a significant hypertension vs. exercise interaction ($F(3,36) = 6.49$; $P = 0.01$). Hypertension development was associated with a significant increase in AChE activity in the L-NAME group when compared with the other groups ($P < 0.05$), and swimming training was efficient in preventing this alteration in the Exercise L-NAME group. Exercise per se decreased AChE activity in the Exercise group when compared with the other

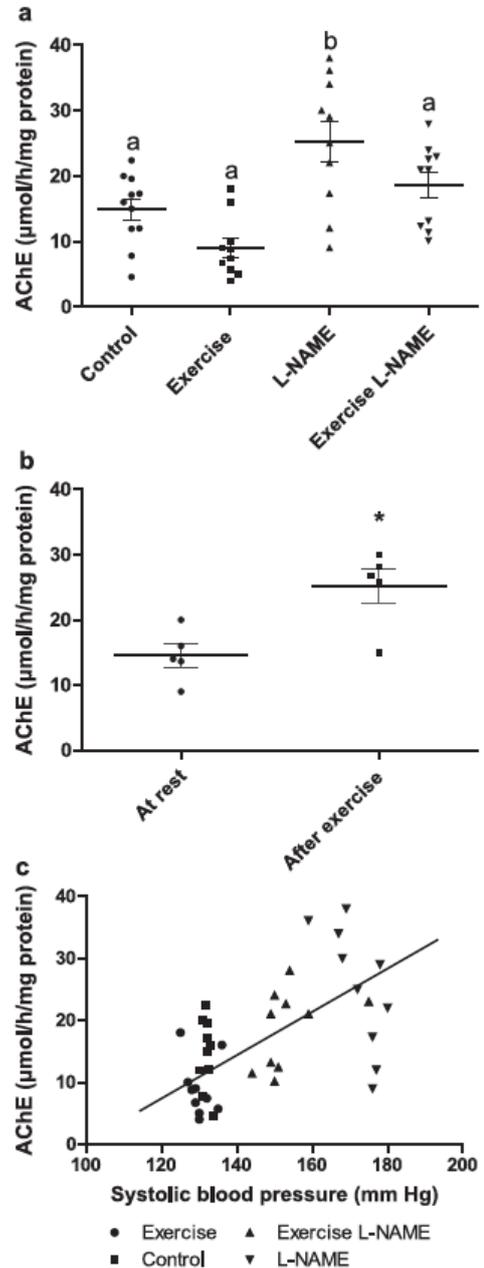


Figure 2. Acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes. (a) AChE activity in lymphocytes of Control group, Exercise group, Nw-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) group, and Exercise L-NAME group. Data are presented as means \pm minimums and maximums. Groups ($n = 10$ per group) with different letters are statistically different (2-way analysis of variance, $P < 0.05$). (b) AChE activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise. Data are presented as means \pm SD. * indicates statistical difference (Student t test, $P < 0.05$) ($n = 5$ per group). (c) Pearson correlation between AChE activity and systolic blood pressure ($r = 0.5721$; $P < 0.05$).

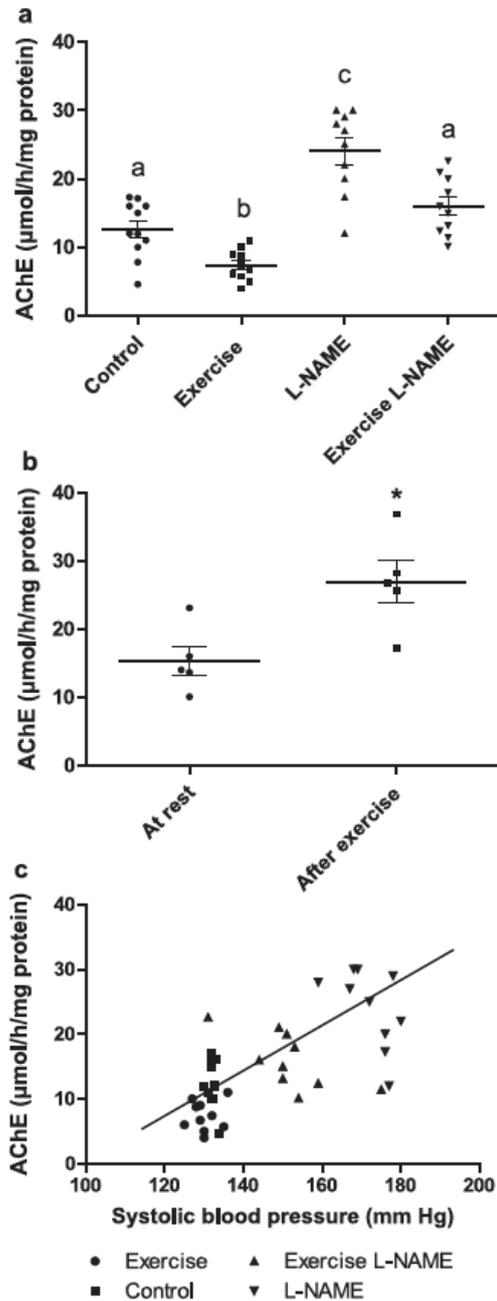


Figure 3. Acetylcholinesterase (AChE) activity in whole blood. (a) AChE activity in whole blood of Control group, Exercise group, Nw-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) group, and Exercise L-NAME group. Data are presented as means \pm SD. Groups ($n = 10$ per group) with different letters are statistically different (2-way analysis of variance, $P < 0.05$). (b) AChE activity in whole blood of rats at rest and after an acute bout of exercise. Data are presented as means \pm SD. * indicates statistical difference (Student t test, $P < 0.05$) ($n = 5$ per group). (c) Pearson correlation between AChE activity and systolic blood pressure ($r = 0.6121$; $P < 0.05$).

groups ($P < 0.05$) (Figure 3a). Regarding the acute effect of a single bout of exercise (Figure 3b), we observed a significant increase in AChE activity immediately after exercise ($P = 0.01$). Figure 3c shows a positive Pearson correlation between AChE activity and systolic BP ($r = 0.6121$; $P = 0.02$), indicating that AChE activity rises as blood pressure rises.

BuChE activity, measured in serum, presented the same behavior as lymphocytic AChE activity, as shown in Figure 4 (interaction between factors $F(3,36) = 9.16$; $P = 0.005$). Hypertension development was associated with a significant rise in BuChE activity in the L-NAME group when compared with the other groups ($P < 0.05$), and swimming training was efficient in preventing this alteration in the Exercise L-NAME group (Figure 4a). Figure 4b shows that after a single bout of exercise, BuChE activity was significantly increased ($P < 0.01$). Figure 4c shows a positive Pearson correlation between BuChE activity and systolic BP ($r = 0.5811$; $P = 0.03$), indicating that AChE activity increases as blood pressure increases.

DISCUSSION

Hypertension is accompanied by vascular inflammation, which is characterized by infiltration of immune cells. In addition to vascular growth and proliferation of vascular smooth muscle cells, inflammation plays a key role in the vascular remodeling, which participates in the mechanisms leading to BP elevation.^{3,27,28} On the other hand, regular physical activity has been shown to have a central role in hypertension prevention or treatment and its anti-inflammatory effect is one of the main mechanisms involved.¹⁷

Several studies have shown the beneficial effects of regular physical activity in reducing elevated BP. Thus, regular physical exercise has been recommended by health professionals to maintain good cardiovascular fitness and prevent or treat hypertension.^{5,6,11,12} It has become evident that regularly performed aerobic exercise significantly reduces the high BP in rats with spontaneous hypertension^{29,30} and in rats with hypertension induced by L-NAME administration,^{6,11,12} as shown in a recent study developed by our group using the same experimental design.⁵

It has been widely recognized that lymphocytic cholinergic activity reflects well the changes in immune system function.¹³ In addition, plasma alteration in AChE and BuChE activities serves as a marker of low-grade systemic inflammation.² Using this line of reasoning, we have demonstrated that the development of hypertension was associated with a significant increase in AChE activity in lymphocytes and whole blood as well as in BuChE activity measured in serum in the L-NAME group when compared with the other groups. In addition, the rise in AChE and BuChE activities positively correlated with the increase in BP. These experimental data agree with several studies that have already shown the significant increase of these enzymes in the plasma and tissue of patients with Alzheimer's disease, diabetes mellitus, hypertension, insulin resistance, hyperlipidemia, and leukemia.^{2,13,31,32} Ofeck *et al.*³³ showed that subjects expressing high levels of plasma cholinesterases may produce higher levels of proinflammatory cytokines under infectious insults. This

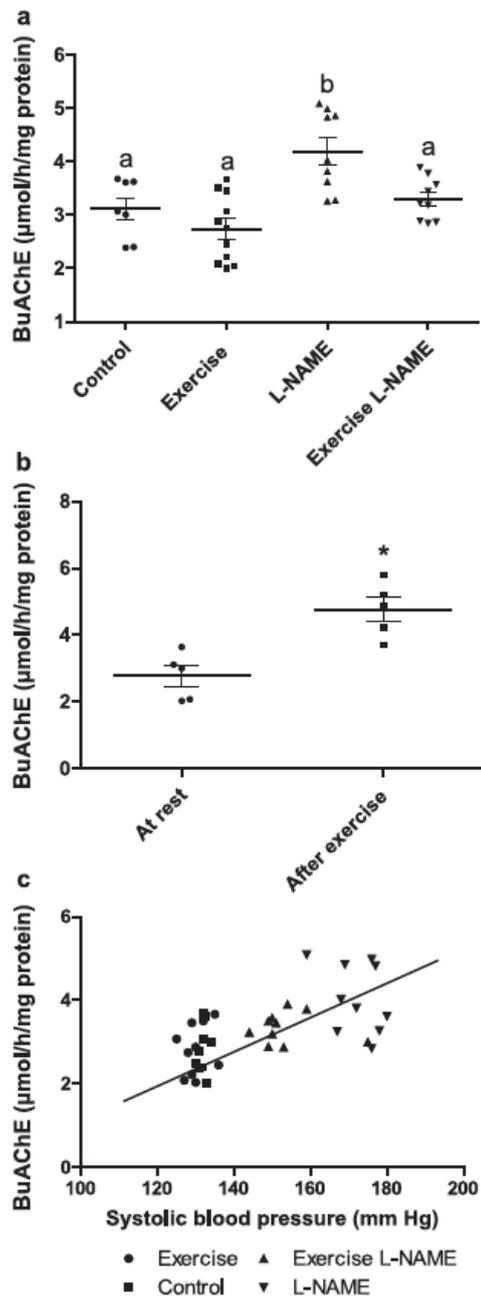


Figure 4. Butyrylcholinesterase (BuChE) Activity in serum. (a) BuChE activity in serum of Control group, Exercise group, Nw-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) group, and Exercise L-NAME group. Data are presented as means \pm minimums and maximums. Groups ($n = 10$ per group) with different letters are statistically different (2-way analysis of variance, $P < 0.05$). (b) BuChE activity in lymphocytes of rats at rest and after an acute bout of exercise. Data are presented as means \pm SD. * indicates statistical difference (Student t test, $P < 0.05$) ($n = 5$ per group). (c) Pearson correlation between BuChE activity and systolic blood pressure ($r = 0.5811$; $P < 0.05$).

suggests that the increase in cholinesterase activities is a way to combat infections through the release of proinflammatory cytokines (positive response). However, this alternative is less plausible for our study because acute infection is not comparable with the low-grade inflammation verified in hypertension. Instead, our study corroborates Ofeck et al.,³³ clearly showing the positive correlation between inflammation and rise in cholinesterase activities. In addition, the hypertensive rats probably presented augmented levels of proinflammatory cytokines when compared with the normotensive rats, although this has not been measured. Our findings are also corroborated by Ben-Assayang et al.,³⁴ who demonstrated the power of circulation cholinesterase measurements as useful early diagnostic tools for the occurrence of stroke.

As a result of increased activities of AChE and BuChE, the levels of ACh probably decreased in L-NAME-treated rats. In this context, the cholinergic anti-inflammatory pathway,^{2,3} mediated by ACh, which acts by inhibiting the production of tumor necrosis factor, interleukin 1, macrophage migration inhibitory factor, and high mobility group box 1 and suppresses the activation of nuclear factor kappa B expression,² becomes impaired. Thus, it is plausible to propose that both AChE and BuChE enhance inflammation in hypertensive rats by inactivating ACh, and this situation may represent an augmented risk to the development of hypertension-associated complications. In the same context, it is important to point out that, although we have not identified the lymphocytes T and B, the main effects are probably related to the T cells because these cells show enhanced synthesis and release of ACh as well as increased AChE expression when compared with B cells.¹³

Of great interest to our work, we tested the effect of 6 weeks of swimming training on AChE and BuChE activities in hypertensive rats and demonstrated that this training was efficient in preventing the alterations in these enzyme activities in the Exercise L-NAME group. The maintenance of these enzyme activities by physical training indicates that the levels of ACh are probably preserved in the vascular extracellular medium and thus help to avoid inflammatory processes induced by the development of hypertension. Other studies have assessed the effects of chronic physical training on the rat brain.^{14,16} However, this is the first study aiming to verify the effects of exercise on the cholinergic system and in relation to hypertensive inflammation. Ben et al.¹⁴ found that physical training prevented an increase in AChE activity in the brain of ovariectomized rats, but exercise per se presented no effect. Ben-Ari et al.³⁵ verified that exercise increased the number of AChE-positive fibers in the molecular layer, reduced cerebellar cytokine levels, and suppressed serum AChE activity, suggesting anti-inflammatory protection by enhanced cholinergic signaling. In our study, swimming training presented a similar prevention of AChE activity alterations, despite the differences in the research focus. It is plausible to infer that one of the mechanisms by which swimming training prevented alterations in cholinesterase activities is related to the involvement of microRNA 132 in potentiating cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting AChE.³⁶

To understand chronic alterations displayed by swimming training in the cholinergic system, we verified the acute

effect of a single bout of exercise. We observed a significant increase in AChE and BuChE activities immediately after exercise. Similar findings were reported by Schulpset *et al.*¹⁵ in erythrocyte AChE activity in players immediately after a game. Moreover, Kaufer *et al.*³⁷ also verified an increase in brain AChE gene expression after 10 minutes of acute swimming. On the contrary, Tsakiriset *et al.*¹⁹ found a decrease in AChE activity in response to acute exercise in rat brain. The differences between findings are probably related to AChE localization and the experimental protocol because effects on ACh modulation differ depending on the cell surface and stimuli.

As stated by Schulpset *et al.*,¹⁵ AChE stimulation in response to acute exercise may be related to the additional release of ACh as well as of catecholamines, serotonin, and/or cortisol in the blood. The large ACh release may be related to its endothelium-dependent vasodilatation function,³⁸ as well as to an anti-inflammatory microenvironment caused by the acute exercise bout. Furthermore, it may be related to the discharge of anti-inflammatory cytokines and the modulation of immune cells already described in a review by Gleeson *et al.*¹⁷ because ACh has the above-mentioned anti-inflammatory properties.² In the same context, Gilboa-Geffen *et al.*³⁹ reported that stress-induced increases in ACh act to mitigate inflammatory response and restore homeostasis.

As reported before, chronic exercise in hypertensive rats prevented cholinesterase stimulation and reduced BP in the Exercise L-NAME group. It is reasonable to assume that the increase of cholinesterase activities as a result of acute exercise may produce an adaptation by the organism. That is, with several exercise sessions cholinesterase becomes prepared to receive an exercise stimulus and a major ACh release. In this sense, when the organism is in a resting condition, it maintains low enzyme activity, as shown by our results, probably because low ACh is required in blood circulation in an organism already adapted to training, as in our study. Another possible explanation for the low activity of AChE and BuChE due to chronic exercise effects found in our study is that even if a large amount of circulating ACh is being released in an organism at rest and already adapted to physical training, the enzyme activities are kept low to allow ACh action. The second inference seems to be more plausible mainly because of the ACh action in endothelial cells that mediates vasorelaxation and thus may contribute to the hypotensive effects of exercise. In endothelial cells, ACh acts through muscarinic (M3 or M5) receptors. This results in an activated endothelial NO synthase, which leads to the production of NO stimulating soluble guanylyl cyclase to produce cyclic guanosine monophosphate. Protein kinase G activated by cyclic guanosine monophosphate promotes relaxation.³⁸ However, further studies are necessary to elucidate these possible mechanisms.

In conclusion, our study suggests that moderate exercise training prevents cholinesterase alterations related to inflammatory processes in rats that developed hypertension in response to oral administration of L-NAME. This was probably because of the adaptation of these enzymes to stimuli caused by the exercise sessions, which can modulate cholinesterase activities. This modulation can

be understood as another anti-inflammatory mechanism generated by exercise that contributes to the control of BP, highlighting the great protective effect of exercise training to avoid hypertension-related inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), and Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net). Furthermore, the authors would like to thank to the members of BioEx (Laboratório de Bioquímica do Exercício - UFSM) for the help during the experiment.

DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

REFERENCES

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005;365:217–223.
2. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 2007; 13(12):RA214–RA221.
3. Schiffrin EL. T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19:181–186.
4. Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640–642.
5. Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D, Schmatz R, Gutierrez J, Pimentel VC, Thomé G, Leal CAM, Vieira JM, Stefanello N, Fiorin FS, Baldissarelli J, Royes LFF, Bello-Klein A, Morsch VM, Schetinger MRC. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2012 doi:10.1002/cbf.2868.
6. Husain K. Exercise conditioning attenuates the hypertensive effects of nitric oxide synthase inhibitor in rat. *Mol Cell Biochem* 2002;231: 129–137.
7. Azegami T, Sasamura H, Hayashi K, Itoh H. Vaccination against the angiotensin type 1 receptor for the prevention of L-NAME-induced nephropathy. *Hypertens Res* 2012;35:492–499.
8. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992;90:278–281.
9. Fürstenau CR, Trentin DS, Gossenheimer AN. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:223–229.
10. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298–303.
11. Kuru O, Sentürk UK, Demir N. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur J Appl Physiol* 2002;87:134–140.
12. Kuru O, Sentürk UK, Koçer G. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 2009;107:896–902.
13. Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 2003;74:675–696.
14. Ben J, Soares FM, Cechetti F, Vuaden FC, Bonan CD, Netto CA, Wyse AT. Exercise effects on activities of Na(+),K(+)-ATPase,

- acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. *Brain Res* 2009;1302:248–255.
15. Schulpis KH, Parthimos T, Tsakiris T, Parthimos N, Tsakiris S. An in vivo and in vitro study of erythrocyte membrane acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities in basketball players on a-tocopherol supplementation. The role of L-carnitine. *Clin Nutr* 2007; 26:63–69.
 16. Jolitha AB, Subramanyam MMV. Age-related responses of the rat cerebral cortex: influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system. *Biogerontology* 2009;10:53–63.
 17. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev* 2001;607–615.
 18. Husain K, Somani SM. Effect of exercise training and chronic ethanol ingestion on cholinesterase act and lipid peroxidation in blood and brain regions of rat. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 1998;22:411–423.
 19. Tsakiris T, Angelogianni P, Tesseromatis C, Tsakiris S, Schulpis K H. Effect of L-carnitine administration on the modulated rat brain protein concentration, acetylcholinesterase, Na⁺K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities induced by forced swimming. *Br J Sports Med* 2008;42:367–372.
 20. Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Corte LCD, Silva LFA, Retamoso LT, Corte CLD, Puntel GO, Avila DS, Soares FAA, Figuera MR, Mello CE, Royes, LFF. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 2009;50:811–823.
 21. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;97:77–89.
 22. Jaques JAS, Rezer JFP, Ruchel JB, Gutierrez J, Bairros AV, Gomes Farias IL, Almeida da Luz SC, Mello Bertoncheli C, Chitolina Schetinger MR, Morsch VM, Leal DB. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. *Anal Biochem* 2009;410:34–39.
 23. Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95.
 24. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold D, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Chim Clin Acta* 1999;288:73–90.
 25. Fitzgerald BB, Costa LG. Modulation of muscarinic receptors an Acetylcholinesterase activity in lymphocytes and brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1993;20:210–216.
 26. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
 27. Viridis A, Schiffrin EL. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:181–187.
 28. Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci* 2007;112:375–384.
 29. Fregly MJ. Effect of an exercise regimen on development of hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1984;56:381–387.
 30. Tipton CM, Sebastian LA, Overton JM. Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. *J Appl Physiol* 1991;71:2206–2210.
 31. Alcantara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Scartezini M, Cerci MS, Braun-Prado K, Picheth G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62: 399–404.
 32. Battisti V, Schetinger MRC, Maders LDK, Santos KF, Bagatini MD, Correa MC, Spanevello RM, Araújo MCA, Morsch VM. Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clinica Chimica Acta* 2009;402:114–118.
 33. Ofek K, Krabbe SK, Evron T, Debecco M, Nielsen AR, Brunnsaad H, Yirmiya R, Soreq H, Pedersen BK. Cholinergic status modulations in human volunteers under acute inflammation. *J Mol Med* 2007;85:1239–1251.
 34. Ben Assayag E, Shenhar-Tsarfaty S, Ofek K, Soreq L, Bova I, Shopin L, Berg RM, Berliner S, Shapira I, Bornstein NM, Soreq H. Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. *Mol Med* 2010;16:278–286.
 35. Ben-Ari S, Ofek K, Barbash S, Meiri H, Kovalev E, Greenberg DS, Soreq H, Shoham S. Similar cation channels mediate protection from cerebellar excitotoxicity by exercise and inheritance. *J Cell Mol Med* 2012;16:555–568.
 36. Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R, Greenberg D, Gilboa-Geffen A, Soreq H. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Cell Press* 2009;31:965–973.
 37. Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 1998;393: 373–377.
 38. Harvey RD. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. *Handb Exp Pharmacol* 2012;208:299–316.
 39. Gilboa-Geffen A, Hartmann G, Soreq H. Stressing hematopoiesis and immunity: an acetylcholinesterase window into nervous and immune system interaction. *Front Mol Neurosci* 2012;5:1–10.

4. DISCUSSÃO

Atualmente, a hipertensão configura-se como um grave problema de saúde pública mundial (BRASIL, 2013). O aumento da pressão sanguínea é um fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares e correlaciona-se positivamente com o número de mortes pelas mesmas (WILLIAMS, 2010). Esta patologia caracteriza-se como uma condição clínica multifatorial que envolve diversas alterações metabólicas. Embora muitos estudos estejam voltados para desvendar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão e suas complicações (FAUCI et al., 2009; LLOYD-JONES et al., 2009; DBH, 2010; BRASIL, 2013), ainda existem muitos questionamentos que necessitam ser elucidados a fim de melhor compreender o que ocorre em nível celular em indivíduos hipertensos.

Os estudos mais recentes sobre a hipertensão tem seu foco principal nos mecanismos inflamatórios e trombóticos que, sabidamente, acompanham a patologia em maior ou menor grau (BONNER et al., 2012; KANTHI et al., 2014; SHIFFRIN et al., 2014). Isto porque estes são os principais fatores responsáveis pelas complicações advindas da patologia, como os eventos agudos que na maioria das vezes causam danos irreversíveis ao organismo ou são fatais (SHIFFRIN et al., 2014).

A hipertensão está acompanhada por um quadro inflamatório de baixo grau e por uma maior atividade plaquetária (SHIFFRIN et al., 2014). Entretanto os mecanismo envolvidos nestas respostas ainda precisam ser melhor esclarecidos. Sabe-se que existe um envolvimento importante dos sistemas purinérgico e colinérgico a nível vascular nestes processos (DAS, 2007; KANTHI et al., 2014). A regulação dos níveis dos nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP), da adenosina e da acetilcolina parece ser um ponto chave na indução de respostas pró ou anti-inflamatórias, bem como pró ou anti-agregantes (KANTHI et al., 2014). Sendo assim, fica claro que as enzimas responsáveis pela hidrólise destas moléculas e, conseqüentemente, responsáveis pela regulação de seus níveis, exercem um papel imprescindível no funcionamento do organismo em condições fisiológicas e patológicas.

Dentre as diversas formas de tratamento para a hipertensão, a prática regular de exercícios físicos, desde as décadas passadas, tem sido descrita como um dos principais coadjuvantes no tratamento desta patologia. Seus efeitos quanto à redução da pressão sanguínea são irrefutáveis (TIPTON et al., 1991; VERAS-SILVA et al., 1997; O'SULLIVAN & BELL, 2000; HUSAIN, 2002; KURU et al., 2002; FAGARD & CORNELISSEN, 2007; KURU et al., 2009; RYAN et al., 2014) , mas os mecanismos que contribuem para esta resposta ainda requerem maior atenção. Durante uma sessão de exercício aeróbico moderado, como no modelo de natação utilizado no presente estudo, existe a mobilização de moléculas como o ATP e ACh. Até o presente momento, a relação entre o exercício e essas moléculas apenas havia sido analisada em termos de suas respostas vasodilatadoras (ALONSO, 2012; HELLSTEN et al., 2012).

Sendo assim, este é um trabalho pioneiro no qual investigou-se o efeito de seis semanas de natação sobre a atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico em componentes sanguíneos, bem como na agregação plaquetária em ratos hipertensos induzidos por L-NAME. Além disso, as respostas agudas das atividades enzimáticas frente a uma única sessão de natação também foram analisadas com o objetivo de explicar as alterações crônicas. Para complementar o estudo e confirmar a relação das enzimas em questão com a inflamação, foram dosados os níveis de marcadores inflamatórios clássicos (PCR, MPO e ácido úrico), bem como os níveis de colesterol total e triglicerídeos.

Os resultados obtidos indicam que a indução da hipertensão gerou um aumento na atividade das enzimas NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e adenosina desaminase em plaquetas. Tendo em vista que o ATP e o ADP são moléculas que induzem a ativação plaquetária (DEAGLIO & ROBSON, 2011), um aumento na atividade das enzimas que hidrolisam esses substratos poderia representar uma forma de mecanismo compensatório do organismo para evitar essa ativação. Não foram observadas mudanças significativas na atividade da E-NPP, mas houve uma tendência à ativação desta enzima em resposta a hipertensão. Existe a possibilidade de que se os ratos se mantivessem nesta condição patológica por mais tempo, uma ativação mais pronunciada da enzima poderia ter sido encontrada. Por outro lado, os resultados obtidos para a E-NPP podem sugerir que os efeitos gerados pelo modelo

experimental estejam mais relacionados às outras enzimas do sistema purinérgico e que a E-NPP pode ter uma baixa expressão nas células analisadas.

Embora o aumento da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em plaquetas pudesse favorecer a formação da adenosina, o aumento na atividade da ADA indica claramente que a adenosina formada pela ação da ecto-5'-nucleotidase pode estar sendo degradada e não estar exercendo seus efeitos anti-agregantes (KAHNER et al., 2005; DEAGLIO & ROBSON, 2011). Isso foi confirmado pelo aumento na agregação plaquetária observado nos ratos hipertensos. Estes resultados confirmam o fato de que a patologia relaciona-se com o risco do desenvolvimento de processos trombóticos e ressaltam a importância do sistema purinérgico neste contexto.

Além de seu envolvimento na ativação plaquetária, o sistema purinérgico relaciona-se com os processos inflamatórios na hipertensão (JUNGER, 2011; KANTHI et al., 2014). Os resultados do presente estudo corroboram com esta afirmação, pois verificou-se que aliado ao aumento nos níveis dos marcadores inflamatórios clássicos, ocorreu o aumento das enzimas NTPDase e ADA nos linfócitos de ratos hipertensos. Isto indica que níveis aumentados de ATP estão sendo liberados no meio extracelular e que a adenosina formada, que poderia estar exercendo suas ações anti-inflamatórias, está sendo hidrolisada e inativada pela ADA (SCHENK et al., 2008; JUNGER, 2011). Além disso, o provável aumento dos níveis de ATP na circulação sugere uma maior ativação dos linfócitos com a consequente liberação de mediadores inflamatórios (JUNGER, 2011. KANTHI et al., 2014).

Evidenciando o estado inflamatório observado nos ratos hipertensos, verificou-se um aumento na atividade das enzimas colinérgicas AChE e BuChE em linfócitos, sangue total e soro. A partir desse resultado, pode-se inferir que níveis diminuídos de ACh estão disponíveis na circulação. Sendo a ACh uma molécula com ações anti-inflamatórias (DAS, 2007), uma diminuição na sua concentração pode estar interligada ao desenvolvimento do quadro inflamatório comum à hipertensão e que foi confirmado a partir da elevação dos níveis da PCR, MPO e ácido úrico. Esta relação entre o quadro inflamatório e atividade aumentada das colinesterases já é bem descrita na literatura (DAS, 2007; KAWASHIMA et al., 2003).

Quando analisados em conjunto, os dados obtidos quanto às atividades enzimáticas nos permitem inferir que o ATP (molécula pró-inflamatórias) e o ADP (molécula pró-agregante) estão sendo liberados no meio extracelular em maior quantidade em ratos hipertensos e que as moléculas que exerceriam ações anti-agregantes (adenosina) e anti-inflamatórias (ACh) estão sendo rapidamente hidrolisadas e inativadas. É importante ressaltar aqui que este trabalho demonstrou que o aumento da atividade das NTPDase, ADA e AChE em linfócitos, bem como o aumento da atividade da AChE em sangue total e BuChE em soro correlacionaram-se positivamente com o aumento da pressão sanguínea.

Este cenário evidencia claramente a relação destas enzimas com a hipertensão e corrobora com o já descrito por Kanthi et al. (2014) e Das (2007) sobre a importância dos sistemas purinérgico e colinérgico no desenvolvimento e na progressão da inflamação e dos processos tromboembólicos responsáveis pelas complicações advindas da hipertensão. Diversos estudos realizados em nosso grupo de pesquisa confirmam a relação entre modificações nas atividades das ectonucleotidases, da ADA e das colinesterases em componentes sanguíneos em resposta a diversas patologias que possuem como característica o processo inflamatório (SCHETINGER et al., 2007; SPANEVELLO et al., 2010; BERTONCHELI et al., 2012; SOUZA et al., 2012; ZANINI et al., 2013), dados esses que se assemelham com as proposições aqui descritas.

De grande relevância científica e que configura-se como o ponto principal deste trabalho, o exercício físico mostrou-se como um potente protetor e regulador da atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico em ratos hipertensos, além de, como já esperado (HUSAIN, 2002; KURU et al., 2002; FAGARD & CORNELISSEN, 2007; KURU et al., 2009; RYAN et al., 2014), reduzir os níveis da PA.

No presente estudo, seis semanas de natação foram capazes de prevenir o aumento da atividade das enzimas NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA em plaquetas de ratos com hipertensão induzida através da administração de L-NAME. O fato de manter a atividade enzimática nos mesmos níveis dos ratos normotensos indica que os níveis circulantes de ATP e ADP que são moléculas que induzem a agregação plaquetária (KAHNER et al., 2005; DEAGLIO e ROBSON, 2011) se

mantiveram em níveis fisiológicos, o que provavelmente contribuiu para seus efeitos em prevenir a agregação plaquetária.

Além disso, a atividade da ADA reduzida no grupo hipertenso tratado com o exercício pode não apenas indicar uma diminuição em toda a cascata de hidrólise de nucleotídeos, mas, principalmente sugerir que uma maior quantidade de adenosina estará disponível na circulação, podendo exercer seus efeitos anti-agregantes (BAKKER et al., 1994; DEAGLIO e ROBSON, 2011). Sendo assim, esta modulação exercida pelo exercício nas plaquetas pode ser entendida como um dos mecanismos relacionados aos efeitos protetores do exercício quanto aos processos tromboembólicos que representam risco adicional na hipertensão. Estes achados corroboram com os de Singh et al. (2006) que reforça o fato de que, cronicamente, o exercício físico é capaz de produzir adaptações plaquetárias que geram a redução de sua ativação, sendo, dessa forma, cardioprotetor.

Além de promover adaptações benéficas quanto a ativação das plaquetas, as seis semanas de treinamento físico preveniram o aumento da atividade da NTPDase em linfócitos, sugerindo uma possível redução dos níveis de ATP no meio extracelular. Com relação à expressão da NPTDase1, o exercício *per se* gerou a redução da expressão desta enzima, mas não apresentou efeitos significativos nos ratos hipertensos. Contudo, essa redução ocasionada pelo exercício também corrobora para o fato de que o exercício possuiu o potencial de reduzir os níveis de ATP circulante. Esta resposta pode ser relacionada à redução da inflamação e à manutenção da integridade endotelial promovida pelo exercício (GLEESON et al., 2011; SKRYPNIK et al., 2014), pois, células menos estressadas liberam menor quantidade de ATP e, conseqüentemente, geram menor ativação dos linfócitos (JUNGER, 2011). Ainda, o ATP liberado pode estar agindo nos receptores P2 das células endoteliais para promover a vasodilatação (ALONSO, 2012), fator importante para a redução da PA.

Corroborando com a relação entre os componentes do sistema purinérgico, o exercício físico e a inflamação, observou-se que o exercício manteve a atividade da ADA nos mesmos níveis verificados nos ratos normotensos. Essa atividade reduzida (quando comparada com os hipertensos) indica que maior quantidade de adenosina pode estar disponível no espaço extracelular. Sabendo-se que a adenosina possui propriedades anti-inflamatórias (JUNGER, 2011) e antitrombóticas (DEAGLIO e

ROBSON, 2011), esses resultados, aliados aos encontrados nas análises plaquetárias, confirmam os efeitos protetores do exercício físico e indicam que estes possam ser possíveis mecanismos para o controle da pressão arterial.

Além de seu papel como regulador da atividade das enzimas purinérgicas, o exercício físico também preveniu o aumento da atividade das colinesterases em componentes sanguíneos de ratos hipertensos. A baixa atividade enzimática observada após o treinamento indica que os níveis de ACh estão preservados no meio extracelular na vasculatura e, dessa forma, estão ajudando a evitar e/ou controlar a inflamação (DAS, 2007) induzida pela hipertensão.

Como forma de comprovar a relação entre as enzimas purinérgicas e colinérgicas na inflamação e os efeitos anti-inflamatórios do exercício em ratos hipertensos, os dados obtidos neste estudos mostraram que a natação foi eficiente em prevenir o aumento de marcadores inflamatórios clássicos (PCR e MPO), além de prevenir a dislipidemia observada em ratos hipertensos. As alterações metabólicas que ocorrem durante a atividade física, bem como, a maior necessidade de suprimento energético pelas células musculares em contração (HERZBERG, 2004) explicam a manutenção dos níveis de colesterol e triglicerídeos. Os efeitos do exercício físico na redução dos níveis de colesterol, triglicerídeos e marcadores inflamatórios já são amplamente conhecidos (HERZBERG, 2004; PASCHALIS et al., 2010; RYAN et al., 2014; SKRYPNIK et al., 2014) e, no presente estudo, tem o papel de salientar os efeitos anti-inflamatórios do mesmo e sua relação com a manutenção das enzimas purinérgicas e colinérgicas.

Interessantemente, o exercício físico não foi capaz de reduzir ou controlar os níveis de ácido úrico em ratos hipertensos. Os estudos recentes apontam uma correlação positiva entre o nível de condicionamento físico, diminuição da pressão sanguínea e baixos níveis séricos de ácido úrico (medida usada tanto como marcador inflamatório quanto de dano renal) (TRAPÉ et al., 2013; NETO et al., 2013). Entretanto, um estudo realizado em ratos com hipertensão induzida através da administração de L-NAME mostrou que o exercício físico moderado gerou aumento nos níveis de ácido úrico e prejuízos na função renal (KURU et al., 2005). Sendo assim, esta é uma questão que deve ser melhor elucidada em pesquisas posteriores. Entretanto, especula-se que o composto L-NAME utilizado para induzir

a hipertensão poderia estar bloqueando os efeitos benéficos do exercício quanto à redução dos níveis de ácido úrico (KURU et al., 2005).

Na tentativa de melhor compreender as alterações crônicas desencadeadas pelo treinamento com a natação, foi realizada a medida da atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico em resposta a uma única sessão de treinamento. Com relação aos resultados para a atividade das ectonucleotidases e da ADA em plaquetas e da AChE em sangue total e linfócitos na sessão aguda de exercício, observa-se um aumento na atividade dessas enzimas imediatamente após o estímulo, indicando que níveis elevados de ATP e ACh estão sendo liberados durante o exercício. Como já salientado, essas moléculas agem como potentes vasodilatadores quando se ligam a seus receptores nas células endoteliais (HELLSTEN et al., 2012). Embora este seja um experimento pioneiro, como a demanda de oxigênio aumenta significativamente durante uma sessão de exercício moderado e mais substâncias vasoativas são requeridas neste processo (ALONSO, 2012), as respostas encontradas configuram-se como algo esperado.

Entretanto, quando analisadas as respostas relacionadas aos parâmetros inflamatórios em resposta ao exercício agudo, parece existir uma contradição. O ATP é considerado como uma molécula pró-inflamatória por desencadear a ativação dos linfócitos (JUNGER, 2011; KANTHI et al., 2014). Já, um aumento nas concentrações circulantes de ACh, estão relacionadas a respostas anti-inflamatórias (DAS, 2007). Durante o exercício, ocorre um aumento na concentração de ambas as moléculas. Entretanto, as atividades das enzimas AChE e NTPDase nos linfócitos são opostas.

Uma menor atividade da NTPDase é observada nos linfócitos, indicando que mais ATP parece estar disponível para se ligar aos receptores nessas células, e, com isso, auxiliar na produção de respostas pró-inflamatórias. Efeitos esses já observados em outros estudos, como, por exemplo, aumento da produção de IL-6 após o exercício (STEENSBERG et al., 2003; GLEESON et al., 2011). Já, a atividade da AChE aumentada nessas células nos permite inferir que mesmo que a molécula esteja sendo produzida em maior quantidade (devido a seus efeitos vasodilatadores), nos linfócitos ela está sendo rapidamente degradada e, dessa forma, seus efeitos anti-inflamatórios não estão sendo exercidos. Ou, ainda, pode-se especular que mesmo que a ACh esteja agindo, as respostas pró-inflamatórias

sobressaem-se em decorrência do estímulo agudo gerado pelo exercício aeróbico moderado (GLEESON et al., 2011).

Entretanto, para que estas suposições se confirmem, é importante que se faça a dosagem do conteúdo circulante de ATP, adenosina e ACh durante uma sessão de exercício. Outro ponto importante que permanece sendo questionado é se a manutenção da pressão sanguínea gerada pelo exercício neste modelo experimental foi causa ou consequência das alterações verificadas na atividade das enzimas estudadas. Esta questão poderia ser melhor elucidada com a realização das dosagens enzimáticas em períodos diferentes do tratamento.

Além disso, cita-se como principal limitação do estudo, o fato de que a indução da hipertensão nos ratos foi realizada através da inibição da produção de ON e, em humanos, a hipertensão geralmente é multifatorial e as alterações vasculares podem ser distintas. Embora este modelo experimental seja bastante utilizado para a compreensão dos mecanismos hipertensivos e de terapias alternativas no tratamento da hipertensão (BAYLIS et al., 1992; RIBEIRO et al., 1992; HUSAIN, 2002; FURSTENAU et al., 2008; FURSTENAU et al., 2010), existe a possibilidade de que as respostas encontradas no presente estudo tenham uma relação mais direta com a inibição da síntese de ON.

Contudo, este estudo permitiu desvendar em parte os mecanismos relacionados aos processos protetores advindos da prática regular de exercício físicos na hipertensão relativos aos processos inflamatórios e à agregação plaquetária. Os resultados observados apontam para o fato de que o exercício atua como modulador da atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico nesta patologia e, dessa forma, pode exercer controle sobre os níveis de ATP, ADP, AMP, adenosina e ACh. Cronicamente, o exercício físico foi capaz de manter as atividades enzimáticas nos mesmos níveis observados em organismos saudáveis, o que correlaciona-se com o fato de ter reduzido a pressão sanguínea. Sugere-se que estas respostas tenham sido provenientes das adaptações ocorridas no organismo decorrentes de cada estímulo agudo, ou seja, de cada sessão de exercício isolada que promoveu um estímulo suficiente para quebrar a homeostase do organismo e promover adaptações benéficas. Entretanto, incentiva-se fortemente que mais estudos sejam realizados afim de melhor elucidar os mecanismos moleculares que estão atuando nesta modulação.

5. CONCLUSÕES

- O treinamento com natação foi capaz de reduzir a pressão sanguínea de ratos com hipertensão induzida através da administração do L-NAME, reforçando os efeitos benéficos da prática regular de exercícios físicos no tratamento da hipertensão. Não foram encontradas diferenças significativas com relação à frequência cardíaca, embora uma tendência à redução tenha sido observada como resposta ao treinamento. Esta diminuição discreta da FC é esperada em resposta ao treinamento aeróbio moderado e reforça o efeito do exercício na adaptação cardiovascular.
- Cronicamente, o exercício físico preveniu o aumento da atividade das enzimas NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e ADA em plaquetas, o que provavelmente contribuiu para seus efeitos em prevenir a agregação plaquetária. Acredita-se que esses efeitos se devem à redução da liberação de ATP e ADP, moléculas pró-agregantes. Não foram observadas alterações na atividade da E-NPP, o que sugere que os efeitos observados estejam mais relacionados às outras enzimas e que a E-NPP pode ter uma baixa expressão nas células analisadas.
- Em linfócitos, o exercício foi eficaz em prevenir o aumento da atividade das NTPDases e da ADA, sugerindo que a possível redução dos níveis de ATP circulantes estejam relacionados com os mecanismos anti-inflamatórios advindos da prática regular de exercícios físicos. Com relação à expressão da NTPDase1, o exercício *per se* gerou a redução da expressão desta enzima, mas não apresentou efeitos significativos nos ratos hipertensos. Contudo, essa redução ocasionada pelo exercício também corrobora para o fato de que o exercício possuiu o potencial de reduzir os níveis de ATP circulante e, com isso, reduzir as respostas inflamatórias.

- O treinamento com a natação também preveniu o aumento da atividade das colinesterases em componentes sanguíneos de ratos hipertensos. Isto pode ser entendido como um outro mecanismo gerado pelo exercício para o controle do processo inflamatório, já que uma maior quantidade de ACh ficará disponível e poderá exercer seus efeitos anti-inflamatórios.
- A prevenção do aumento dos níveis de colesterol, triglicerídeos, PCR e MPO gerada pela prática da natação reforça o fato de que o exercício reduziu a inflamação em ratos hipertensos. Isto também reforça a importância da dosagem das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico como parâmetros inflamatórios e que estes podem ser regulados pela prática regular de exercícios físicos. O exercício físico não foi capaz de reduzir os níveis de ácido úrico em ratos hipertensos, o que pode ter acontecido em função do modelo de indução da hipertensão utilizado.
- O aumento da atividade das enzimas do sistema colinérgico em sangue total, linfócitos e soro e do sistema purinérgico em plaquetas, bem como a diminuição da atividade da NTPDase e da ADA em linfócitos como resposta ao exercício agudo nos permite inferir que durante cada sessão de exercício ocorre um aumento do ATP e ADP circulantes e que a ACh não está exercendo seus efeitos nas células de defesa. Estes fatores indicam que respostas pró-inflamatórias e pró-trombóticas estão ocorrendo durante o exercício, e que estas servem como estímulos para gerar as adaptações benéficas observadas cronicamente, ou seja, após as 6 semanas de treinamento com natação.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho forneceu subsídios importantes para o esclarecimento da relação entre as enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico na hipertensão, bem como o papel da prática regular de exercício sobre as mesmas nesta patologia. Entretanto, muitos aspectos da inter-relação exercício, sistemas colinérgico e purinérgico e hipertensão ainda permanecem desconhecidos.

Neste sentido, aponta-se como foco de futuros trabalhos, o seguinte:

- ✓ Avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação dos sistemas colinérgico e purinérgico através do exercício físico.
- ✓ Realização das dosagens enzimáticas e análise dos parâmetros hemodinâmicos em diferentes momentos do protocolo experimental. Isto permitiria elucidar se as alterações observadas na pressão arterial são causa ou consequência das mudanças verificadas nas atividades enzimáticas.
- ✓ Investigação da expressão gênica dos componentes dos sistemas colinérgico e purinérgico em sangue de ratos hipertensos após a exposição a seis semanas de natação, o que possibilitaria uma melhor compreensão dos resultados contidos nesta tese.
- ✓ Avaliação do efeito de seis semanas de natação sobre os componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico em rins e no encéfalo de ratos hipertensos. Este ponto seria importante para relacionar as alterações sistêmicas observadas através dos resultados desta tese com alterações locais. Neste sentido, evidenciam-se os rins e o encéfalo como focos da investigação por serem locais que sabidamente são afetados pela hipertensão.
- ✓ Investigação da relação entre os sistemas colinérgico e purinérgico na adaptação ao treinamento físico. Isto ajudaria a elucidar o que ocorre no organismo com a prática de exercícios físicos e esclareceria a importância

relativa dos sistemas aqui estudados na melhora do rendimento/performance física.

- ✓ Avaliação da atividade e da expressão das enzimas estudadas em sangue de pacientes hipertensos em resposta a um programa de treinamento físico aeróbio moderado. Desta forma, poder-se-ia validar o modelo experimental utilizado e afirmar que as proposições podem ser estendidas aos pacientes. Além disso, isto proporcionaria maior fidedignidade a experimentos futuros que objetivem a análise dos mecanismos envolvidos nestas alterações, bem como os estudos em outros tecidos utilizando este modelo de indução da hipertensão.

7. REFERÊNCIAS:

ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. **Japanese Journal of Pharmacology**, v 78, p.113-145, 1998.

ALONSO, G.J. ATP as a mediator of erythrocyte-dependent regulation of skeletal muscle blood flow and oxygen delivery in humans. **The Journal of Physiology**, p. 5001-5013, 2012.

American Heart Association (AHA). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure - Complete Report USA. **NIH Publication**, p. 1-66, 2004.

ANATOLIOTAKIS, N.; DEFTEREOS, S.; BOURAS, G.; GIANNOPOULOS, G.; TSOUNIS, D.; ANGELIDIS, C.; KAOUKIS, A.; STEFANADIS, C. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13(2), p. 15-38, 2013.

ANGLADE, P.; LARABI-GODINOT, Y. Historical landmarks in the histochemistry of the cholinergic synapse: perspectives for future researches. **Biomedical Research**, v. 31(1), p. 1-12, 2010.

ARAÚJO, M.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A. Enzymes that hydrolyze nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1740; p. 421– 426, 2005.

ARNDT, H.; RUSSELL, J.B.; KUROSE, I.; KUBES, P.; GRANGER, D.N. Mediators of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules elicited by inhibition of nitric oxide synthesis. **Gastroenterology**, v. 105, p. 675-680, 1993.

AZEGAMI, T.; SASAMURA, H.; HAYASHI, K.; ITOH, H. Vaccination against the angiotensin type 1 receptor for the prevention of L-NAME-induced nephropathy. **Hypertension Research**, v. 35(5), p. 492-499, 2012.

BAGATINI, M.D.; MARTINS, C.C.; BATTISTI, V.; SPANEVELLO, R.M.; GASPARETTO, D.; ROSA, C.S.; GONÇALVES, J.F.; SCHETINGER, M.R.C.; SANTOS, R.B.; MORSCH, V.M. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1181-1185, 2008.

BAGATINI, M.D.; MARTINS, C.C.; GASPARETTO, D.; SPANEVELLO, R.M.; BECKER, L.V.; ROSA, C.S.; BATTISTI, V.; BELLÉ, L.; GONÇALVES, J.F.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. **Clinica Chimica Acta**. v. 412, p. 159–164, 2011.

BALDUS, S. Heeschen, C.; Meinertz, T.; Zeiher, A.M.; Eiserich, J.P.; Münzel, T.; Simoons, M.L.; Hamm, C.W. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 108, p. 1440-1445, 2003.

BANZ, Y.; BELDI, G.; WU, Y.; ATKINSON, B.; USHEVA, A.; ROBSON, S.C. CD39 is incorporated into plasma microparticles where it maintains functional properties and impacts endothelial activation. **British Journal of Haematology**, v. 142(4), p. 627–637, 2008.

BATTISTI, V.; SCHETINGER, M.R.; MADERS, L.D.; SANTOS, K.F.; BAGATINI, M.D.; CORREA, M.C.; SPANEVELLO, R.M.; DO CARMO, M.; MORSCH, V.M. Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 402(1-2), p. 114–118, 2009.

BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 278–281, 1992.

BECKER, L.V.; ROSA, C.S.; SOUZA, V.C.G.; BAGATINI, M.D.; CASALI, E.A.; LEAL, C.A.M.; SILVA, J.C.N.; MORETTO, M.B.; PINHEIRO, F.V.; MORSCH, V.M.; SHETINGER, M.R.C.; LEAL, D.B.R. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1096–1100, 2010.

BERTONCHELI, C.M.; ZIMMERMANN, C.E., JAQUES, J.A.; LEAL, C.A., RUCHEL, J.B. Increased NTPDase activity in lymphocytes during experimental sepsis. **Scientific World Journal** 941906, 2012.

BIAGGIONI, I. Autonomic/metabolic interactions modulating the exercise pressor reflex: the purinergic hypothesis. **Journal of Physiology**, p. 5-6, 2007.

BLAKE, G.J.; RIFAI, N.; BURING, J.E.; RIDKER, P.M. Blood pressure, C-reactive protein, and risk of future cardiovascular events. **Circulation**, v. 108(24), p. 2993–2999, 2003.

BONNER, F.; BORG, N.; BURGHOFF, S.; SCHRADER, J. Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. **PLoS One**, v. 7(4), p. e34730, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: hipertensão arterial sistêmica. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. (Cadernos de Atenção Básica, n. 37)

BRAUN, N., FENGLER, S., EBELING, C., SERVOS, J.; ZIMMERMANN, H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **The Biochemical Journal**, v. 351 (Pt 3), p. 639–647, 2000.

BRIFFA, K.; BRIFFA, T. Aerobic exercise reduces blood pressure in both hypertensive and normotensive persons. **Australian Journal of Physiotherapy**, v. 48, p. 248–252, 2002.

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In:

Straub RW, Bolis L (Editors), Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach. New York: **Raven Press**, p 107-118, 1978.

BURNSTOCK, G. Do some nerve cells release more than one transmitter? **Neuroscience**, v. 1, p. 239-248, 1976.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42(1), p. 3-8, 2009.

CHALMIN, F.; MIGNOT, G.; BRUCHARD, M.; CHEVRIAUX, A.; VEGRAN, F.; HICHAMI, A. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. **Immunity**, v. 36(3), p. 362-73, 2012.

CHEN, Y.; CORRIDEN, R.; INOUE, Y.; YIP, L.; HASHIGUCHI, N.; ZINKERNAGEL, A. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. **Science**, v. 314(5806), p. 1792-1795, 2006.

CHESTER, A.H.; O'NEIL, G.S.; MONCADA, S.; TADJKARIMI, S.; YACOUB, M.H. Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. **Lancet**, v. 336, p. 897-900, 1990.

CHRYSANT, S.G. Current evidence on the hemodynamic and blood pressure effects of isometric exercise in normotensive and hypertensive persons. **The journal of Clinical Hypertension**, v. 9, p. 721-726, 2010.

COOKE, J.P.; TSAO, P.S. Cytoprotective effects of nitric oxide. **Circulation**, v. 88, p. 2451-2454, 1993.

COSTA, M.M.; SILVA, A.S.; PAIM, F.C.; FRANÇA, R.; DORNELLES, G.L.; THOMÉ, G.R.; SERRES, J.D.; SCHMATZ, R.; SPANEVELLO, R.M.; GONÇALVES, J.F.; SCHETINGER, M.R.; MAZZANTI, C.M.; LOPES, S.T.; MONTEIRO, S.G. Cholinesterase as inflammatory markers in a experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits. **Anais da Acadia Brasileira de Ciências**, v. 84(4), p. 1105-1113, 2012.

DALY, R.M.; O'CONNELL, S.L.; MUNDELL, N.L.; GRIMES, C.A.; DUNSTAN, D.W.; NOWSON, C.A. Protein-enriched diet, with the use of lean red meat, combined with progressive resistance training enhances lean tissue mass and muscle strength and reduces circulating IL-6 concentrations in elderly women: a cluster randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99(4), p. 899-910, 2014.

DAS, U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitoring**, v. 13(12), p. RA214-221, 2007.

DATASUS. Ministério da Saúde. 2009. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php?area=0203>. Acesso em: 20, 22, 24 e 25 de junho de 2014.

DE BONA, K.S.; BELLÉ, L.P.; BITTENCOURT, P.E.; BONFANTI, G.; CARGNELLUTI, L.O.; PIMENTEL, V.C.; RUVIARO, A.R.; SCHETINGER, M.R.; EMANUELLI, T.; MORETTO, M.B. **Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: beneficial effect of *Syzygium cumini* leaf extract in vitro**. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 94(1), p. 84-90, 2011.

DEAGLIO, S.; ROBSON, S.C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Advances in Pharmacology*, v. 61, p. 301–332, 2011.

DEAN, B. Evolution of the Human CNS Cholinergic System: Has This Resulted in the Emergence of Psychiatric disease? **Australian and New Zeland Journal of Psychiatry**, v. 43, p. 1016, 2009.

DOMBROWSKI, K.E.; KE, Y.; BREWER, K.; KAPP, J.A. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunology Reviews**, v. 161, p. 111 – 118, 1998.

DORNAS, W.C.; SILVA, M.E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of Bioscience**, v. 36(4), p. 731-737, 2011.

DRURY, A.N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *Journal of Physiology*, v. 68, p. 213-237, 1929.

DUARTE, M.M.F.; LORO, V.L.; ROCHA, J.B.T.; LEAL, D.B.R.; DE BEM, A.F.; DORNELES, A.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS Journal**. v. 274, p. 2707-2714, 2007.

ELTZSCHIG, H.K.; KOHLER, D.; ECKLE, T.; KONG, T.; ROBSON, S.C.; COLGAN, S.P. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. **Blood**, v. 113(1), p. 224–232, 2009.

FAGARD, R.H.; CORNELISSEN V.A. Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, v. 14, p. 12-17, 2007.

FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. **Harisson Medicina Interna**. Editora Mc Graw Hill Interamericana do Brasil. 17 ed. Rio de Janeiro, 2008.

FOUNTAIN S.J.; BURNSTOCK G. An evolutionary history of P2X receptors. **Purinergic Signal**, v. 5(3), p. 269-272, 2009.

FREGLY, M.J. Effect of an exercise regimen on development of hypertension in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 56, p. 381–387, 1984.

FÜRSTENAU, C. R.; RAMOS, D. B.; VUADEN, F. C.; CASALI, E. A.; MONTEIRO, P. S.; TRENTIN, D. S.; GOSSENHEIMER, A. N.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; BARRETO-CHAVES, M. R. M.; SARKIS, J. J. F.; WOFCHUK, S. T. L-NAME-

treatment alters ectonucleotidase activities in kidney membranes of rats. **Life Sciences**, v. 87, p. 325–332, 2010.

FÜRSTENAU, C. R.; TRENTIN, D. S.; GOSENHEIMER, A. N.; RAMOS, D.B.; CASALI, E.A.; BARRETO-CHAVES, M. R. M.; SARKIS, J. J. F. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 41, p. 223–229, 2008.

GARCIA, C.E.; KILCOYNE, C.M.; CARDILLO, C.; CANNON, R.O.; QUYYUMI, A.A.; PANZA, J.A. Effect of copper-zinc superoxide dismutase on endothelium- dependent vasodilation in patients with essential hypertension. **Hypertension**, v. 26, p. 863–868, 1995.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J.; LINDLEY, M.R.; MASTANA, S.S.; NIMMO, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 607-615, 2011.

GOMEZ-CABRERA, M. C.; DOMENECH, E.; VIÑA, J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 44, p. 126–131, 2008.

GORMAN, M.W.; FEIGL, E.O. Control of coronary blood flow during exercise. **Exerc Sport Science Reviews**, v. 40(1), p. 37-42, 2012.

GORMAN, M.W.; ROOKE, A.; SAVAGE, M.V.; JAYASEKARA, M.P.S.; JACOBSON, K.A.; FEIGL, E.O. Adenine nucleotide control of coronary blood flow during exercise **American Journal of Physiology- Heart Circulation Physiology**, v. 299, p. H1981-H1989, 2010.

GUEDES, D.P.; GUEDES, J.E.R.P. **Manual Prático para Avaliação em Educação Física**. v. 6, Ed. Manole, 2005.

HACKAM, D.G.; KHAN, N.A.; HEMMELGARN, B.R.; RABKIN, S.W. Canadian Hypertension Education Program. The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 - therapy. **Canbridge Journal of Cardiology**, v. 26(5), p. 249-58, 2010.

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

HARVEY, R.D. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists: Effects on Cardiovascular Function. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 208, p. 299-316, 2012.

HELLSTEN, Y.; NYBERG, M.; JENSEN, L.G.; MORTENSEN, S.P. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. **Journal of Physiology**, v. 15;590(Pt 24), p. 6297-6305, 2012.

HERZBERG, G.R. Aerobic exercise, lipoproteins, and cardiovascular disease: benefits and possible risks. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, p. 800–807, 2004.

HOT, A.; LAVOCAT, F.; LENIEF, V.; MIOSSEC, P. Simvastatin inhibits the proinflammatory and pro-thrombotic effects of IL-17 and TNF-alpha on endothelial cells. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 72(5), p. 754–760, 2012.

HUMPHREY, R. e BARTELS, M. N. Exercise, cardiovascular disease and chronic heart failure. **Archive of Physiology and Medical Rehabilitation**, v. 82, p. 76–81, 2001.

HUSAIN, K. Exercise conditioning attenuates the hypertensive effects of nitric oxide synthase inhibitor in rat. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 231, p.129–137, 2002.

HYMAN, M.C.; PETROVIC-DJERGOVIC, D.; VISOVATTI, S.H.; LIAO, H.; YANAMADALA, S.; BOUIS, D. Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119(5), p. 1136–1149, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO de GEOGRAFIA e ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores sociodemográficos e de Saúde no Brasil**. Rio de Janeiro, 2009.

IZDEBSKA, E.; CYBULSKA, I.; IZDEBSKI, J.; MAKOWIECKA-CIELA, M.; TRZEBSKI, A. Effects of moderate physical training on blood pressure variability and hemodynamic pattern in mildly hypertensive subjects. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 55, p. 713-724, 2004.

JACKSON, M.J. Exercise and oxygen radical production by muscle. In: **Handbook of oxidants and antioxidants in exercise**. Edited by: SEN, C.K.; PACKER, L.; HANNINEN, O. Amsterdam: Elsevier Science, v. 12, p. 57-68, 2000.

JARDIM, P.C.V.; PEIXOTO, M.R.; MONEGO, E.; MOREIRA, H.; VITORINO, P.V.O.; SOUZA, W.S.B.S. Hipertensão arterial e alguns fatores de risco em uma capital brasileira. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88(4), p. 452-457, 2007.

KAHNER, B.N.; SHANKAR, H.; MURUGAPPAN, S.; PRASAD, G.L.; KUNAPULI, S.P. Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4(11), p. 2317-2326, 2006.

KANTHI, Y.M.; SUTTON, N.R.; PINSKY, D.J. CD39: interface between vascular thrombosis and inflammation. **Current Atherosclerosis Report**, v. 16 (7), p. 425, 2014.

KASHYAP, M.K.; YADAV, V.; SHERAWAT, B.S.; JAIN, S.; KUMARI, S.; KHULLAR, M.; SHARMA, P.C.; NATH, R. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005.

KATSUMI, H.; NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M. Development of nitric oxide donors for the treatment of cardiovascular diseases, *Cardiovasc. Hematol. Agents of Medical Chemistry*, V.5, p. 204–208, 2007.

KAUFFENSTEIN, G., FURSTENAU, C. R., D'ORLEANS-JUSTE, P., SÉVIGNY, J. The ecto-nucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation. *British Journal of Pharmacology*, v. 159(3), p. 576–585, 2010.

KINOSHITA, A.; URATA, H.; TANABE, Y.; IKEDA, M.; TANAKA, H.; SHINDO, M. What types of hypertensives respond better to mld exercise therapy? *Journal of Hypertension*, v. 6, p. 631-633, 1988.

KUKULSKI F., LÉVESQUE S.A., SÉVIGNY J. Impact of ectoenzymes on P2 and P1 receptor signaling. *Pharmacology of Purine and Pyrimidine receptors*, Burlington. Academic Press, v. 61, p. 263-299, 2011.

KULLO, J.J.; ANDRADE, M.; BOERWINKLE, E.; MCCONNELL, J.P.; KARDIA, S.; TURNER, S.T. Pleiotropic genetic effects contribute to the correlation between HDL cholesterol, triglycerides, and LDL particle size in hypertensive sibships. *American Journal of Hypertension*, v. 18, p. 99–103, 2005.

KURU, O.; SENTÜRK, U.K.; GÜLKESEN, H.; DEMIR, N.; GÜNDÜZ, F. Physical training increases renal injury in rats with chronic NOS inhibition. *Renal Failure*, v. 27(4), p. 459-463, 2005.

KURU, O.; SENTÜRK Ü. K.; KOÇER, G.; ÖZDEM, S.; BASKURT, O. K.; ÇETIN, A.; YESILKAYA, A.; GÜNDÜZ, F. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition *Journal of Applied Physiology*, v. 107, p. 896-902, 2009.

KURU, O.; SENTURK, U.K.; DEMIR, N. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *European Journal of Applied Physiology*, v. 87, p. 134–140, 2002.

LERMAN, L.O., CHADE, A.R., SICA, V., NAPOLI, C. Animal models of hypertension: an overview. *Journal of Laboratorial and Clinical Medicine*, v.146, p. 160–173, 2005.

LESLEY, A.; STEVENS, M.D. Measurement of Kidney Function. *The Medical Clinics of North America*, v. 89, p. 457–473, 2005.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R.; CARNETHON, M. Heart disease and stroke statistics – 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, v. 119(3), p. 480–486, 2009.

LUNKES, G.L.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research*, v. 109, p. 189–94, 2003.

MAEDA, S.; TANABE, T.; OTSUK, T.; SUGAWARA, J.; IEMITSU, M.; MIYAUCHI, T.; KUNO, S.; AJISAKA, R.; MATSUDA, M.; Moderate Regular Exercise Increases Basal Production of Nitric Oxide in Elderly Women. **Hypertension Research**, v. 27, p. 947-953, 2004.

MALTA, D.C.; MOURA, L.; SOUZA, F.M.; ROCHA, F.M.; FERNANDES, F.M. Doenças crônicas não transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2007. In: Saúde Brasil 2008. **Ministério da Saúde**, Brasília, p. 337-362, 2009.

MARCUS, K.D.; TIPTON, C.M. Exercise training and its effects with renal hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, p. 1410–1415, 1985.

MAZZALI, M.; HUGHES, J.; KIM, Y.G.; JEFFERSON, J.A.; KANG, D.H.; GORDON, K.L.; LAN, H.Y.; KIVLIGHN, S.; JOHNSON, R.J. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystalindependent mechanism. **Hypertension**, v. 38, p. 1101–1106, 2001.

MOHEIMANI, F.; JACKSON, D.E. P2Y12 receptor: platelet thrombus formation and medical interventions. **International Journal of Hematology**, v. 96(5), p. 572-587, 2012.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

NETO, O.B.; ABATE, D.T.R.S.; JÚNIOR, M.M.; MOTA, G.R.; ORSATTI, F.L. Exercise Training Improves Cardiovascular Autonomic Activity and Attenuates Renal Damage in Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 12, p. 52-59, 2013.

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

O'SULLIVAN, S.E.; BELL, C. The effects of exercise and training on human cardiovascular reflex control. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 81, p. 16-24, 2000.

PACE, B. Benefits of physical activity for the heart. **Journal of American Medicine Association**, v. 285, p. 1536, 2001.

PANZA, J.A.; CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 87, p. 1468-1474, 1993.

PASCHALIS, V.; NIKOLAIDIS, M.G.; GIAKAS, G.; THEODOROU, A.A.; SAKELLARIOU, G.K.; FATOUROS, I.G.; KOUTEDAKIS, Y.; JAMURTAS, A.Z. Beneficial changes in energy expenditure and lipid profile after eccentric exercise in overweight and lean women. **Scandinavian Journal of Medicine and Science Sports**, v. 20, p. 103–111, 2010.

PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J. Controlling inflammation: the cholinergic antiinflammatory pathway. *Biochem Society Transaction*, p. 34(Pt 6), p. 1037–1040, 2006.

PEDERSEN, B.K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scandinavian Journal of Medical Science Sports**, v. 16 (Suppl. 1), p. 5–65, 2006.

PEREIRA, M.; LUNET, N.; AZEVEDO, A.; BARROS, H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. **Journal of Hypertension**, v. 27(5), p. 963-975, 2009.

PIRRO, M., SCHILLACI, G. C-reactive protein in hypertension: clinical significance and predictive value. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease**, v. 16(7), p. 500-508, 2006.

QIAN, J.; FULTON, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Frontiers in Physiology*, v. 13, p. 347, 2013, Dec doi: 10.3389/fphys.2013.00347.

RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension**, v. 20, p. 298–303, 1992.

ROBSON, S.C.; KACZMAREK, E.; SIEGEL, J.B.; CANDINAS, D.; KOZIAK, K.; MILLAN, M. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185(1), p.153–163, 1997.

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

ROGERS, V.L.; GO, A.S.; LLOYD-JONES, D.M.; et al., on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, p. 180 –209, 2011.

ROSENMEIER, J.B.; YEGUTKIN, G.G.; GONZ´ALEZ-ALONSO, J. Activation of ATP/UTP-selective receptors increases blood flow and blunts sympathetic vasoconstriction in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 586, p. 4993–5002, 2008.

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

RYAN, A.S.; GE, S.; BLUMENTHAL, J.B.; SERRA, M.C.; PRIOR, S.J.; GOLDBERG, A.P. Aerobic exercise and weight loss reduce vascular markers of inflammation and improve insulin sensitivity in obese women. *Journal of American Geriatric Society*, v. 62(4), p. 607-614, 2014.

SCHENK, U.; WESTENDORF, A.M.; RADAELLI, E.; CASATI, A.; FERRO, M.; FUMAGALLI, M. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. **Science Signaling**, v. 1(39), p. ra6, 2008.

SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BONAN, C.; WYSE, A. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**. v. 31, p. 77–98, 2007.

SCHIFFRIN, E. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury *Clinical Science* (2014) 126, 267–274 (Printed in Great Britain) doi: 10.1042/CS20130407

SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; MALDONADO, P.A.; CORRÊA, M.; ROSA, C.S.; BECKER, L.; BAGATINI, M.D.; GONÇALVES, J. F.; JAQUES, J.S.; SCHETINGER, M.R.C; MORSCH, V.M. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. **Brain Research Bulletin**, v. 80, p.371–376, 2009.

SCHNABEL, R. RUPPRECHT, H.J.; LACKNER, K.J.; LUBOS, E.; BICKEL, C.; MEYER, J.; MÜNZEL, T.; CAMBIEN, F.; TIRET, L.; BLANKENBERG, S. Analysis of N-terminal-pro-brain natriuretic peptide and C-reactive protein for risk stratification in stable and unstable coronary artery disease: Results from the atherogene study. **European Heart Journal**, v. 26, p. 241-249, 2005.

SHEPHERD, R.E.; KUEHNE, M.L.; KENNO, K.A. Attenuation of blood pressure increases in Dahl salt-sensitive rats by exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 52, p. 1608–1613, 1982.

SINGH, I.; QUINN, H.; MOK, M.; SOUTHGATE, R.J.; TURNER, A.H.; LI, D.; SINCLAIR, A.J.; HAWLEY, J.A. The effect of exercise and training status on platelet activation: do cocoa polyphenols play a role? *Platelets*, v. 17(6), p. 361-367, 2006.

SKRYPNIK, D.; BOGDAŃSKI, P.; MADRY, E.; PUPEK-MUSIALIK, D.; WALKOWIAK, J. Effect of physical exercise on endothelial function, indicators of inflammation and oxidative stress. *Polski Merkuriusz Lekarski*, v. 36(212), p. 117-121, 2014.

SLATTERY, K.M.; DASCOMBE, B.; WALLACE, L.K.; BENTLEY, D.J.; COUTTS, A.J. Effect of N-acetylcysteine on Cycling Performance after Intensified Training. *Medical Science and Sports Exercise*, v. 46(6), p. 1114-1123, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC), Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, p. 1-51, 2010.

SOLTANI, Z.; RASHEED, K.; KAPUSTA, D.R.; REISIN, E. **Potential role of uric acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney injury, and cardiovascular diseases: is it time for reappraisal?** *Current Hypertension Reports*, v. 15(3), p. 175-181, 2013.

SOUZA, V.C.; SCHLEMMER, K.B.; NOAL, C.B.; JAQUES, J.A.; ZIMMERMANN, C.E. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. *Parasitology International*, v. 61(4), p. 690-696, 2012.

SPANEVELLO, R.M.; MAZZANTI, C.M.; SCHMATZ R, THOMÉ G, BAGATINI M

MORSCH, V.M.; BECKER, L.; SCHETINGER, M.R.C. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 411(3-4), p. 210-214, 2010.

SPANEVERELLO, R.M.; MAZZANTI, C.M.; BAGATINI, M.D.; CORREA, M.; SCHMATZ, R.; STEFANELLO, N.; THOMÉ, G.; MORSCH, V.M.; BECKER, L.; SCHETINGER, M.R.C. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257, p. 24–30, 2010.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C. P.; KELLER, C.; MOLLER, K.; PEDERSEN, B. K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 285, p. E433–E437, 2003.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v. 2(2), p. 361–370, 2006.

TIPTON, C.M.; SEBASTIAN, L.A.; OVERTON, J.M. Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, p. 2206–2210, 1991.

TRAPÉ AA, JACOMINI AM, MUNIZ JJ, SERTORIO JT, TANUS-SANTOS JE. The relationship between training status, blood pressure and uric acid in adults and elderly. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 21;13(1), p. 44, 2013.

UKOH, V.A.; OFOROFUO, I.A. Plasma lipid profiles in Nigerians with normal blood pressure, hypertension and other acquired cardiac conditions. **East African Medical Journal**, v. 84, p. 264–270, 2008.

VERAS-SILVA, A.S.; MATTOS, K.C.; GAVA, N.S. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats, **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 2627–2631, 1997.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão – DBH VI 9. Conceituação, epidemiologia e prevenção primária. **Revista Brasileira de Hipertensão** vol.17(1), p.7-10, 2010.

VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. **European Journal of Physiology - Pflugers Arch**, v. 459, p. 1015–1023, 2010.

VISOVATTI, S.H.; HYMAN, M.C. BOUIS, D.; NEUBIG, R.; MCLAUGHLIN, V.V.; PINSKY, D.J. Increased CD39 nucleotidase activity on microparticles from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **PLoS One**, v. 7(7), p. e40829, 2012.

WARBURTON, D. E.; NICOL, C. W.; BREDIN, S. S. Health benefits of physical activity: the evidence. **Canadian Medical Association Journal**. v. 174, p.801–809, 2006.

WILCOX, C.S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, p. 913–935, 2005.

WILLIAMS, B. The year in hypertension. **Journal of American College of Cardiology**, v. 55(1), p. 66-73, 2010.

WOLKMER, P.; SILVA, C.B.; PAIM, F.C.; DUARTE, M.M.; CASTRO, V.; PALMA, H.E.; FRANÇA, R.T.; FELIN, D.V.; SIQUEIRA, L.C.; LOPES, S.T.; SCHETINGER, M.R.; MONTEIRO, S.G.; MAZZANTI, C.M. Pre-treatment with curcumin modulates acetylcholinesterase activity and proinflammatory cytokines in rats infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology International**, v. 62(2), p. 144-149, 2013.

Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1783(5), p. 673–694, 2008.

YEGUTKIN, G.G.; SAMBURSKI, S.S.; MORTENSEN, S.P.; JALKANEN, S.; GONZALEZ-ALONSO, J. Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. **Journal of Physiology**, v. 579.2, p. 553–564, 2007.

ZANINI, D.; SCHMATZ, R.; PIMENTEL, V.C.; GUTIERRES, J. M.; MALDONADO, P. A.; THOMÉ, G.; CARDOSO, A.M., STEFANELLO, N.; OLIVEIRA, L.; CHIESA, J.; LEAL, D. B. R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.66, p. 40-45, 2012.

ZANINI, D.; SCHMATZ, R.; PELINSON, L.P.; PIMENTEL, V.C.; DA COSTA, P.; CARDOSO, A.M.; MARTINS, C.C.; SCHETINGER, C.C.; BALDISSARELI, J.; DO CARMO, M.; OLIVEIRA, L.; CHIESA, J.; MORSCH, V.M.; LEAL, D.B.; SCHETINGER, M.R. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 374(1-2), p. 137-148, 2013.

ZICHA, J.; KUNES, J.; DEVYNCK, M.A. Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension. **American Journal of Hypertension**. v. 12, p. 315–331, 1999.

ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.K.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537-566, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal - UFSM



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ INTERNO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: Efeitos do exercício sobre a atividade das ectonucleotidasas, da acetilcolinesteras e sobre parâmetros de estresse oxidativo em ratos hipertensos.

Numero do Parecer: 029/2011

Pesquisador Responsável: Dra Maria Rosa Chitolina Schetinger

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:

Santa Maria, 11 de abril de 2011.


Marta Lizandra do Rêgo Leal
Coordenador do Comitê Interno de Ética em Experimentação
Animal-UFSM

APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados obtidos durante o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)

O PDSE foi realizado sob a supervisão do Prof. Dr. Jean Sévigny no departamento de Microbiologia, Doenças Infecciosas e Imunologia do curso de Medicina da Université Laval, na cidade de Quebec (Canadá). O doutorado sanduíche teve duração de 1 ano e possibilitou a criação e o desenvolvimento de um projeto de pesquisa que tem por objetivo avaliar as adaptações do sistema purinérgico induzidas pela prática regular de exercício físico moderado.

Até o presente momento, resultados promissores foram obtidos. Entretanto, ainda não existem dados suficientes para obter informações conclusivas a respeito dos mecanismos responsáveis pela inter-relação exercício físico – sistema purinérgico. Sendo assim, o projeto continua em andamento e espera-se que muito em breve subsídios concretos para serem publicados sejam obtidos.

Como resultados parciais deste trabalho, foi apresentado um resumo na Jornada Científica do “Centre Hospitalier Université Laval (CHUL) – CHUQ”, como segue:

The role of P2Y₆ receptor in exercise adaptation

Andréia Machado Cardoso^{1,3}, Lucas Passos Barreto^{2,3}, Alain Tremblay³, Julie Pelletier³,
Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Jean Sévigny³

¹ Department of Chemistry, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria - RS – Brazil

² DBB- Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa- MG- Brazil

³ CRRI, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec.

Introduction

Purinergic signaling is involved in an exercise session and process adaptations into chronic exercise. During a bout of exercise, red blood cells are exposed to a low oxygen tension environment, producing a large ATP release which activates purinergic receptors. In this process there is the involvement of nucleotidases as a way to control blood flow. Chronically, there is an adaptation of purinergic system that probably is related to performance improvement. However, the mechanisms implicated in this relationship are poorly understood [1,2]. The aim of this work was to verify the role of P2Y₆ receptor in exercise-induced purinergic system adaptation.

Material and Methods

Wild Type and *P2ry6*^{-/-} mice were divided in two subgroups (n=6), Swimming and Sedentary. Exercised groups were submitted to swimming training during 4 weeks, 5 days/week, with progressive increase in time and body load up to reach 1h and 3% of body weight.

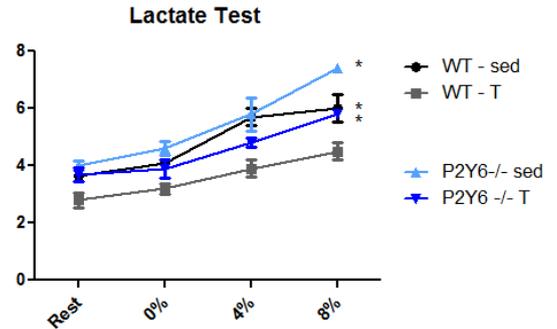
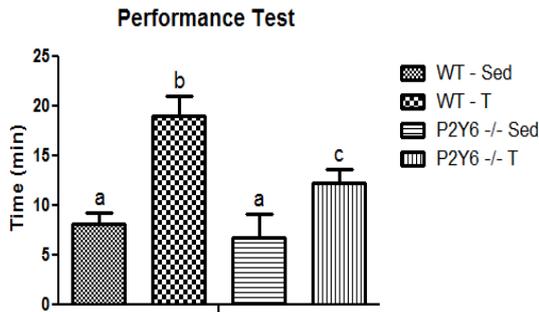
To evaluate exercise capacity we performed two test: 1) measurement of the time taken for a mouse to reach exhaustion during a swimming test with a 10% load of their weight, and 2) lactate production in the blood of the mice that swam for 3 min with a load of 0, 4% and 8% of their body weight.

After *in vivo* tests, heart and gastrocnemius muscle were removed for immunohistochemistry and qPCR analysis. Antibody against CD31 was used to estimate blood vessel's concentration and the expression of eNOS and LDH were verified.

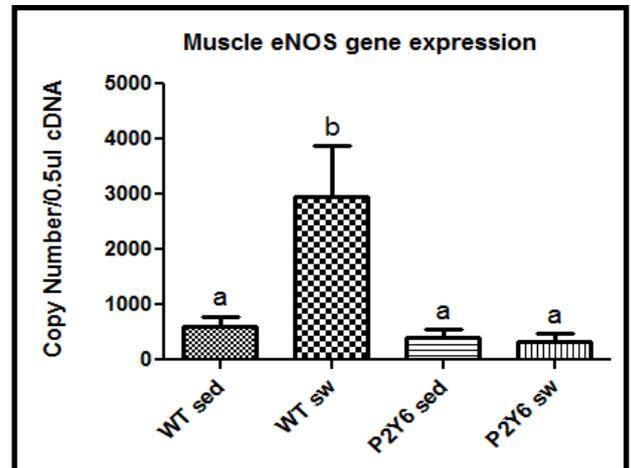
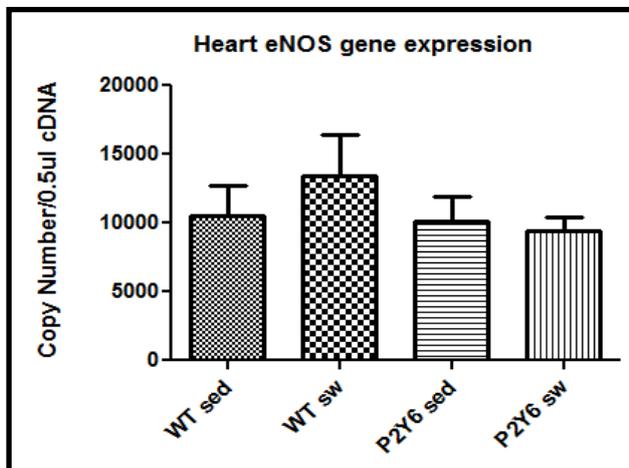
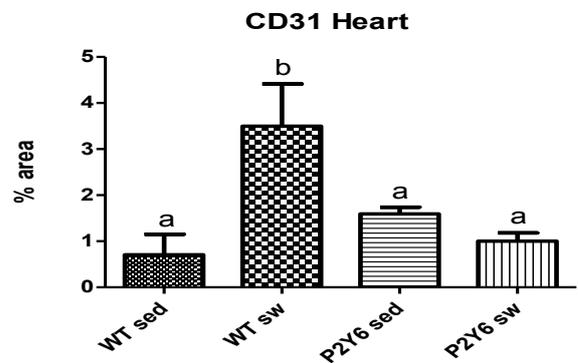
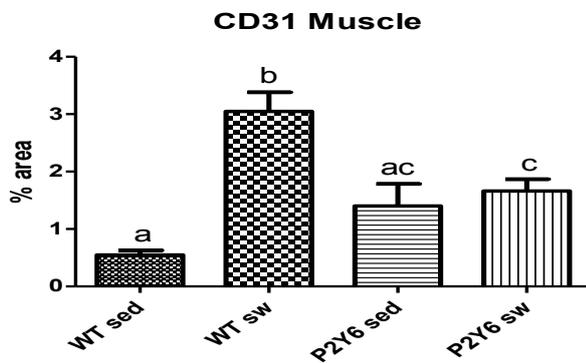


Results

P2ry6^{-/-} swimming mice displayed impaired performance and showed high levels of lactate production when compared to wild type swimming mice.



Less CD31 positive microvessels and low expression of eNOS and LDH were observed in *P2ry6*^{-/-} swimming mice.



Conclusion

These preliminar results suggest that P2Y₆ receptor is involved in adaptations to exercise and performance.

References

- [1] Gorman MW, Feigl EO (2011) Control of coronary blood flow during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 40(1):37–42. doi: 10.1097/JES.0b013e3182348cdd
- [2] Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC et al. (2012) Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 371(1-2):147-56. doi: 10.1007/s11010-012-1431-7