



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

Vanessa Valéria Miron

**EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE COMPONENTES DO
SISTEMA PURINÉRGICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Santa Maria, RS, Brasil

2018

Vanessa Valéria Miron

**EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE
COMPONENTES DO SISTEMA PURINÉRGICO E
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE SEPSE**

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

Orientadora: Prof. Dr^a Andréia Machado Cardoso

Co-orientadora: Prof. Dr^a Maria Rosa Chitolina Shetinger

Santa Maria, RS, Brasil

2018

**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 Dissertação de
Mestrado

**EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE COMPONENTES DO
SISTEMA PURINÉRGICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

elaborada por

Vanessa Valéria Miron

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra Andréia Machado Cardoso
(Presidente/Orientadora - UFFS)

Profa. Dra. Gabriela Gonçalves de Oliveira (UFFS)

Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes (UFSM)

Santa Maria, 28 de setembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não foi realizado sozinho. Aliás, nada do que é descrito aqui foi pensado, planejado e organizado sozinho. Desde seu início até agora, muitas pessoas foram e estão envolvidas, e nada disso seria possível sem elas.

Hoje, em forma de um pequeno e simples agradecimento, vou tentar ser grata a todas estas pessoas. E por mais que não consiga citar todos os nomes e encargos, sempre haverá a lembrança de um trabalho bem feito.

Gostaria de agradecer a minha família e a Deus, que são a grande base da minha vida, muitas vezes até sem saber. São Eles em que me apoio e me conforto toda vez que algo não sai como planejado, e são Eles que me impedem de desistir, me lembrando do grande propósito de tudo isso.

Quero agradecer aos meus amigos. Eles não se envolveram diretamente neste trabalho, mas foram de grande importância para que ele começasse e finalizasse agora. Meus amigos, que são minha família quando não a tenho por perto. Obrigada!

De nada seria sem meus irmãos de laboratório. Eles são fantásticos. Foram eles que me ensinaram desde como segurar uma pipeta até a fazer ciência por amor. Me ensinaram o que posso ou não posso tocar, cheirar e nem chegar muito perto, pois nem tudo são flores em frascos. Esta pesquisa com certeza tem mais deles do que de mim, e, portanto, é a eles que dedico esta vitória. Obrigada!

A Profa Dra Gata Andréia Machado Cardoso não deve esperar nada menos do que tento lhe demonstrar em todo esse tempo. Foi ela quem mostrou o caminho pedra por pedra, foi ela quem deu a luz e ensinou a ligá-la. Ela acreditou mais em mim do que eu mesma, e foi pensando nela que me dediquei tanto a algumas coisas, mesmo sem entender o porquê. Nada teria se iniciado aqui sem essa mulher! Obrigada e Obrigada!

Agradeço as professoras Dra Maria Rosa e Dra Vera, coordenadoras do laboratório Enzitox, por todo o acolhimento e incentivo dado durante este tempo de mestrado. Além de cultivar bons futuros profissionais vocês também cultivam boas pessoas pra vida! Obrigada!

Agradeço também à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica (PPGBTOX) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte institucional e financeiro concedidos.

RESUMO

EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE COMPONENTES DO SISTEMA PURINÉRGICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

Autor: Vanessa Valéria Miron

Orientadora: Profa Dra Andréia Machado Cardoso

A Sepse é uma infecção generalizada que causa alterações nos sistemas purinérgico e imune, nos parâmetros inflamatórios e no status oxidativo dos pacientes. O exercício físico, por meio de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, vem emergindo com uma ferramenta para prevenir as complicações e/ou o agravamento da sepse. Neste estudo, investigou-se se doze semanas de exercício físico seriam capazes de prevenir as alterações causadas pela indução da sepse em ratos, em componentes do sistema purinérgico, no estresse oxidativo e em parâmetros inflamatórios. Para tanto, ratos machos Wistar foram divididos em quatro grupos: controle, exercício (EX), lipopolissacarídeo (LPS) e EX+LPS. Uma escada de um metro de altura foi utilizada para os animais realizarem doze semanas de exercício físico resistido. Após 72 horas da última sessão de exercício, os animais receberam 2,5 mg/kg de LPS para indução de sepse e, 24 horas após, foi realizada punção cardíaca e pulmão, linfócitos e soro foram coletados para a realização das análises. Os resultados mostraram que o exercício foi capaz de prevenir, nos animais sépticos: 1) o aumento da temperatura corporal; 2) o aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de espécies reativas no pulmão; 3) o aumento nos níveis de ATP no soro; 4) as alterações na atividade das enzimas ectonucleotidases em linfócitos, parcialmente; 5) a alteração na densidade das enzimas e receptores purinérgicos no pulmão e, 6) o aumento na expressão gênica de IL-6 e IL-1 β . Espera-se que os resultados possam elucidar o envolvimento da sinalização purinérgica e do estresse oxidativo nos mecanismos pelos quais o exercício pode prevenir as alterações causadas pela sepse. Dessa maneira, incentivar a prática regular de exercício físico de resistência para melhor preparar o organismo contra a sepse e outras doenças relacionadas à inflamação.

Palavras-chave: Sistema imune; linfócitos; pulmão; estresse oxidativo; exercício resistido.

ABSTRACT

EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE ON COMPONENTS OF PURINERGIC SYSTEM AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN SEPSE EXPERIMENTAL MODEL

Author: Vanessa Valéria Miron

Advisor: Profa Dra Andréia Machado Cardoso

Sepsis is a generalized infection that causes changes in the purinergic and immune systems, the inflammatory parameters and the oxidative status of the patients. Physical exercise, through its anti-inflammatory and antioxidant properties, has emerged with a tool to prevent complications and / or worsening of sepsis. In this study, we investigated whether twelve weeks of physical exercise would be able to prevent the changes caused by the induction of sepsis in rats, components of the purinergic system, oxidative stress and inflammatory parameters. For this, male Wistar rats were divided into four groups: control, exercise (EX), lipopolysaccharide (LPS) and EX + LPS. A 1-meter-high ladder was used for the animals to perform twelve weeks of resistance exercise. After 72 hours of the last exercise, the animals received 2.5 mg / kg of LPS for induction of sepsis, and 24 hours later, cardiac puncture and lung, lymphocytes and serum were collected for the analysis. The results showed that exercise was able to prevent, in septic animals: 1) the increase in body temperature; 2) increased lipid peroxidation and reactive species levels in the lung; 3) the increase in serum ATP levels; 4) the changes in the activity of the enzymes ectonucleotidases in lymphocytes, partially; 5) the change in the density of purinergic enzymes and receptors in the lung and, 6) the increase in IL-6 and IL-1 β gene expression. The results are expected to elucidate the involvement of purinergic signaling and oxidative stress in the mechanisms by which exercise can prevent changes caused by sepsis. In this way, encourage regular practice of resistance exercise to better prepare the body against sepsis and other diseases related to inflammation.

Keywords: Immune system; lymphocytes; lung; oxidative stress; resistance exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura do lipopolissacarídeo	18
Figura 2: Aumento da produção de ER e estresse oxidativo.....	20
Figura 3: Danos oxidativos causados por espécies reativas em macromoléculas biológicas.....	21
Figura 4: Componentes do sistema purinérgico.....	23
Figura 5: Estrutura dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	23
Figura 6: Diferenças entre os receptores P2X1-6 e P2X7.....	25
Figura 7: Estrutura das enzimas da família NTPDase (1- 8)	27
Figura 8: Percentual de pessoas que praticam algum esporte ou atividade física no Brasil em 2015.....	28
Figura 9: Efeito do exercício agudo e crônico sobre a NTPDase e a ADA	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – Adenosina Desaminase

ADP – Adenosina Difosfato

AMP – Adenosina Monofosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

E-NPP - Ecto- nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase

E-NTPDase - Ecto- nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

ER – Espécies Reativas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

ILAS – Instituto Latino Americano de Sepse

i.p. – intraperitoneal

LBP – Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo

LPS – Lipopolissacarídeo

SNC – Sistema Nervoso Central

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Certificado de Aprovação do CEUA/UFSM..... 67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. SEPSE.....	17
3.2. ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
3.3 SISTEMA PURINÉRGICO.....	22
3.4. EXERCÍCIO FÍSICO.....	27
4. ARTIGO.....	32
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	62
Referências.....	63

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo, os quais se encontram no item ARTIGO. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

As Referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica desta dissertação.

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista científica para a qual foi submetido e aceito para publicação: *Journal of Cellular Biochemistry*.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Finciamento 001.

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma das doenças mais comuns no mundo e é conhecida popularmente como infecção generalizada por afetar múltiplos órgãos (SALLES et al. 1999; SINGER et al. 2016). Ela é causada pela infiltração de bactérias gram-negativas e/ou gram-positivas no organismo e um dos órgãos mais atingidos é o pulmão (Instituto Latino Americano de Sepse - ILAS, 2015). No Brasil, cerca de 25% dos leitos das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) são ocupados por pacientes sépticos, chegando a quase 65% de mortalidade (ILAS, 2015).

Este conjunto de manifestações gera uma resposta desregulada do sistema imune na tentativa de combater a infecção, podendo atingir também células saudáveis. Uma das características principais da sepse é o aumento do estresse oxidativo, o que pode gerar dano e até a morte celular (PEPPLER et al. 2016).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as defesas do organismo e a produção de radicais livres. A produção excessiva destes radicais livres ocorre quando o organismo sofre algum dano, que pode ser causado por bactérias, vírus, trauma, lesão e também pelo exercício físico. Na sepse, essa produção ocorre de maneira descontrolada e, sendo o organismo incapaz de neutralizar estes radicais, eles podem causar danos em DNA, proteínas e lipídeos, podendo gerar o rompimento da membrana das células (CRUZAT et al. 2007).

Após o rompimento da membrana celular, o conteúdo do interior da célula é extravasado para o ambiente extracelular. Quando isto ocorre, muitas organelas e/ou moléculas são liberadas para o meio extracelular. Uma destas moléculas é a adenosina trifosfato (ATP), ela pode sinalizar o processo inflamatório e iniciar uma cascata de respostas para reverter o quadro. A concentração de ATP no ambiente extracelular é regulada por uma enzima chamada ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPDase) que hidrolisa o ATP até adenosina difosfato (ADP) (CARDOSO et al. 2015).

Esta enzima faz parte do sistema purinérgico. Este sistema é composto por nucleotídeos (ATP, ADP e adenosina monofosfato - AMP) e adenosina, enzimas que regulam estes nucleotídeos, tais como a ecto-NTPDase que hidrolisa ATP a ADP e

ADP a AMP, a ecto-5'nucleotidase que hidrolisa AMP a adenosina e a adenosida desaminase (ADA) que desamina adenosina a inosina. Além destes componentes também fazem parte do sistema purinérgico as famílias dos receptores do tipo P1 e P2 (ZIMMERMANN, 2011; CARDOSO et al. 2015).

Sendo capaz de regular os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, estas enzimas conseguem regular o sistema imune, uma vez que o ATP e a adenosina possuem papéis importantes na sinalização imune. O ATP, por exemplo, atua como uma molécula pró-inflamatória quando se liga aos seus receptores do tipo P2X; e a adenosina, por sua vez, ao se ligar aos receptores do tipo P1 atua como molécula anti-inflamatória (BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014). Além disso, muitas pesquisas já demonstraram que estas enzimas são sensíveis ao lipopolissacárido (LPS- toxina utilizada para induzir a sepse) e que esta regulação é influenciada pela dose e pela exposição do organismo à toxina (VUADEN et al. 2007).

Sendo a sepse um quadro difícil de ser revertido e, uma vez hospitalizado, o paciente gera enormes custos à saúde pública, busca-se alternativas de prevenção a esta síndrome. Por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, o exercício físico vem sendo utilizado cada vez mais para prevenir doenças relacionadas a inflamação, inclusive a sepse (PEPPLER et al. 2017).

O papel anti-inflamatório do exercício está relacionado ao sistema purinérgico, uma vez que ele é capaz de modular a atividade enzimática deste sistema e assim, consequentemente, regular a concentração de nucleotídeos e nucleosídeos extacelulares (CARDOSO et al., 2015). Já o seu efeito antioxidante ocorre através do aumento transitório de espécies reativas durante a fase aguda do exercício resistido. Isso gera um aumento das defesas antioxidantes endógenas na fase crônica do exercício, melhor preparando o organismo para um novo estresse, seja uma nova sessão de exercício ou uma doença relacionada a este aumento (CRUZAT et al. 2007).

Dessa maneira, este estudo buscou investigar se o treinamento com exercício físico seria capaz de prevenir as alterações causadas nos pulmões e linfócitos de animais com sepse induzida através de administração de LPS. Com esta pesquisa, pode-se elucidar através de quais mecanismos a proteção foi eficaz e incluir o exercício como ferramenta preventiva contra a sepse.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito protetor do exercício físico sobre componentes do sistema purinérgico, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo de sepse induzida por meio da administração de LPS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se há aumento de temperatura corporal nos animais com sepse, exercitados e sedentários, em relação ao controle;
- Avaliar se ocorre alteração na atividade das enzimas ectonucleotidases nos linfócitos periféricos e linfócitos pulmonares nos animais sépticos e exercitados em relação aos animais controles;
- Analisar, no pulmão dos animais sépticos e exercitados, os indicadores de estresse oxidativo e as defesas antioxidantes e, a expressão das enzimas nucleotidases e do receptor P2X7.
- Avaliar se ocorre aumento dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e de ATP nos animais sépticos e exercitados em relação ao controle.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SEPSE

Atualmente a sepse é definida como disfunção de órgãos com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, ou seja, é uma condição que surge quando a resposta do organismo a uma infecção prejudica seus próprios tecidos e órgãos. Por vezes esta infecção se localiza em apenas um órgão, mas gera uma resposta em todo o organismo tentando combater este agente infecioso e assim, pode ocorrer o comprometimento de vários órgãos. Os mais atingidos são os pulmões, cérebro, coração e fígado (SALLES et al. 1999; SINGER et al. 2016).

Esta resposta desregulada pode ocasionar morte do paciente por falência de múltiplos órgãos. No Brasil, a sepse ocupa cerca de 25% dos leitos nas UTI sendo a principal causa de morte nestas unidades. Além disso, a sepse é a principal causa de morte hospitalar tardia, superando o infarto do miocárdio e até o câncer. Segundo o ILAS (2015), a sepse pode chegar a mortalidade de 65% no Brasil, sendo que a média mundial está em torno de 30-40%. Em 2003, de acordo com o Instituto, acorreram 398.000 casos e 227.000 mortes por choque séptico no Brasil gerando um custo de R\$ 17,34 bilhões em seu tratamento. Os pacientes que sobrevivem, muitas vezes ficam com sequelas físicas, psicológicas e até mesmo cognitivas por longos períodos de tempo, necessitando ainda de cuidados especiais (ILAS, 2015; SINGER et al. 2016).

A manifestação da sepse ocorre por interação entre o micro-organismo infectante e as respostas imunes, inflamatórias e de coagulação do hospedeiro, pois a sepse é causada pela infiltração de bactérias gram-negativas e gram-positivas no organismo (PEPPLER et al, 2016). Após a entrada no organismo humano, uma das toxinas liberadas pelas bactérias gram-negativas é o LPS (figura 1), o qual é a principal endotoxina e o componente lipídico da membrana externa destas bactérias. Após as moléculas de LPS serem liberadas pela parede bacteriana, sua porção tóxica, o lipídio A, é exposta às células do sistema imunológico gerando a resposta inflamatória (PEPPLER et al, 2016; SALLES et al, 1999) (Figura 1). A inflamação faz parte da resposta imune não específica e

ocorre em resposta a qualquer tipo de lesão corporal (FERRERO-MILIANI et al, 2006).

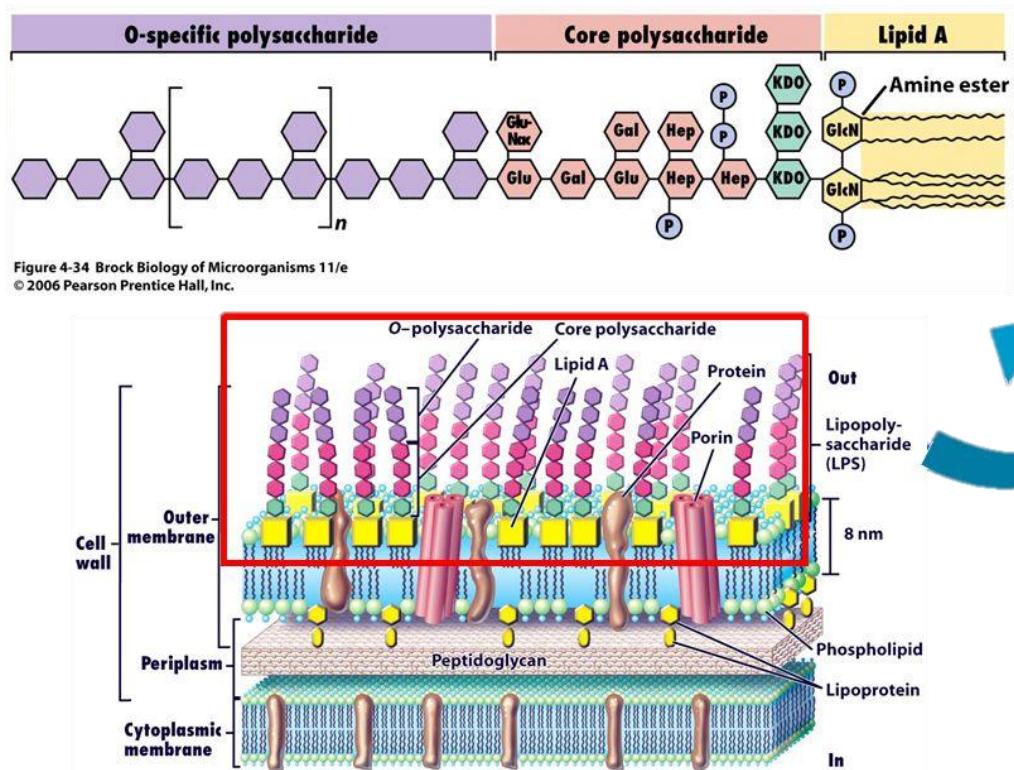


Figura 1: Estrutura do lipopolissacarídeo. (Fonte: adaptado de Brock Biology of Microorganisms).

Os mecanismos pelos quais age a endotoxina no organismo podem ser mais detalhados, segundo Salles et al (1999):

A endotoxina, LPS, liga-se a um número diferente de carreadores moleculares, sendo o mais importante destes a proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP). O complexo LPS-LBP é então capaz de interagir com monócitos através dos receptores de superfície celular como o CD14. A interação com outros alvos do hospedeiro, como as células endoteliais que não expressam CD14 na sua superfície, é mediado por molécula de CD14 solúvel, que então liga-se ao complexo LPS-LBP e interage com outra molécula de superfície celular ainda não conhecida. Toxinas bacterianas com grande capacidade antigênica (superantígenos), como a toxina da síndrome do choque tóxico estafilocócico (TSST-1) e a exotoxina pirogênica estreptocócica A (speA), causam hipotensão e falência orgânica em modelos animais. Essas proteínas ativam linfócitos T e estimulam sua proliferação via interação inespecífica com moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade maior das células apresentadoras de antígeno e via receptores variáveis de células T de cadeia b2.

Esta exposição ao LPS desencadeia uma cascata inflamatória que é ativada tanto em tecido específico, quanto a nível sistêmico. Este processo é caracterizado pelo aumento de marcadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), e pelo aumento da produção de espécies reativas (ER) (PEPPLER et al. 2016; FERRERO-MILIANI et al, 2006).

A IL-1 β é um membro da família da interleucina 1 (IL-1) e é produzida por quase todas as células nucleadas. Esta interleucina está entre os marcadores mais importantes de indução de resposta inflamatória podendo desencadear febre, hipotensão e produção de citocinas, como a IL-6. Esta, por sua vez, além de também induzir febre, induz a síntese de proteínas hepáticas de fase aguda e estimula a síntese de moléculas de adesão em células endoteliais e leucócitos (FERRERO-MILIANI et al, 2006).

Por mais necessárias que sejam estas citocinas para induzir a resposta inflamatória, sua produção excessiva pode causar uma instabilidade hemodinâmica, característica em pacientes com sepse. Além disso, essa produção elevada também está associada à gravidade da resposta inflamatória, que juntamente com a produção aumentada de espécies reativas, pode levar à falência de múltiplos órgãos (LIN et al. 2000; HEITRICH et al. 2016).

O sistema imune é um dos primeiros a serem atingidos pela sepse. No primeiro estágio, onde ocorre a desordem do sistema imune, os linfócitos e outras células do sistema imune são atingidas e a apoptose é induzida. Isto também colabora com disfunção de múltiplos órgãos. No segundo estágio, devido a diminuição no número de linfócitos, ocorre a imunossupressão, que é maior causa de morte na sepse (LIN et al. 2000; HEITRICH et al. 2016).

Um dos órgãos mais atingidos na sepse é o pulmão. A lesão pulmonar ocasionada pela doença é caracterizada por taquipneia, dispneia e pelo comprometimento das trocas gasosas com hipoxemia. Além destes sintomas, o aumento na produção de espécies reativas pode atingir o órgão e o organismo como um todo (ILAS, 2015). Esta produção aumentada causa um desequilíbrio e sobrecarrega os agentes antioxidantes do organismo, levando a um quadro de

estresse oxidativo. Este estresse atinge várias moléculas causando danos e até a morte celular (CRUZAT et al. 2007).

A administração intraperitoneal (i.p.) de LPS fornece um os modelos experimentais para indução da resposta inflamatória característica da sepse. Essa resposta é regulada através da dose e da duração da exposição à toxina (RUSSEL, 2006). Em estudo realizado com ratos, doses muito baixas de LPS de aproximadamente 0,5 mg/kg, causam apenas uma febre moderada, ou não causam febre, não podendo caracterizar a inflamação no hospedeiro. Na dose de 2,5 mg/kg pode causar danos cerebrais associados à uma febre muito alta que, persiste até 24h após a administração do LPS, além de causar maior expressão de alguns marcadores inflamatórios sugerindo que com esta dose há inflamação (SCHNEIDERS et al, 2015).

3.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes do organismo e a produção de ER. Normalmente, estas defesas são capazes de neutralizar as ER que são produzidas devido a erros na respiração celular, principalmente. Porém, quando há uma produção exagerada, o organismo não tem capacidade de neutralização e acaba gerando um quadro de estresse oxidativo (Figura 2) (CRUZAT et al. 2007).

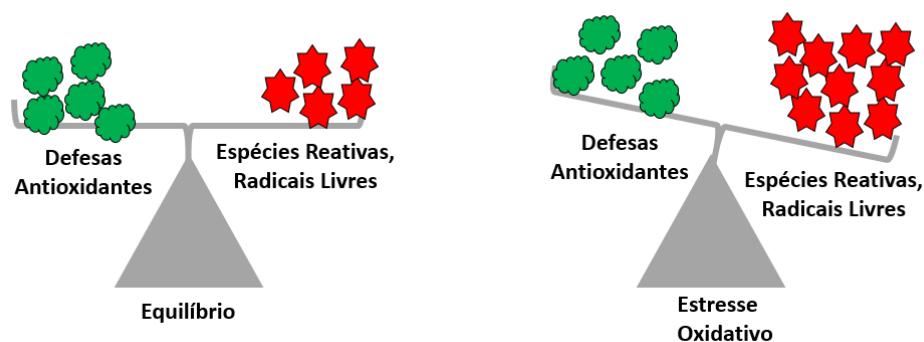


Figura 2: Aumento da produção de ER e estresse oxidativo. (Fonte: elaborado pelo autor)

As ERs como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) estão envolvidas em muitas funções fisiológicas, desempenhando um papel benéfico na defesa contra agentes infecciosos, sinalização e defesa celular quando em concentrações平衡adas no organismo (VALKO et al., 2007). Os sistemas biológicos possuem condições favoráveis para a ocorrência de reações oxidativas, devido à existência de ácidos graxos poliinsaturados de fosfolipídeos na membrana celular. As insaturações destes ácidos graxos são alvos da ação oxidante das ERs, resultando num processo de reações químicas em cadeia, conhecido como peroxidação lipídica (GODWIN, 2006).

Estas ERs apresentam a capacidade de retirar elétrons de outros compostos celulares e assim provocar lesões oxidativas em várias moléculas, tais como lipídeos, proteínas e até mesmo ao DNA (Figura 3). Isto pode provocar perda total da função e apoptose celular (HEITRICH et al. 2016) .

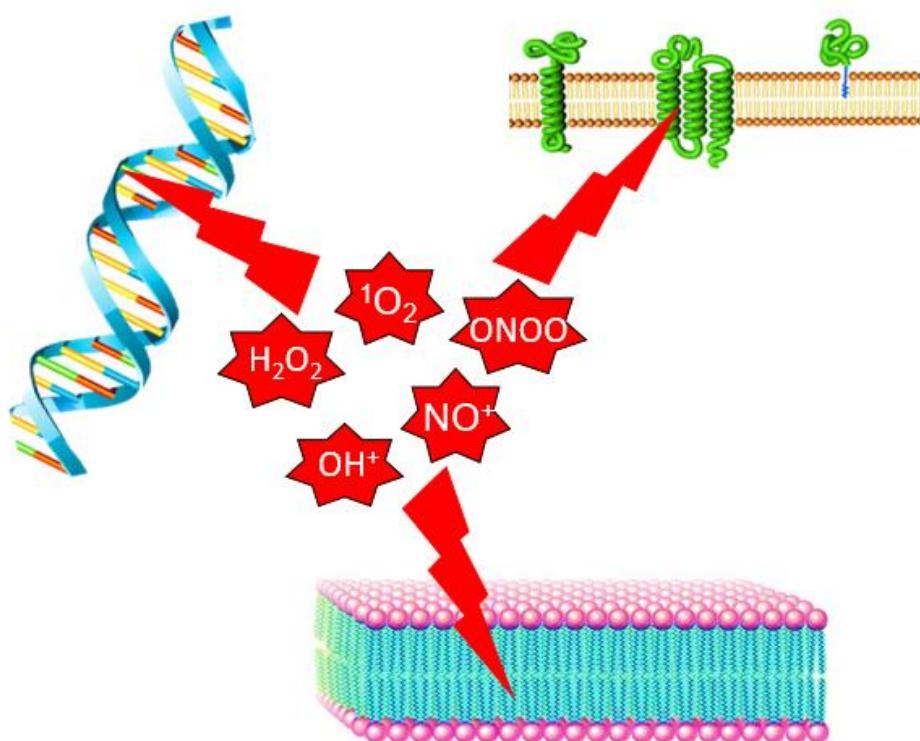


Figura 3: Danos oxidativos causados por espécies reativas em macromoléculas biológicas. (Fonte: Elaborado pelo autor).

A presença de fosfolipídeos nas membranas celulares é muito importante na permeabilidade seletiva de pequenas moléculas e íons entre os meios intra e extracelular. A peroxidação lipídica provoca alterações na estrutura desta camada lipídica, desestabilizando-a e resultando na perda de sua função como uma barreira seletiva, acarretando na perda da fluidez da membrana, colocando em risco a integridade das organelas e da própria célula (HEITRICH et al. 2016).

Sendo a produção de radicais livres um processo contínuo, desenvolveu-se mecanismos de defesa antioxidantes para manter o equilíbrio e controlar os danos ao organismo. Existe uma divisão nestes sistemas que separa as defesas enzimáticas, composto pelas enzimas produzidas no organismo, das não enzimáticas, que englobam as vitaminas e outras substâncias. Estes agentes atuam neutralizando as ER antes que elas causem lesão, tais como as glutationas, superóxido dismutase, catalase, vitamina E, ácido ascórbico entre outros. A glutatona S-transferase gera um grande conjunto de tio ésteres que são capazes de proteger o DNA contra a apoptose induzida uma vez que este conjunto neutraliza a ação dos radicais livres (TAPIERO e TEW, 2003).

Na sepse ocorre uma produção aumentada de espécies reativas, decorrente das lesões celulares que também aumentam. Sabe-se que este aumento e, consequente, o estresse oxidativo podem gerar lesão na membrana mitocondrial, podendo ser um dos principais mecanismos responsáveis pela disfunção de órgãos na sepse (MIRON et al, 2018).

3.3 SISTEMA PURINÉRGICO

Outro sistema afetado pela sepse, e que tem grande influência no sistema imune, é o sistema purinérgico. Este é um sistema de sinalização que está envolvido em mecanismos neurais ou não-neurais incluindo resposta imune, dor, agregação plaquetária, proliferação celular, vasodilatação mediada pelo endotélio e até mesmo a morte celular (BURNSTOCK e KNIGHT, 2004). Este sistema é composto por enzimas denominadas ectonucleotidases, nucleotídeos (ATP, ADP

e AMP) e adenosina, e receptores purinérgicos do tipo P2X, P2Y e P1 (ZIMMERMANN, 2011; CARDOSO et al. 2015) (Figura 4):

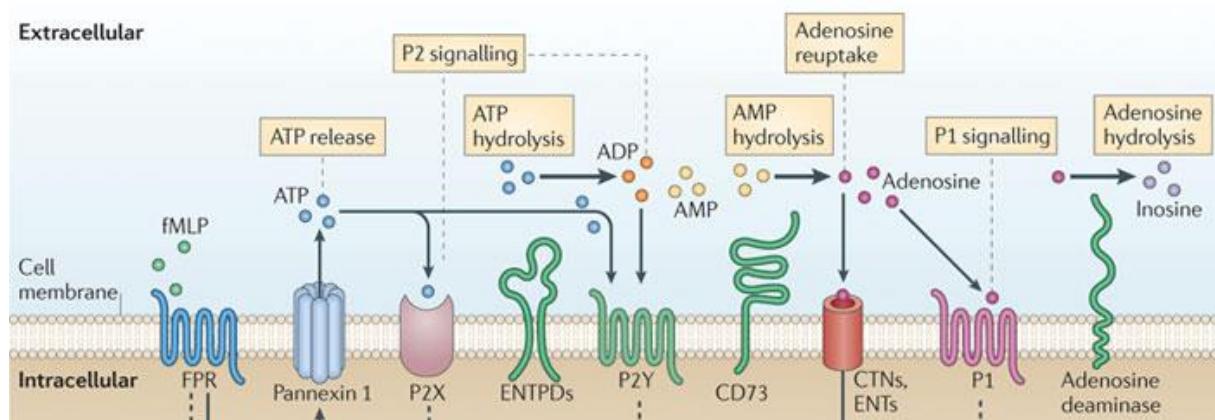


Figura 4: Componentes do sistema purinérgico. (Fonte: adaptado de Junger, 2011).

Estes nucleotídeos e adenosina (Figura 5) são liberados em pequenas quantidades pela célula em condições saudáveis e são capazes de regular uma grande variedade de processos biológicos. Suas concentrações no meio extracelular são influenciadas por inúmeros fatores, tais como, lise e/ou secreção celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática, exocitose das vesículas secretoras, efeito da diluição no espaço extracelular, danos à membrana celular e pela ação das ecto-nucleotidases (ZIMMERMANN, 2011).

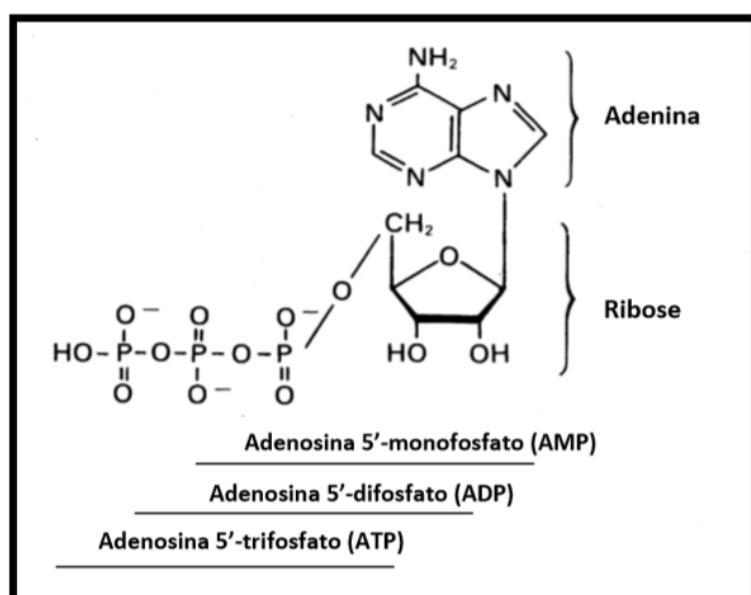


Figura 5: Estrutura dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (Fonte: adaptado de <http://www.benbest.com/cryonics/ischemia.html>).

O ATP é uma molécula com inúmeras funções reguladoras. Pode ser considerada uma molécula energética, quando está dentro da célula, um neuro transmissor quando se trata do sistema nervoso central (SNC), pode estimular a agregação plaquetária e é uma molécula pró-inflamatória quando falamos a nível de sistema imune, estimulando a secreção de mediadores pró-inflamatórios (prostaglandinas, quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias) e o recrutamento excessivo de células imunes, prejudicando a integridade dos tecidos pela resposta exagerada. Esta sinalização ocorre por meio da ligação da molécula com seus receptores presentes em células imunes, principalmente o receptor P2X7 (BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014).

Os receptores do tipo P2X são proteínas de membrana que formam canais para íons na camada lipídica da membrana celular. Estes canais são seletivos a cátions como Ca^{2+} , Na^+ e K^+ . O aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular leva a despolarização da membrana e ativação de várias proteínas quinases, caracterizando assim, a principal via de sinalização ativada por estes receptores (KOLES et al., 2007). O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} faz com que ocorra uma liberação de transmissores das células neuronais e gliais, promovendo a liberação de hormônios além de ativar cascatas de sinalização em muitas células (NORTH, 2002).

Atualmente, já foram caracterizados sete diferentes subtipos de receptores P2X, identificados como $\text{P2X}_{(1-7)}$, de acordo com a ordem em que foram clonados e encontram-se distribuídos nos neurônios centrais e periféricos (RALEVICK & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2004). Esta família de receptores apresenta em comum suas regiões carboxi e amino-terminais localizadas no espaço intracelular, e são formadas por subunidades na forma de duas alfas-hélices transmembrana unidas por uma alça extracelular, onde podem se ligar os agonistas, antagonistas e moduladores (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004).

Os receptores do tipo P2Y são compostos por sete domínios transmembrana e possuem a parte carboxi-terminal localizada intracelularmente e a porção amino-terminal localizada no meio extracelular. Já foram identificados oito subtipos deste receptor em humanos: P2Y_1 , P2Y_2 , P2Y_4 , P2Y_6 , P2Y_{11} , P2Y_{12} ,

P2Y₁₃ e P2Y₁₄. Os números que faltam representam subtipos que não existem em mamíferos (ABBRACHIO et al., 2006).

Dentre todos os receptores do tipo P2, o receptor P2X7, anteriormente conhecido como receptor P2Z, vem atraindo cada vez mais a atenção de pesquisadores, devido ao seu envolvimento na inflamação, apoptose celular e por se diferenciar, em parte, de outros receptores da mesma família (SURPRENANT et al., 1996; Di VIRGÍLIO et al., 1999). Enquanto os receptores P2X são ativados em concentrações nanomolares de ATP, o P2X7 necessita de concentrações mais altas, na faixa de micromolar, para exercer sua ativação. Estudos demonstraram que concentrações ainda maiores de ATP ou uma exposição prolongada, podem induzir a formação de um poro não seletivo na membrana plasmática, levando a morte celular (BURNSTOCK e BOEYNNAEMS, 2014; RALEVIC e BURNSTOCK 1998). Além disso, este receptor possui a extremidade carboxi-terminal mais longa (240 aminoácidos), região que é essencial para a formação de poros citolíticos através da ativação do receptor (Figura 6) (SURPRENANT et al 1996; RASSENDREM et al 1997).

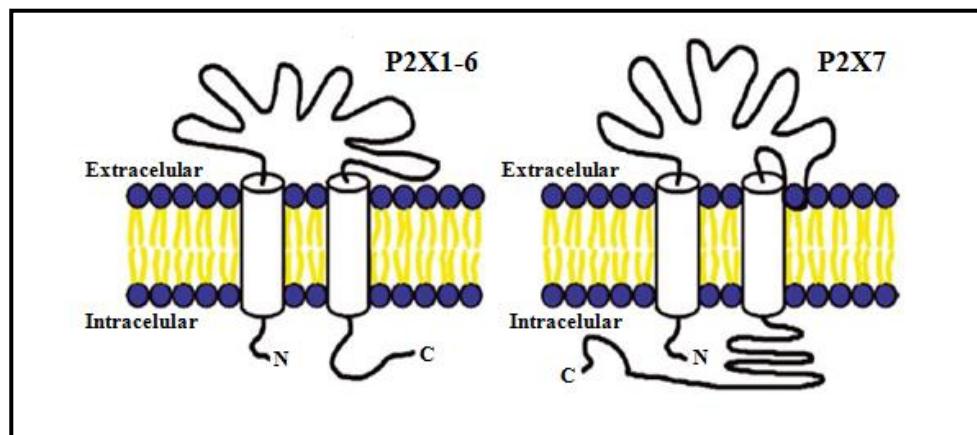


Figura 6 - Diferenças entre os receptores P2X1-6 e P2X7. (Fonte: Adaptado de Di VIRGÍLIO et al., 1999).

A adenosina também possui funções importantes dentro do sistema purinérgico. É um nucleosídeo de purina encontrado em todas as células e está envolvida nas principais vias do metabolismo primário. Atua na homeostase eletrofisiológica celular controlando as atividades dos canais de íons e também é um mensageiro intracelular que sinaliza desequilíbrio metabólico (CUNHA, 2001). Tem função neuromoduladora a nível simpático e efeito neuroprotetor, além de

mediar a vasodilatação no cérebro e o fluxo sanguíneo em células corticais (FORRESTER et al., 1979).

Com relação ao sistema imune, este nucleosídeo possui efeitos contrários ao do ATP, sendo considerada uma molécula anti-inflamatória. Esta característica se dá por ser ela responsável pela inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e, pela maturação e diferenciação de macrófagos e células dendriticas (ANTONIOLI et al. 2013). Além disso, estudos recentes demonstram que este papel anti-inflamatório também se deve ao fato da adenosina diminuir a secreção de quimiocinas e consequentemente diminuir a inflamação e dano tecidual. A adenosina também regula a interação entre os linfócitos e a vasculatura, sendo importante para controlar o tráfego de linfócitos em resposta ao dano ou infecção tecidual (LINDEN e CEKIC, 2012).

Este nucleosídeo atua através de receptores do tipo P1, divididos em quatro subtipos conforme suas estruturas moleculares, distribuição tecidual e afinidade pelo ligante: A1, A2A, A2B e A3, os quais estão todos acoplados a proteínas G. Assim como os receptores metabotrópicos P2Y, os receptores de adenosina apresentam sete segmentos transmembrana, com a porção amino terminal voltada para o meio extracelular e a porção carboxi-terminal voltada para o meio intracelular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

A enzima ecto-NTPDase é responsável pela hidrólise do ATP à ADP e do ADP à AMP, enquanto a enzima eco-NPP hidrolisa ATP diretamente à AMP. Já a enzima ecto-5'nucleotidase hidrolisa AMP até adenosina e a enzima ADA desamina adenosina à inosina. A família da NTPDase é composta por oito membros: NTPDase1, -2, -3 e -8 hidrolisam os nucleotídeos que ativam os receptores do tipo P2. Por outro lado, as NTPDases 4, -5, -6 e -7 não participam do metabolismo dos nucleotídeos extracelulares, pois estão localizadas em organelas intracelulares (Figura 7). Já as NTPDases 5 e 6, podem aparecer tanto na superfície celular, quanto no espaço extracelular, como exoenzimas e, alterando dessa forma na regulação da ativação de receptores dependentes de ADP, UDP e UTP (ZIMMERMANN, 2007).

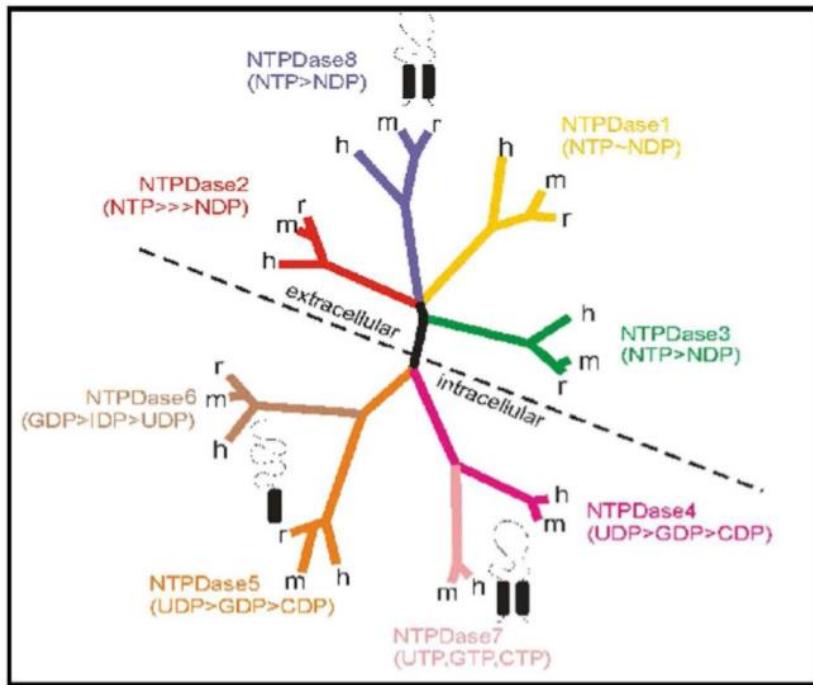


Figura 7: Estrutura das enzimas da família NTPDase (1- 8). (Fonte: Adaptado de ROBSON et al., 2006).

A família das E-NPPs é formada por sete membros (E-NPP 1-7), porém apenas a E-NPP1, 2 e 3 tem capacidade de hidrolisar nucleotídeos. Por hidrolisar o ATP diretamente à AMP, estas enzimas podem cancelar a sinalização através dos receptores P2. A família da 5'-nucleotidase consiste de sete membros, seis citosólicos e uma ecto-enzima, a ecto-5'-nucleotidase. Esta enzima tem a principal função de gerar adenosina extracelular, sendo responsável pela ativação dos receptores P1. Isto pode ser cancelado pela ação da ADA que hidrolisa adenosina à inosina (KUKULSKI et al. 2011).

3.4 EXERCÍCIO FÍSICO

A prática de exercícios físicos vem aumentado a cada ano entre a população mundial. No Brasil, cerca de 28,1 milhões de pessoas praticam alguma atividade física (Figura 8, IBGE, 2015). De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 40% da população brasileira pratica algum esporte ou atividade física. Além disso, o Instituto também revelou que a prática mais comum entre os brasileiros é o futebol, seguido da caminhada

e outros esportes coletivos. Pode-se observar também, pela figura 8, que os homens estão mais envolvidos em práticas esportivas e/ou exercícios físicos (IBGE, 2015).

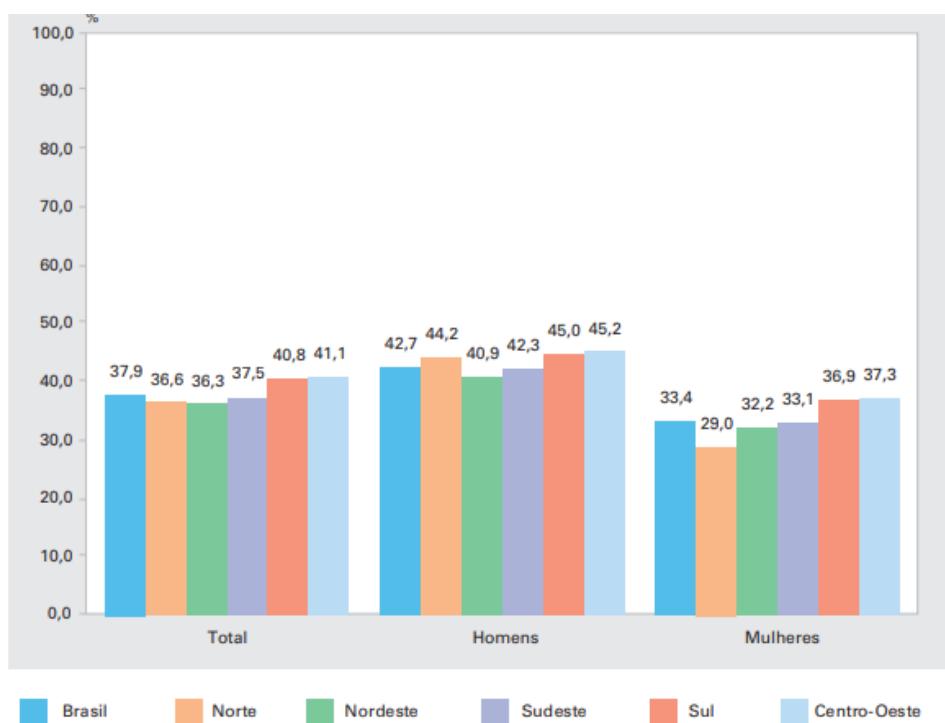


Figura 8: Percentual de pessoas que praticam algum esporte ou atividade física no Brasil em 2015. (Fonte: IBGE)

Com este crescente aumento da prática esportiva, é cada vez mais comum encontrarmos o exercício físico nos alvos de inúmeras pesquisas científicas. Ele é relacionado desde ao bem-estar do praticante, até mesmo como melhora de performance em atletas. Sendo assim, as pesquisas são muito variadas entre faixa etária, onde encontramos pesquisas com crianças, jovens, adultos e idosos, com diferenciação de sexo (homem e mulher), com tipo de atividade física (aeróbica e anaeróbica), diferentes intensidades (leve, moderado, intenso) e até mesmo relacionados a doenças como forma de prevenir, auxiliar no tratamento e acelerar a recuperação (VUADEN et al. 2007; CARDOSO et al. 2015; OLESEN et al. 2015).

Pesquisas com a sepse também já foram realizadas. O exercício físico, devido às suas características anti-inflamatórias e antioxidantes, já foi utilizado em pesquisas antes (PEPPLER et al. 2016; PEPPLER et al. 2017), durante (IRAHARA et al. 2015) e após a doença (VUADEN et al. 2007; IRAHARA et al. 2015), sempre com bons resultados, tanto em humanos (OLENSEN et al. 2015), quanto em modelos animais (VUADEN et al. 2007; IRAHARA et al. 2015).

As suas propriedades anti-inflamatórias estão relacionadas ao funcionamento das enzimas ectonucleotidases e, portanto, a regulação da concentração de nucleotídeos e adenosina no ambiente extracelular (BURNSTOCK E BOEYNAEMS, 2014; CARDOSO et al. 2015). Durante a fase aguda, o exercício diminui a atividade da NTPDase aumentando a concentração de ATP extracelular. Este, por sua vez, vai se ligar ao receptor P2X7 e desencadear um processo pró-inflamatório, aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 β). Por outro lado, o exercício na sua fase aguda, também aumenta a atividade da ADA diminuindo a disponibilidade de adenosina (MIRON et al. 2018). Esta possui efeitos anti-inflamatórios, tais como a inibição da secreção das citocinas pró-inflamatórias e o aumento do recrutamento de linfócitos para as áreas de infecção, portanto sua menor concentração significa que este efeito não estaria ocorrendo (BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014). Por outro lado, durante a fase crônica do exercício estas alterações se mostram ocorrer de forma contrária. Ou seja, a concentração de ATP diminui e a de adenosina deve aumentar, já que a atividade da ADA se mostra diminuída (MIRON et al. 2018) (Figura 9).

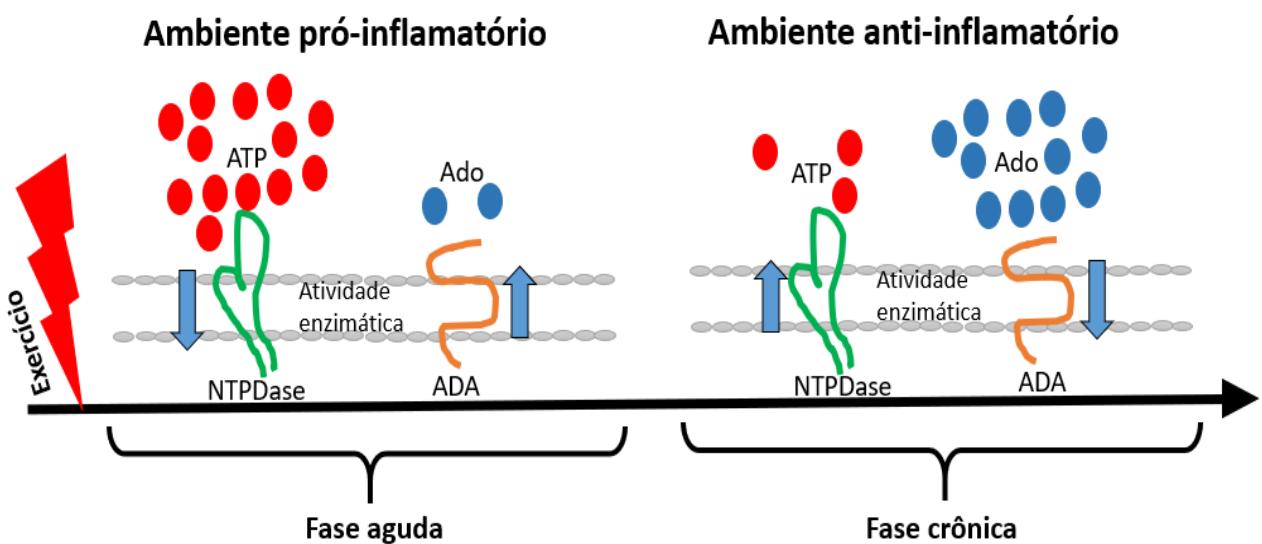


Figura 9: Efeito do exercício agudo e crônico sobre a atividade da NTPDase e da ADA. (Fonte: elaborado pelo autor).

Sendo assim, as alterações transitórias que ocorrem na fase aguda do exercício ajudam o organismo a se preparar para novas sessões deste e assim também para outros estímulos pró-inflamatórios, tais como as doenças inflamatórias. Além disso, o exercício possui também propriedades antioxidantes, que parecem funcionar através deste mecanismo de proteção (GLEESON et al. 2001; CARDOSO et al. 2015).

Além da proteção exercida através do sistema purinérgico, o exercício físico já vem sendo utilizado com o intuito de reduzir o estresse oxidativo através do aumento das defesas antioxidantes endógenas. Sabe-se também, que ambos os tipos de exercício, aeróbico e anaeróbico, tem função importante na manutenção destas defesas (CRUZAT et al. 2007; MIRON et al. 2018).

No exercício aeróbico, por exemplo, o equilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes pode ser alterado dependendo da frequência e da intensidade que é realizado o exercício. Na maioria dos casos, quanto maior a intensidade do exercício, maior é a síntese de ER, e isto gera um quadro de estresse oxidativo passageiro. Este efeito gera uma adaptação benéfica do treinamento, uma vez que o organismo tende a aumentar as duas defesas antioxidantes em resposta a este estresse gerado (CRUZAT et al 2007; GLEESON et al. 2011).

Por outro lado, os exercícios anaeróbicos, principalmente os supra máximos, geram um aumento da síntese de ER através da ativação da cadeia transportadora de elétrons, pelo prolongado processo de isquemia e reperfusão tecidual e também pelo aumento da atividade fagocítica. Além disso, o aumento da síntese de ácido lático, catecolaminas e o elevado processo inflamatório pós-exercícios supra máximos, também contribuem significativamente para o aumento na produção de ER. Estes fatores levam a uma adaptação maior do organismo aumentando os níveis de antioxidantes (GLEESON et al. 2011). Dessa maneira, o estresse oxidativo induz o organismo a aumentar as suas defesas antioxidantes endógenas e se preparar para novos estresses, que podem ser desde uma nova sessão de exercício, até uma doença relacionada a esse aumento (CRUZAT et al 2007).

Devido aos seus inúmeros benefícios no sistema imune, purinérgico e na melhora das defesas oxidantes do organismo, este trabalho buscou investigar a relação do exercício físico resistido e do sistema purinérgico em um organismo suscetível pela sepse. Procura-se com os resultados obtidos, que a prática de exercícios físicos seja cada vez mais associada à saúde e incentivada com esse objetivo.

4.ARTIGO

PHYSICAL EXERCISE PREVENTS ALTERATIONS IN PURINERGIC SYSTEM AND OXIDATIVE STATUS IN LIPOPOLYSACCHARIDE -INDUCED SEPSIS IN RATS

Vanessa Valéria Miron¹; Nathieli Bianchin Bortari¹; Charles Elias Assmann¹; Naiara Stefanello¹; Pauline da Costa¹; Luana Paula Pelinson¹; Karine Paula Reichert¹; Anielen Dutra da Silva¹; Thauan Faccin Lopes¹; Ivana Beatrice Mânica da Cruz²; Jean Sévigny³, Vera Maria Morsch¹; Maria Rosa Chitolina Shetinger¹; Andréia Machado Cardoso³.

¹Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Brazil

²Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Brazil

³Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de Médecine - Université Laval, Québec, QC, Canada. Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, QC, Canada.

⁴Federal University of Fronteira Sul, Academic Coordination, Medicine, Campus Chapecó, Chapecó, SC, Brazil.

Corresponding Author:

Andréia Machado Cardoso

Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó-SC, Brazil, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, Postal Code: 89815-899. Phone number: +55 (49) 2049 2600

Email: deiaa.mc@gmail.com

KEYWORDS: Physical exercise; lymphocytes; lung; ectonucleotidases; immune system; oxidative stress; cytokines.

Figures: 7

Tables: Non

ABSTRACT

Sepsis is a generalized infection that involves alterations in inflammatory parameters, oxidant status and purinergic signaling in many tissues. Physical exercise has emerged as a tool to prevent this disease because of its anti-inflammatory and antioxidant properties. Thus, herein we investigated the effect of physical exercise in preventing alterations in purinergic system components, oxidative stress and inflammatory parameters in lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. Male Wistar rats were divided in four groups: control, exercise (EX), lipopolysaccharide (LPS) and EX+LPS. Resisted physical exercise was performed for 12 weeks on a ladder with 1m height. After 72 hours of the last exercise session, the animals received 2.5mg / kg of lipopolysaccharide for induction of sepsis and after 24 hours, lung and blood were collected for analysis. The results showed that the exercise protocol used was able to prevent, in septic animals: 1) the increase in body temperature; 2) the increase of lipid peroxidation and reactive species levels in the lung, 3) the increase in ATP levels in serum; 4) the change in the activity of the enzymes ectonucleotidases in lymphocytes, partially; 5) the change in the density of purinergic enzymes and receptors in the lung and, 6) the increase of IL-6 and IL-1 β gene expression. Our results revealed the involvement of purinergic signaling and oxidative damage in the mechanisms by which exercise prevents sepsis aggravations. Therefore, the regular practice of physical exercise is encouraged as a way to better prepare the body against sepsis complications.

Highlights:

- Physical exercise was able to prevent alterations in ectonucleotidases activities and expression in lung and lymphocytes of septic rats.
- Physical exercise prevented the oxidative damage in lung of LPS-induced sepsis in rats.
- 12 weeks of physical exercise modulates pro-inflammatory cytokines expression in rat model of sepsis.

1. INTRODUCTION

Sepsis is one of the major causes of Intensive Care Unit deaths in hospitals around the world. It is characterized by a generalized infection that occurs due to the dysregulated response of the immune system to the inflammation caused by infiltration of gram-negative and gram-positive bacteria. The lung is often the starting point of the infection and because of this it is also the organ most affected by the disease (Shaaban et al. 2018). Once infected by the toxic portion of these bacteria, lipopolysaccharide (LPS), lung tissue initiates an inflammatory response that is characterized by increased oxidative stress and the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 and IL-6 (Russel, 2006; Singer et al. 2016; ILAS, 2016).

Oxidative stress is manifested when the production of reactive species (RS) is greater than the production of antioxidants by the body, and an imbalance occurs. These RS can cause damage to DNA, lipids, and proteins, which can cause cell death and consequent extravasation of intracellular components into the medium (Heitrich et al. 2016; Peppler et al. 2016b). These components, in extracellular environment, will act as damage-associated molecular pattern (DAMPs) and signal this damage to the other cells in order to initiate the body's defenses. ATP is one of the main DAMPs associated to cell damage and its levels can be regulated by a family of enzymes that are anchored in the membrane, the ecto-NTPDases (Junger, 2011; Cekic and Linden, 2016).

These enzymes are part of the purinergic system which is currently recognized as having an important role in modulate the imuune system (Burnstock and Boeynaems, 2014). Besides the enzymes, this system also consists of nucleotides (ATP, ADP and AMP), adenosine and purinergic receptors (P2X1-7, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 and P2Y14, P1). The enzyme ecto-NTPDase is responsible for the hydrolysis of ATP to ADP and ADP to AMP, ecto-5'nucleotidase hydrolyzes AMP into adenosine and the enzyme adenosine

deaminase (ADA) deaminates adenosine into inosine (Cardoso et al. 2015a; Martins et al. 2016). One of the main receptors sensitive to ATP is P2X7, a member of the P2X superfamily. In high concentrations, the ATP can bind to its receptor (P2X7) and signal pro-inflammatory effects on cells such as secretion of IL-6 and IL-1 (Rech et al. 2016).

With increasing levels of IL-6 and IL-1 in the body, defense cells are recruited (T and B lymphocytes) and initiate the inflammatory response. Due to the great damage signaled, these cells can generate a disorder in the organism and end up compromising healthy cells. This unwanted effect of defense cells can cause widespread infection and affect multiple organs (Singer et al. 2016).

Before that disease triggers these changes, it is important to find new strategies that enhance the body's defenses. Because of its anti-inflammatory and antioxidant characteristics, physical exercise has already been shown to be effective in numerous inflammation-related diseases (Gleeson et al. 2011; Cardoso et al. 2015a; Martins et al. 2016) and has recently been studied in the prevention of sepsis (Peppler et al. 2016a; Peppler et al. 2016b; Tyml et al. 2017). However, the mechanisms by which it becomes preventive have not yet been fully elucidated in view of the numerous changes that the disease may cause.

One of the possible mechanisms is associated to the reduction of oxidative stress that occurs in the chronic phase of exercise (Cruzat et al. 2007; Gleeson et al. 2011). This mechanism occurs because, during the acute phase, anaerobic exercise promotes increased RS synthesis through the activation of the electron transport chain, the increased synthesis of the xanthine oxidase and NADPH oxidase enzymes (Cruzat et al. 2007). In short, this increase generates an adaptive response of the organism to the training, and this will need to produce more antioxidants to increase resistance to new stresses (Radák et al. 1999; Cruzat et al. 2007).

Another mechanism that may be involved in the prevention of sepsis through exercise is the regulation of the enzymes ectonucleotidases (Cardoso et al. 2015a; Ferrari et al. 2016). These enzymes are involved with the immune system by regulating the concentration of nucleotides and nucleosides in the extracellular environment because ATP and adenosine are molecules that have the signaling function for the immune system (Burnstock and Boeynaems, 2014; Cekic and Linden, 2016). For example, ATP at high concentrations binds to its receptor and triggers "danger signals" (Burnstock and Boeynaems, 2014). Adenosine, in turn, promotes anti-inflammatory effects by limiting the extent and duration of inflammation, as well as activating Treg cells. In the lung, the adenosine suppresses lung inflammation and reduce pulmonary edema and tissue damage (Cekic and Linden, 2016).

Knowing the importance of sepsis prevention and considering the anti-inflammatory and antioxidant characteristics of physical exercise, this work sought to investigate whether the purinergic system and the oxidant system would be involved in the protection mechanisms of exercise against sepsis. Thus, herein we analyzed the effect of 12 weeks of resistance exercise in the activities and expression of purinergic signaling components as well as in the parameters of oxidative stress of septic animals.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Adult male Wistar rats (30 – 60 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 ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) 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: 5975191216). All efforts were made to minimize the number of animals used in this study and their suffering.

2.2 Experimental protocol

Rats were randomly divided into four groups: control, exercise, LPS, and exercise+LPS. The exercise groups were submitted to weathered exercise in the ladder (Scheffer et al. 2012) and in the LPS groups, sepsis was induced by intraperitoneal injection (i.p.) of lipopolysaccharide (2,5 mg/kg) (Schneiders et al. 2015) 48 hours after last session of exercise. The animals that don't practiced exercise, were manipulated in the same time of others and the group control was received i.p. of saline, both to go through the same stress of others. These animals were euthanized 24h after the las exercise session (Bursch and Picher, 2016; Vuaden et al. 2007), the blood was collected by cardiac puncture and lung removed for further analysis.

2.3 Exercise protocol

For this study was utilized a climbing protocol in according whit Scheffer et al. (2012). It was realized for 12 weeks in Mondays, Wednesday and Fridays in the same time. The animals were weighed weekly for control and adjustment of exercise load.

2.4 Sepsis induced protocol

After 48 hours of last session of exercise the animals received 2,5mg/kg of lipopolysaccharide for sepsis induced. The temperature was verified during 24h and after this time the animals were euthanized, the blood was collected for separation of lymphocytes and the lung was removed for further analysis.

2.5 Isolation of mononuclear cells

Mononuclear leukocytes were isolated from blood collected with ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) and separated on Ficoll-Histopaque density gradients in according with Boyum (1968).

2.6 Isolation of mononuclear cells of lung

Mononuclear leukocytes were isolated of lung of animals in according with Jaques et al. (2010).

The lungs of every two animals were necessary for get 4g of samples for the technique.

2.7 Protein determination

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

2.8 Determination of lipid peroxidation

Lung lipid peroxidation was determined according to Ohkawa, Ohishi and Yagi (1979). The amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) will be expressed as η mol of MDA /g of lung tissue.

2.9 GST assay

The activity of GSTwas measured in the tissue lung using a procedure described by Habig, Pabs and Jakoby (1974), which involved 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) as a substrate. The assay mixture contained 1 mM CDNB (in ethanol), 10 mM GSH, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) and 20 μ L of the serum. The enzyme activity was calculated from the changes in absorbance at 340 nm using a molar extinction coefficient of 9.6 mM/cm. The activity was expressed as μ mol GS-DNB min/mg protein.

2.10 Determination of total thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) in lung tissue

T-SH groups were assayed in lung tissue by the method of Boyne and Ellman (1972) with some modifications. This method consists of the reduction of 5,50 -dithio-(bis-nithrobenzoic) acid (DTNB) in pH 7.0, measured at 412 nm. Results were expressed in mmol TSH/mL of lung tissue. NPSH were assayed in lung by the method of Ellman et al. (1961) with some modifications. Aliquots (100 mL) of lung tissue were added to a phosphate buffer 1 mol/L (750 mL), pH 7.4, and the reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5,50 - dithio-bis-

(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (50 mL). Results were expressed as mmol NPSH/mL of lung tissue.

2.11 Quantification of reactive species (RE)

The formation of reactive lung species was estimated according to Ali, Lebel & Bondy (1992). An aliquot of 50 μ L of homogenate will be incubated with 10 μ L of 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA, 7 μ M). RE levels will be determined by fluorescence method. The oxidation of DCFH-DA to dichlorofluorescein (DCF) will be measured for intracellular RE detection. The intensity of DCF fluorescence emission will be recorded at 488 nm of excitation 60 min after addition of DCFH-DA in the medium and the oxidized dichlorofluorescein will be determined using a standard curve and the results will be expressed as U DCF / mL serum or U DCF / mg protein.

2.12 Determination of protein oxidation

The oxidation of proteins into lungs will be determined by the method of Levine et al (1990). The color intensity of the supernatant will be measured at 370 nm and expressed as η mol / mg protein.

2.13 Quantitative ATP determination

The quantitative ATP determination in serum was developed using commercial kit by bioluminescence assay with recombinant firefly luciferase and its substrate D- luciferin in serum. The assay is based on luciferase's requirement for ATP in producing light - emission maximum ~560 nm at pH 7.8 (Karamohamed and Guidotti, 2001). This assay is extremely sensitive. We combined the components of the reaction as follows to make a standard reaction solution and adjust the volumes according to particular requirements. Each reaction contained

1.25 µg/mL of firefly luciferase, 50 µM D-luciferin and 1mM DTT in 1X Reaction Buffer.

After a 15minutes incubation, luminescence was measured.

2.14 Ecto-NTPDase activity determination

After lymphocyte isolation, ecto-NTPDase activity was determined as described by Leal et al.

(2015) wherein the reaction medium contained 0.5 mmol/l CaCl₂, 120 mmol/l NaCl, 5mmol/l

KCl, 6mmol/l glucose and 50mmol/l Tris– HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200 ml.

Twenty microlitres of the intact mononuclear cells suspended in physiological saline solution

were added to the reaction medium (2–4mg of protein) and preincubated for 10min at 37°C and

incubation proceeded for 70min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP

or ADP) at a final concentration of 2.0 mmol/l and stopped with 200ml of 10% trichloroacetic

acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan, Delfert

and Junger (1986) using malachite green as the colourimetric reagent and KH₂PO₄ as the

standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to

correct for nonenzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the

specific activity is reported as nmol Pi released per min/mg of protein.

2.15 Adenosine deaminase activity determination

ADA activity from blood and lung lymphocytes was determined according to Giusti and Galanti

(1984) and Jaques et al (2010) on the basis of the Bertholet reaction, that is the formation of a

coloured indophenol complex from ammonia released from adenosine and quantified

spectrophotometrically. Briefly, 25µl of lymphocytes reacted with 25µl of 21 mmol/l of

adenosine pH 6.5 and was incubated at 37°C for 60min. 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 and 0.2 mg/ml. Results were expressed in

U/l. One unit (1U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

2.16 Western blot

The protein was diluted with two volumes of SDS-PAGE buffer containing 8 M urea, 100 mM dithiothreitol, 2% (w / v) sodium dodecylsulfate and 375 mM Tris-HCl pH 6.8 and incubated for 2 hours at 37°C. These diluted samples were stained with a molecular weight marker (Amersham) and separated by SDS-PAGE (10% with a concentration of 4% gel), then electroporated to a nitrocellulose membrane. After blocking for 2 hours at room temperature with 5% milk in Tris-saline buffer, pH 7.6 containing 0.1% Tween 20 (TBS-T), the membranes were incubated overnight in 4 (dilution 1: 1500), NTPDase 1 (Dilution 1: 5000), NTPDase 2 (1: 5000 dilution), and 5'-nucleotidase (1: 5000 dilution). Soon after, the membranes were washed for 10 min with TBS-T containing 0.5% milk and the membranes were incubated with anti-rabbit, anti-mouse and anti-mouse peroxidase conjugated secondary antibody (HRD) (1: 20000 dilutions, Calbiochem) in TBS-T containing 1% milk for 120 minutes at room temperature. After 5 washings of 10 minutes in TBS-T with 0.5% milk, the membranes were incubated with chemofluorescent solution for 5 minutes and analyzed with a ChemiDoc 3000 (Biorad) image developer. The membranes were subjected to a test review to evaluate the immunoreactivity for β -actin or α -tubulin and confirm the similar protein content applied to the gel (Schmued, Stowers and Scallet, 2005; Duarte et al. 2005).

2.17 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

In this study, gene expression of *Il-1 β* and *Il-6* cytokines genes was performed using qRT-PCR analysis as previously described (Assmann et al. 2018). In brief, RNA was isolated using TRIzol® reagent (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) and quantified at 260 nm. Reverse transcription was performed with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, USA) and RNA was added to a final concentration of 1 µg/µL. The following steps were used for cDNA synthesis: 37°C for 5 min, heating at 65°C for 10 min and cooling for 10 min at 5°C. Additionally, 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, 85°C for 5 min and a final incubation at 5°C for 60 min were used. The run was performed in a volume of 20 µL using 1x QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and 1 µL of cDNA. The reaction was performed in a Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) equipment under the following conditions: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 seconds, 60°C for 30 seconds followed by a melting curve of 65°C to 95°C. As internal control to normalize gene expression we used the β-actin (*Actb*) gene. Gene *Actb* Forward Sequence (5'-3'): {TGTGACGTTGACATCCGTAAAG}; Reverse Sequence (3'-5'): {GGCAGTAATCTCCTTCTGCATC}. Gene *Il-1β* Forward Sequence (5'-3'): {TGACCCATGTGAGCTGAAAG}; Reverse Sequence (3'-5'): {CGTTGCTTGTCTCTCCTTGT}. Gene *Il-6* Forward Sequence (5'-3'): {GAAGTTAGAGTCACAGAAGGAG}; Reverse Sequence (3'-5'): {GTTTGCCGAGTAG ACCTCATAG}.

3. RESULTS

In Figure 1 are shown the temperatures of animals of Control, LPS, and exercise+LPS groups in 1, 3, 6, 12 and 24 hours after sepsis induced with LPS. 12h after the LPS injection, the rats temperature of LPS and exercise+LPS groups increased when compared to control group (F= 2,70; P<0,0001). In the last time (24 hour) the temperature of septic exercised animals was lower when compared to septic sedentary animals (F= 5,70; P<0,0001).

Figure 2 shows the results of lung oxidative stress parameters in animals of control, exercise, LPS and exercise+LPS groups. The results of TBARS levels in lung are show in the Figure 2A. In the animals of LPS group, TBARS levels are increased when compared to control animals and the exercise was able to prevent this increase in the exercise+LPS group (F=7,659;

$P=0,0115$). Figure 2B shows the results of protein oxidation in lung and this parameter did not change between groups. Results from GST activity in lung are shown in Figure 2C. As can be observed, the enzymatic activity augmented in LPS group and in exercised animals when compared to control animals. (Exercise: $F=33,29$; $P<0,0001$; LPS: $F=8,041$; $P=0,0110$). The Figure 2D shows the results of T-SH levels in lung and shows that exercise animals increased this levels when compared to control ($F=15,14$; $P=0,0012$). The NPSH levels in lung are shown in Figure 2E and as can be observed the exercised animals increased this levels when compared to control ($F= 15,81$; $P= 0,0011$). The Figure 2F shows the results of levels ROS and shows that exercise was able to prevents the increase caused by LPS ($F=1,19$; $P=0,0201$).

The levels ATP in serum are presented in Figure 3. As can be observed in animals of group LPS, the LPS administration increased the ATP levels when compared to the control group ($F=144,4$; $P < 0,0001$), and the exercise (exercise+LPS group) was able to prevent this increase when compared to the LPS group ($F= 24,87$; $P < 0,0001$).

The activity of NTPDase and ADA in blood lymphocytes are shown in Figure 4. When used the ATP as substrate (Fig. 4A), the LPS decrease the NTPDase activity in sedentary animals when compared to the control and the exercise *per se* decrease this activity also (Interaction: $F=14,43$; $P = 0,0014$). In Figure 4B the ADP was used as substrate for NTPDase, this graphic shows that LPS increased the activity of enzyme in exercise animals when compared to the control exercise. The Figure 4C shows the activity ADA and the adenosine hydrolysis was increased in animals of LPS group and exercise was able to partially prevent this increase ($F=9,395$; $P = 0,0064$).

The Figure 5 shows the results of NTPDase and ADA activity in lung lymphocytes. The results don't show significant differences.

The analyze of Western Blot (Fig. 6) shows that physical exercise was able to prevent the decreased of NTPDase 1 and NTPDase 2 density, caused by LPS, when compared to animals of sedentary groups. Due this decreased, in density of NTPDase 1 and NTPDase 2, the P2X7 density is increased in animals of sedentary groups, and in animals of exercise+LPS groups, the exercise prevented this increased.

In Figure 7 are shown the gene expression profile of IL-6 and IL-1 β by lymphocytes control, exercise, LPS and exercise+LPS groups. In the study, the LPS increased the gene expression profile of IL-6 and IL-1 β in animals of LPS group (A and B, respectively) and the physical exercise was able to prevents this increased in animals of exercise and exercise+LPS group ($F=1,8$; $P<0,0001$).

4. DISCUSSION

Increasingly, physical exercise has been used as a preventive tool for diseases related to inflammation (Vuaden et al. 2007; Cardoso et al. 2015a; Olesen et al. 2015). One of the mechanisms involved in this process is linked to the increase of the antioxidant capacity and increase the immune response of the organism. In relation to sepsis, the exercise was already effective before (Peppler et al. 2016a; Peppler et al 2016b) during (Irahara et al. 2015) and after the disease (Borges et al. 2015) both in experimental model (Vuaden et al. 2007; Irahara et al. 2015) and in humans (Olesen et al. 2015; Borges et al. 2015).

In this study, we verified that sepsis, induced by LPS, caused cellular damage in lung tissue through oxidative stress and altered the immune system through the purinergic system and the expression of interleukins. The regular practice of resistive physical exercise was efficient in preventing these changes due to its characteristic chronic effects: antioxidant and anti-inflammatory (Radák et al. 1999; Cruzat et al. 2007; Gleeson et al. 2011). Many results found

in this study are precursors in the research and relate physical exercise, purinergic system and immune system, clarifying some mechanisms involved in this interaction.

The analysis of oxidative stress parameters in lung tissue showed a significant increase of lipid peroxidation and reactive species in the LPS group. These findings confirm the damage caused by the induction of sepsis and indicates that sepsis caused injury to the plasma membrane of the lung cells (Shaaban et al. 2018). This damage suggests that many molecules, such as nucleotides and nucleosides, would be being released into the circulation. These molecules can act as DAMPs by determining the signaling of septic inflammatory and aseptic responses in the body (Krysko et al. 2012).

One of the DAMPs associated with the pro-inflammatory response is ATP (Junger, 2011; Cekic and Linden, 2016). In this study, high concentrations of this nucleotide were found in the serum of animals with sepsis confirming the cell damage caused. This ATP can be rapidly hydrolyzed by the enzyme NTPDase or it can bind to its main receptor, P2X7, and trigger a signaling cascade that differs in each tissue (Zimmerman, 2011; Cardoso et al. 2015a). Thus, we analyzed the density of NTPDase in lung tissue and we observed a decrease in this enzyme, which may indicate that this ATP would then be binding to its receptor and activating it. The P2X7 receptor was already shown in the lung (Lemaire and Leduc, 2003), pulmonary macrophages (Lemaire and Leduc, 2003) and alveolar epithelial cells (Mishra et al. 2011), and in this study, the density of the P2X7 receptor in lung tissue was found to be high, confirming the hypothesis that ATP would bind to this receptor.

When binding to P2X7, ATP acts releasing pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 (Ferrari et al. 2016). These cytokines, in turn, may act on different tissues stimulating or inhibiting reactions associated with inflammation. When they bind to their specific receptors on hypothalamus, these cytokines can cause increase in body temperature (Blomquist and

Engbom, 2018). In this study, the cytokines IL-1 β and IL-6 increased in lymphocytes of septic animals and the temperature of these animals was verified at certain times after the injection of LPS and the peak of fever occurred around 12 ° hour post LPS induction. These results confirm that inflammation occurred in these animals.

Pro-inflammatory cytokines have also been found at high levels in the lungs cells when tissue injury is caused by LPS (Shaaban et al. 2018) and this may increase the recruitment of defense cells to the sites of infection, including lymphocyte differentiation and induction of apoptosis (Junger, 2011). Since this apoptosis is responsible for the release of ATP in the circulation and, since this ATP can be hydrolyzed to adenosine and that the balance of these molecules can induce a pro or anti-inflammatory state, we evaluate the activity of the enzymes responsible for nucleotide and adenosine hydrolysis in the blood lymphocytes of animals. The NTPDase (hydrolysis of ATP) activity decreased in animals with sepsis. This, combined with the high levels of circulating ATP, suggests that more ATP molecules are available to play their pro-inflammatory role. The activity of this enzyme has already been altered by LPS in the work of Vuaden et al (2011), which used different concentrations of the toxin *in vitro* in mesenteric lymph nodes of rats, demonstrating that the enzyme is sensitive to the toxin (Vuaden et al. 2007).

In the same line of reasoning, we evaluated adenosine hydrolysis. Our findings showed that the ADA activity increased in the animals of the LPS group. This suggests that fewer Ado molecules would be available to play anti-inflammatory role in the immune system, contributing to the pro-inflammatory environment (Burnstock and Boeynaems, 2014). In addition, as mentioned earlier, the gene expression of pro-inflammatory interleukins (IL-1 β and IL-6) was increased in septic animals confirming the inflammatory process in lymphocytes.

Trying to fight against the infection, the immune system ends up repairing and neutralizing healthy tissues and the organism can become multi-organ failure in a short time (Singer et al. 2016). Therefore, it is sought alternatives that can prevent the disease, avoiding the onset of manifestations. Recent studies have showed physical exercise to prevent sepsis (Peppler et al. 2016a; Peppler et al. 2016b; Tymy et al. 2017). Thus, in our study evaluated 12 weeks of resistance exercise before to LPS administration and the results were effective in preventing the alterations found.

Cell damage caused by sepsis in lung tissue due to oxidative stress was prevented by physical exercise. The levels of lipid peroxidation and reactive species that were elevated in sedentary animals with sepsis, decreased to the control levels in trained animals. According to Gleeson et al (2011), we can infer that this antioxidant effect of exercise occurs in response to long-term training (chronic effect), because at each exercise session the organism improves its antioxidant defenses in response to increased transient oxidative stress and prepares for a new stimulus, which can be a new exercise session or an inflammatory disease (Gleeson et al. 2011).

In our study, trained animals also had ATP, IL-6 and IL-1B levels decreased when compared to the sedentary septic animals, corroborating with the prevention of cellular damage caused by sepsis. With less ATP available, fewer pro-inflammatory cytokines are released and less signaling of apoptosis occurs. As IL-6 was responsible for the increase in body temperature (Blomquist and Engblom, 2018), consequently trained animals had lower temperatures when compared to sedentary animals demonstrating the protective mechanism of exercise.

The trained animals were also protected from decreasing in the density of the NTPDase enzyme in lung tissue, indicating that the ATP molecule was now being hydrolyzed and could not exert its pro-inflammatory effects. The diminished density of P2X7 receptor in the trained animals when compared with the sedentary septic animals confirms this hypothesis. This receptor, in

the lung tissue, is responsible for activating inflammasomas linked to inflammatory diseases such as sepsis and when ATP is in high concentrations, as in this case non-selective pore formation occurs in some cells expressing P2X7, which can lead to necrosis or cellular apoptosis (Kasper and Barth, 2017).

In addition to exerting a protective effect on lung tissue, physical exercise was also able to partially prevent the effects caused by LPS on the ectonucleotidase enzymes of blood lymphocytes. Increased ATP hydrolysis and decreased Ado hydrolysis are characteristic of an anti-inflammatory environment since the Ado molecule has protective functions, such as inhibition of the production of inflammatory cytokines and activation of immune cells (Cardoso et al. 2015b). This effect of the exercise on the enzymes econucleotidases can be one of the most important mechanisms unveiled in this study, since they regulate the nucleotide and nucleoside levels in the extracellular environment also regulating the whole function of the immune cells (Zimmerman, 2011).

In conclusion, this study reveals some mechanisms involved in the protective effect of exercise against sepsis. We demonstrated that 12 weeks of resistive physical exercise is able to protect almost totally from damage to the lungs and the immune system of animals exposed to LPS. We also showed that the purinergic system has a direct influence on the immune response and that exercise can increase the body's defenses by modulating ectonucleotidases activity and cell damage. In short, regular practice of resistance exercise is effective in preventing sepsis and may contribute to human health. New research is encouraged involving physical exercise and immune system from these findings.

ACKNOWLEDGMENTS

Support for this study was provided by CAPES and CNPq.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflict of interest.

5. REFERENCES

- Ali SF Lebel CP Bondy SC. 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 13:637-648.
- Assmann CE et al. 2018. Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 103:1253–1261.
- Blomqvist A and Engblom D. 2018. Neural Mechanisms of InflammationInduced Fever The Neuroscientist. 0 (00): 1 –19.
- Borges RC et al. 2015. Physical activity, muscle strength, and exercise capacity 3 months after severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*. 41:1433–1444
- Boyne AF and Ellman GL. 1972. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*. 46(2):639-53.
- 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.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*.72(1):248-254.
- Bursch LH and Picher M. 2006. E-NTPDases in Human Airways: Regulation and Relevance for Chronic Lung Diseases. *Purinergic Signalling*. 2:399-408.
- Burnstock G and Boeynaems. 2014. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signalling*. 10:529–564.
- Cardoso AM et al. 2015a. Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from L-NAME induced hypertension rats. *J Hypertens*. 33(4): 763-72.

Cardoso AM et al. 2015b. Moderate Physical Exercise and Purinergic Signaling: The Impact of Ectonucleotidases on Platelets and Lymphocytes. *Single Cell Biol.* S1:005.

Cekic C and Linden J. 2016. Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology.* 16:177 -192.

Chan K Delfert D Junger K.D. 1986. A direct colorimetric assay for Ca+2-ATPase activity. *Analytical Biochemistry.* 157:375-80.

Cruzat VF et al. 2007. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 13(5):336-342.

Duarte JM et al. 2005. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Neurochemistry.* 111(2): 368-79.

Ellman GL et al. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology.* 7: 88–95.

Ferrari D et al. 2016. Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. *Trends Immunol.* 37(6):399-411.

Giusti G and Galanti B. 1984. Colorimetric Method. 315–323.

Gleeson M et al. 2011. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of diseases. *Nature Reviews Immunology.* 11: 607 – 615.

Habig WH Pabs T MJ Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249(22):7130–7139.

Heitrich M et al. 2016. Erythropoietin attenuates renal and pulmonary injury in polymicrobial induced-sepsis through EPO-R, VEGF and VEGF-R2 modulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 8e:606-613.

Instituto Latino Americano Da Sepse, ILAS. Disponível em <http://www.ilas.org.br/index-modal.php#close>. Acesso em 20/05/2016.

- Irahara T et al. 2015. Low-intensity exercise in the acute phase of lipopolysaccharide-induced sepsis improves lipid metabolism and survival in mice by stimulating PGC-1 α expression. *Journal Trauma Acute Care Surg.* 80(6): 933-940.
- Jaques JAS et al. 2010. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase Activity. *Analytical Biochemistry.* 410: 34– 39.
- Junger WG. 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling *Nature Reviews Immunology.* 11: 201 – 212.
- Karamohamed S and Guidotti G. 2001. Bioluminometric method for real-time detection of ATPase activity. *Biotechniques.* 31 (2): 420-5.
- Kasper M and Barth K. 2017. Potential contribution of alveolar epithelial type I cells to pulmonary fibrosis. *Biosciencie Reports.* 21: 37 (6).
- Krysko DV et al. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 12: 860-875.
- Leal DB et al. 2005. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD 39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica Biophysica Acta.* 18(1721): 9-15.
- Lemaire I and Leduc N. 2003. Purinergic p2x7 receptor function in lung alveolar macrophages: pharmacologic characterization and bidirectional regulation by th1 and th2 cytokines. *Drug Development Research* 59:118–127.
- LEVINE RL et al. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology.* 186:464-478.
- Martins CC et al. 2016. Exercise Training positively modulates the Ectonucleotidase Enzymes in Lymphocytes of Metabolic Syndrome Patients. *Physiology & Biochemistry.* 37(12): 930-936.

Mishra A. et al. 2011. Purinergic P2X7 receptor regulates lung surfactant secretion in a paracrine manner. *Journal Cell Science*. 124 (4): 657-668.

Ohkawa H Ohishi N Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95:351-358.

Olesen J et al. 2015. Impact of training status on LPS-induced acute inflammation in humans. *J Appl Physiol (1985)*. 118(7):818-29.

Peppler WT et al. 2016a. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 310: 934–942.

Peppler WT et al. 2016b. Habitual physical activity protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse adipose tissue. *Adipocyte*. 0 (0): 1–11.

Radak Z et al. 1999. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology and Medicine*. 27(1-2): 69 – 74.

Rech JC et al. 2016. The evolution of P2X7 antagonists with a focus on CNS indications. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26:3838-3845.

Russel JA. 2006. Management of sepsis. *The New England Journal of Medicine*. 355:1699-713.

Scheffer DL et al. 2012. Impact of Different Resistance Training Protocols on Muscular Oxidative Stress Parameters. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 37:1239-1246.

Schmued LC Stowers CC Scallet AC. 2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Research*. 1035(1):24-31.

Schneiders J et al. 2015. The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. *Brain Behav Immun*. 48:147-64.

Shaabana AA et al. 2018. Protective effect of pristimerin against LPS-induced acute lung injury in mice. International Immunopharmacology. 59: 31–39.

Singer M et al. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). Jama. 315 (8): 801–810.

Tym K et al. 2017. Voluntary running exercise protects against sepsis-induced early inflammatory and pro-coagulant responses in aged mice. Critical Care. 21 (210): 1 – 12.

Vuaden FC et al. 2007. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. Life Science. 80:1784 – 1791.

Zimmermann H. 2011. Purinergic signaling in neural development. Seminars in Cell and Developmental Biology 22:194-204.

FIGURES:

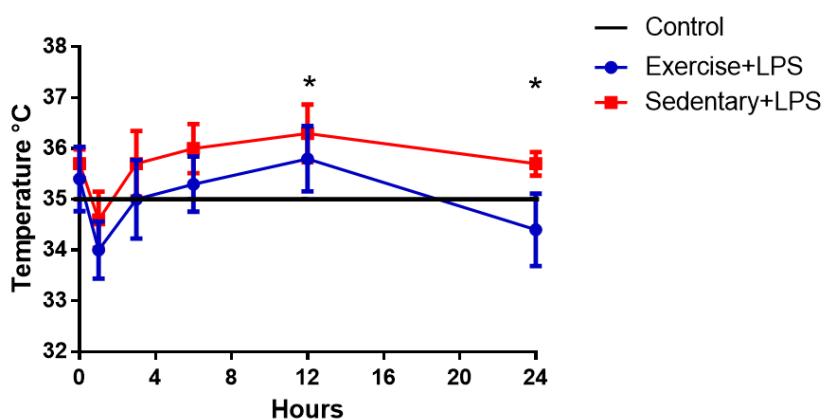


Figure 1: Temperature of animals after sepsis induced in 1, 3, 6, 12 and 24 hours. Dates are represented as mean \pm SEM, $p<0.05$ ($n=5$). * represents significant difference in relation to control. # represents significant difference between Exercise+LPS and Sedentary+LPS groups.

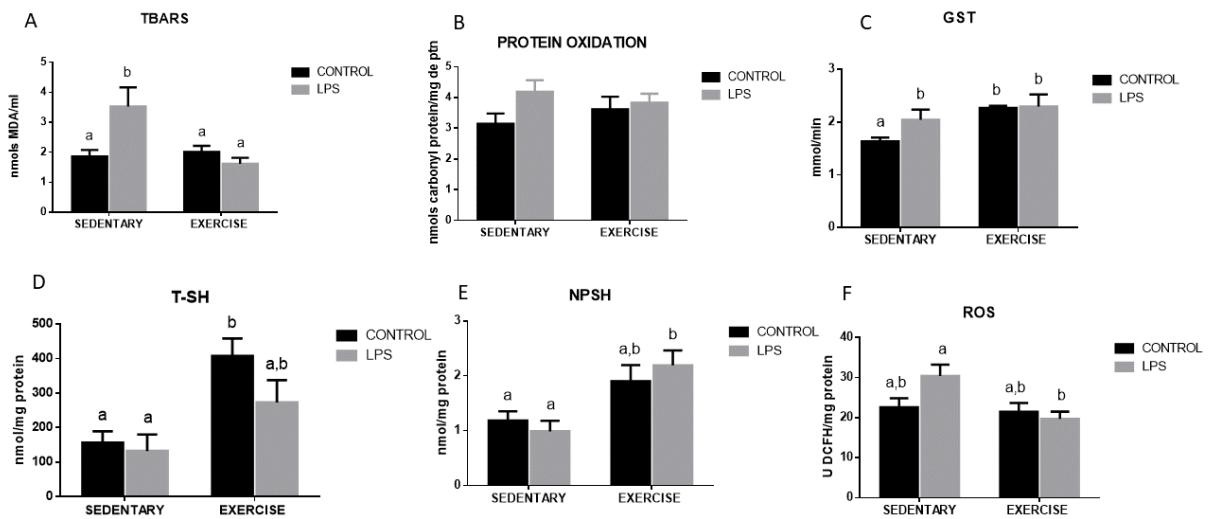


Figure 2: Oxidative Stress parameters in lung from control, exercise, LPS and exercise+LPS groups. Dates are represented as mean \pm SEM. Bars with different letters are statistically different ($p<0.05$). (A) n= 5; (B) n= 4; (C) n= 5; (D) n= 5; (E) n= 5; (F) n=5.

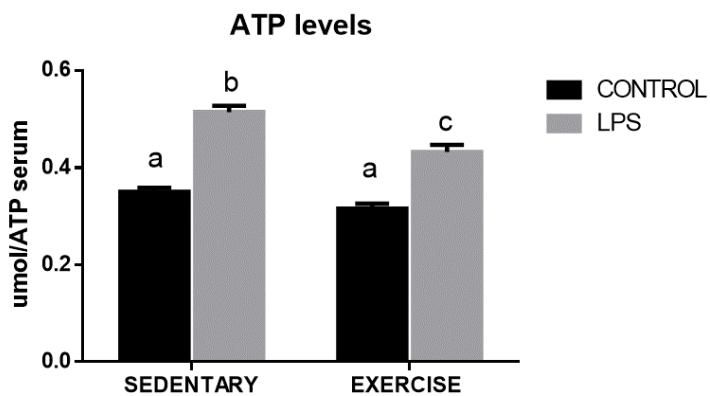


Figure 3: ATP levels in serum from control, exercise, LPS and exercise+LPS groups. Dates are represented as mean \pm SEM. Bars with different letters are statistically different ($p<0.05$, n =9).

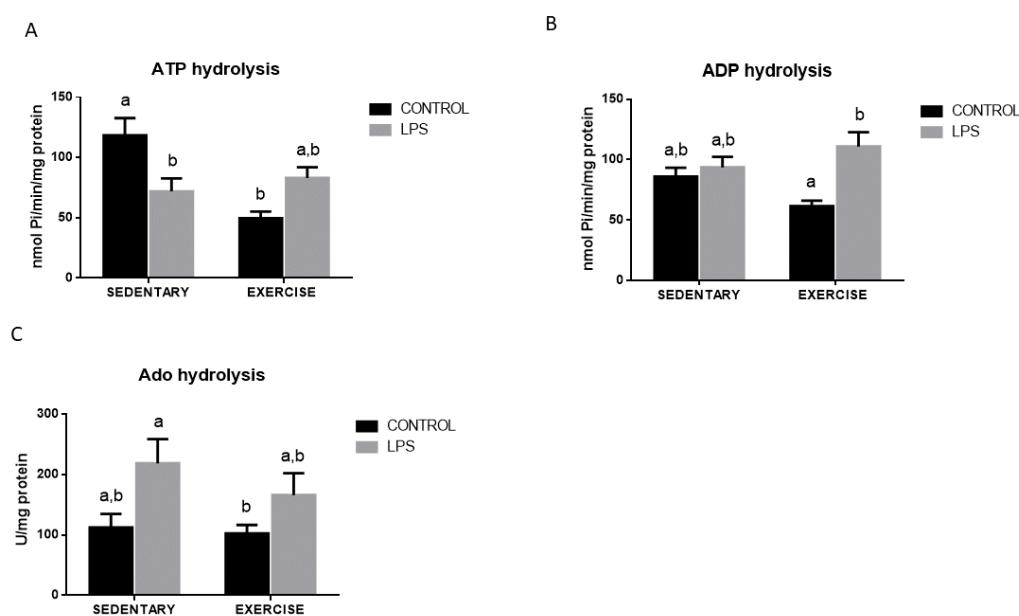


Figure 4: NTPDase and Adenosine Deaminase (ADA) activity in blood lymphocytes from control, exercise, LPS and exercise+LPS groups using ATP (A), ADP (B) and Ado (C) as substrate. Dates are represented as mean \pm SEM. Bars with different letters are statistically different ($p<0.05$). (A) n= 5; (B) n= 6; (C) n= 6.

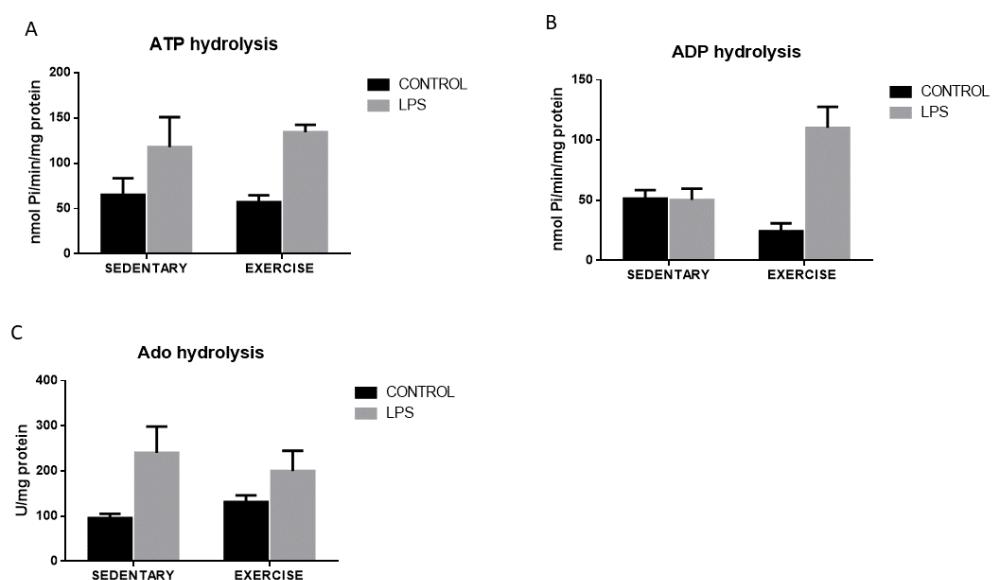


Figure 5: NTPDase and ADA activity in lung lymphocytes control, exercise, LPS and exercise+LPS groups using ATP (A), ADP (B) and Ado (C) as substrate. Dates are represented as mean \pm SEM. (A, B) n=3; (C) n=3.

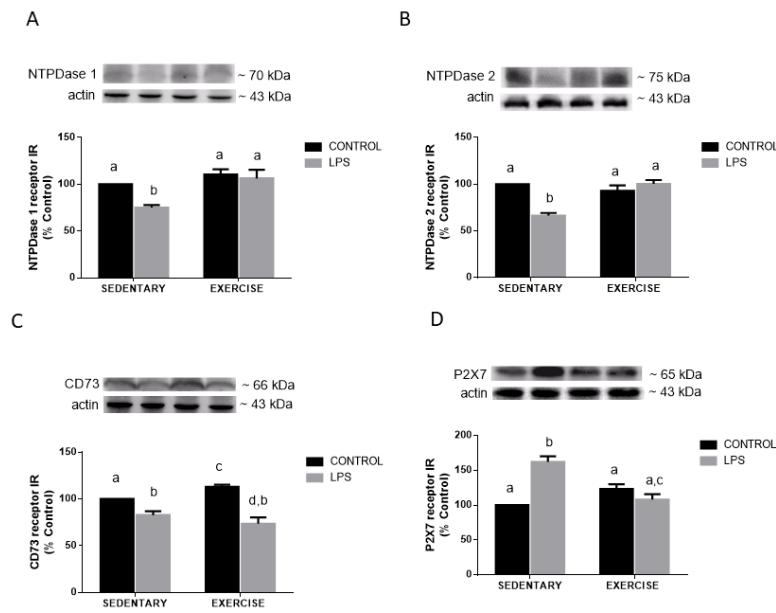


Figure 6: NTPDase 1(A), NTPDase 2 (B) and CD73 (C) enzymes density and P2X7 receptor density (D) by Western Blot analyze in lung tissue. β -actin loading control antibody was used to normalize the levels of protein. Dates are represented as mean \pm SEM. Bars with different letters are statistically different ($p<0.05$), $n=4$.

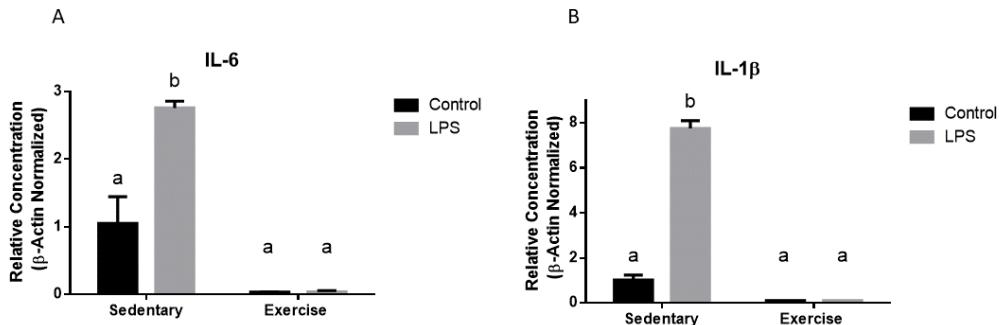


Figure 7: Gene expression profile of IL-6 and IL-1 β by lymphocytes control, exercise, LPS and exercise+LPS groups. Gene expression was normalized by β – actin (ACTB) and performed using qRT-PCR. Bars with different letters are statistically different ($p<0.05$) $n=5$.

5.DISCUSSÃO

Muitos estudos têm utilizado o exercício físico como ferramenta preventiva contra doenças relacionadas à inflamação (VUADEN et al., 2007; CARDOSO et al., 2015; OLESEN et al., 2015). No presente trabalho, utilizou-se um protocolo de exercício resistido em animais antes da indução da sepse por meio da administração de LPS.

Os resultados deste estudo mostraram um aumento nos níveis de espécies reativas e de peroxidação lipídica no pulmão dos animais sépticos, sugerindo um rompimento na membrana celular e consequentemente, extravasamento de muitas moléculas e/ou organelas do meio intracelular para o meio extracelular (KRYSKO et al., 2012).

Uma destas moléculas é o ATP. Na análise realizada em soro dos animais com sepse, encontrou-se a concentração deste nucleotídeo aumentada, confirmando que estava ocorrendo dano celular nestes animais. Este ATP extracelular pode ter dois destinos principais: ele pode ser hidrolisado pelas enzimas do sistema purinérgico ou pode se ligar aos receptores do tipo P2 (ZIMMERMAN, 2011).

Na análise da densidade da enzima NTPDase em tecido pulmonar, verificou-se uma diminuição desta densidade nos animais sépticos. Em contrapartida, a densidade do principal receptor sensível ao ATP, o receptor P2X7, estava aumentada, sugerindo que então, este nucleotídeo estaria se ligando ao seu receptor e desencadeando uma série de respostas pró-inflamatórias (CARDOSO et al., 2015; ZIMMERMAN, 2011).

Uma das respostas pró-inflamatórias do ATP quando ligado ao receptor P2X7 é o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (FERRARI et al., 2016). Neste estudo encontrou-se a expressão gênica das citocinas IL-6 e IL-1 β aumentada nos linfócitos dos animais com sepse. Sendo um dos efeitos destas interleucinas o aumento da temperatura corporal (BLOMQVIST e ENGBLOM, 2018), verificou-se a temperatura dos animais sépticos em 1, 3, 6, 12 e 24 horas

após a indução da sepse e estimou-se o pico de temperatura em 12 horas, confirmando a febre e caracterizando a inflamação.

Além disso, também foi verificado a atividade das enzimas ectonucleotidases em linfócitos sanguíneos para verificar se este ATP extracelular não estaria sendo hidrolisado pela NTPDase. Os resultados mostraram que a atividade desta enzima estava diminuída nos animais sépticos quando comparado ao controle e que a atividade da enzima ADA estava aumentada. Isto caracteriza um quadro típico de inflamação, uma vez que a adenosina que poderia exercer efeito anti-inflamatório estava sendo hidrolisada pela ADA.

Através destes resultados, pode-se verificar que a sepse induzida pelo LPS causou dano celular no tecido pulmonar e ativou um processo inflamatório através da regulação do sistema purinérgico. O exercício físico resistido usado nesta pesquisa como agente preventivo, foi capaz de prevenir estes efeitos através do seu efeito crônico, caracterizado pelas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

O exercício físico, por meio do aumento das defesas endógenas, previu o aumento nos níveis de ER, da peroxidação lipídica e, por consequência, sugere-se que previu o dano celular causado pela sepse no tecido pulmonar. Além disso, o aumento nos níveis de ATP em soro também foi previsto com as 12 semanas de exercício resistido.

Em relação à densidade das enzimas ectonucleotidases, o exercício físico previu a diminuição destas enzimas e também o aumento na densidade do receptor P2X7. Pode-se sugerir então, que o ATP que estava disponível no meio extracelular estaria agora, sendo hidrolisado pela NTPDase e não estaria exercendo seus efeitos pró-inflamatórios. Assim também, o aumento na expressão gênica das interleucinas IL-6 e IL-1 β foi previsto pelo exercício físico e, consequentemente, pode-se observar que a temperatura dos animais exercitados se manteve menor comparado aos animais sedentários em todos os horários de coleta de temperatura.

A prevenção na alteração das atividades enzimáticas nos linfócitos ocorreu de maneira parcial, ou seja, verifica-se uma tendência da prevenção exercida pelo exercício em retornar as atividades a nível de controle. Sendo assim, mais ATP estaria sendo hidrolisado até adenosina e esta estaria em maior disponibilidade uma vez que, a atividade da ADA estaria diminuída. Isto pode sugerir que o organismo treinado está mais suscetível a um ambiente anti-inflamatório.

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados encontrados neste estudo, pode-se verificar alterações significativas no sistema imune, sistema purinérgico e no tecido pulmonar dos animais sépticos. Através destas alterações, sugere-se que a sepse causou dano a estes sistemas e ao pulmão através da alteração nas enzimas ectonucleotidases e pelo aumento da produção de espécies reativas. O exercício, por sua vez, foi capaz de prevenir todas as alterações significativas encontradas que foram causadas pela doença. Então, doze semanas de exercício resistido foram capazes de prevenir, detalhadamente:

- O aumento da temperatura corporal na 24° hora após a exposição ao LPS;
- O aumento da Peroxidação lipídica e de espécies reativas no tecido pulmonar;
- O aumento dos níveis ATP no soro;
- As alterações nas enzimas ectonucleotidases nos linfócitos, parcialmente;
- A alteração na densidade das enzimas ectonucleotidases e do receptor P2X7 no pulmão e;
- O aumento na expressão gênica da IL-6 e da IL-1 β em linfócitos.

Assim, incentiva-se a prática de exercícios físicos resistidos como medida preventiva contra a sepse e outras doenças relacionadas à inflamação, e com alterações semelhantes as encontradas aqui. Incentiva-se também, que outras análises sejam realizadas com intuito de investigar outros mecanismos pelos quais o exercício age e, além disso, outras alterações que a sepse pode causar e que o exercício seja capaz de prevenir.

Referências

- ABBRACCIO, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 281-341, 2006.
- ANTONIOLI, L., BLANDIZZI, C., PACHER, P. AND HASKÓ, G. 2013. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 842-857.
- BURNSTOCK G, BOEYNAEMS JM. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signal**, v. 10, p. 529-564, 2014.
- BURNSTOCK, G. Cotransmission. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 47–52, 2004.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31-304, 2004.
- CARDOSO AM, DULCE BAGATINI M, MORSCH VM. Moderate physical exercise and purinergic signaling: the impact of ectonucleotidases on platelets and lymphocytes. **Single Cell Biology**, S1:005, 2015.
- CRUZAT VF, ROGERO MM, BORGES MC, TIRAPEGUI J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13 n. 5, p. 336-342, 2007.
- CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 2, p. 107-25, 2001.
- DI VIRGILIO F.; SANZ J. M.; CHIOZZI P.; FALZONI S. The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. **Progress in Brain Research**, v. 120, p. 355-68, 1999.
- FERRERO-MILIANI L, NIELSEN OH, ANDERSEN OS, GIRARDIN SE. Chronic Inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in Interleukin-1B Generation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, p. 227–235, 2006.

FORRESTER, T. et al. Effect of adenosine triphosphate and some derivatives on cerebral blood flow and metabolism. **The Journal of Physiology**, v. 296, p. 343-355, 1979.

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 diseases. **Nature Review Immunology**, v. 11, p. 607-615, 2001.

GODWIN, A.; PRABHU, H. Lipid peroxidation of fish oils. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 202-204, 2006.

HEITRICH M, GARCIA DMA, STOYANOFF TR, RODRIGUEZ JP, TODARO JS, AGUIRRE MV. Erythropoietin attenuates renal and pulmonary injury in polymicrobial induced-sepsis through EPO-R, VEGF and VEGF-R2 modulation. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 8, p. 606-613, 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv100364.pdf>. Acesso em 25/08/2018.

Instituto Latino Americano Da Sepse, ILAS. Available at: <http://www.ilas.org.br/index-modal.php#close>. Acesso em 20/05/2016.

IRAHARA T, SATO N, INOUE K, et al. Low-intensity exercise in the acute phase of lipopolysaccharide-induced sepsis improves lipid metabolism and survival in mice by stimulating PGC-1 α expression. **Journal Trauma Acute Care Surgery**, v. 80, n. 6, p.933-940, 2015.

JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 201–212, 2011.

KÖLES, L. et al. Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. **Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology**, v. 377, p. 1-33, 2007.

KUKULSKI, F., LÉVESQUE, S.A. AND SÉVIGNY, J. Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. **Pharmacology of Purine and Pyrimidine Receptors** v. 61, p. 263-299, 2011.

LIN E, CALVANO SE, LOWRY SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

LINDEN J.; CEKIC C. Regulation of Lymphocyte function by adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2097-103, 2012.

MIRON VV, BOTTARI NB, ASSMANN CE, et al. Physical exercise prevents alterations in purinergic system and oxidative status in lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. **Journal of Cell Biochemistry**. 2018. DOI: 10.1002/jcb.27590.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews**, v. 82, p.1013-67, 2002.

OLESEN J, BIENSØ RS, MEINERTZ S, et al. Impact of training status on LPS-induced acute inflammation in humans .**Journal Applied Physiology**, v.118, n. 7, p. 818-829, 2015.

PEPPLER WT, ANDERSON ZG, MACRAE LM, MACPHERSON REK, WRIGHT DC. Habitual physical activity protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse adipose tissue. **Adipocyte**, v. 6, p.1-11, 2017.

PEPPLER WT, ANDERSON ZG, SUTTON CD, RECTOR RS, WRIGHT DC. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide induced liver inflammation in 1 mice. American **Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, p. 94-942,2016.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK G. Tri Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v.50, p.413-492, 1998.

RASSENDREN, F. et al. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 5482-6, 1997.

ROBSON S. SÉVIGNY, J. ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, p. 409–430, 2006.

RUSSELL JA. Management of sepsis. **New England Journal Medicine**, v. 355, p. 1699-1713, 2006.

SALLES MJC, SPROVIERI SRS, BEDRIKOW R, PEREIRA AC, CARDENUTO SL, AZEVEDO PRC, SILVA TM, GOLIN V. Síndrome Da Resposta Inflamatória Sistêmica/Sepse – Revisão E Estudo Da Terminologia E Fisiopatologia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, p. 86-92, 1999.

SCHNEIDERS, J.; FUCHS, F.; DAMM, J.; HERDEN, C.; GERSTBERGER, R.; SOARES, D. M.; ROTH, J.; RUMMEL, C.; The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. 48, p.147-164, 2015.

SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, et al. The Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SURPRENANT A; RASSENDREN F; KAWASHIMA E.; NORTH R. A.; BUELL G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7), **Science**, v. 272, p. 735-8, 1996.

TAPIERO H.; TEW K.D. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 3-4, p. 145-155, 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VUADEN, F. C.; COGNATO, G. P.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; SARKIS, J. J. F.; BONAN, C. D. Lipopolysaccharide alters nucleotidase activities from lymphocytes and serum of rats. **Life Science**, v. 80, p. 1784 – 1791, 2007.

ZIMMERMANN H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell Developmental Biology**, v. 22, p. 194-204, 2011.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Dev Res**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

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

ANEXO A

Certificado de Aprovação do CEUA/UFSM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do exercício físico sobre componentes do sistema purinérgico e parâmetros de estresse oxidativo em modelo experimental de sepse", protocolada sob o CEUA nº 5975191216, sob a responsabilidade de **Maria Rosa Chitolina Schetinger** e equipe; **Vanessa Valéria Miron; Andréia Machado Cardoso; Letícia Toneto Druzian; Nathieli Bianchin; Pauline da Costa; Thauan Lopes Faccin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 08/03/2017.

We certify that the proposal "Effects of physical exercise on components of the purinergic system and parameters of oxidative stress in experimental model of sepsis", utilizing 60 Heterogeneous rats (60 males), protocol number CEUA 5975191216, under the responsibility of **Maria Rosa Chitolina Schetinger** and team; **Vanessa Valéria Miron; Andréia Machado Cardoso; Letícia Toneto Druzian; Nathieli Bianchin; Pauline da Costa; Thauan Lopes Faccin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 03/08/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2017** a **06/2018** Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

Linhagem: **Wistar**

sexo: **Machos**

idade: **60 a 90 dias**

N: **60**

Peso: **200 a 250 g**

Resumo: Sepse é uma doença conhecida por gerar uma infecção generalizada na tentativa de combater uma inflamação. Ela afeta as respostas imunes, inflamatórias e de coagulação do hospedeiro, podendo levar a morte. O exercício físico tem sido reconhecido como uma forma de proteção nos casos de sepse, entretanto, os mecanismos responsáveis pelo seu efeito ainda não estão completamente elucidados. Assim, o objetivo deste trabalho é verificar os efeitos de doze semanas de treinamento resistido na escada sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre a atividade e a expressão de componentes do sistema purinérgico em modelo experimental de sepse. Para isso, ratos machos serão divididos entre treinados e sedentários, e, após o período de treinamento, a sepse será induzida através da administração de LPS. O sangue e o pulmão serão coletados para as análises da atividade e expressão das enzimas ectonucleotidases e do receptor P2X7, além de serem avaliados parâmetros de estresse oxidativo como danos proteicos e lipídicos e conteúdo de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos nos diferentes grupos trabalhados. Espera-se, através destas análises, que os ratos treinados tenham os efeitos da inflamação reduzidos em relação aos ratos não treinados, comprovando que o exercício físico pode ser usado como ferramenta auxiliar no combate à sepse.

Local do experimento: Os animais serão mantidos no biotério setorial da bioquímica, prédio 19, em um macroambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) que é verificada através de termostato e com um ciclo de 12 horas claro/escuro, o ambiente possui 2 exaustores de ar para uma completa renovação do ar interno do biotério. A ração que os animais recebem tem balanceamento de nutrientes essenciais, proteínas, carboidratos e lipídeos, componentes básicos e iguais aos utilizados no biotério central, sendo a água e a ração sólida fornecidas ad libitum. Antes do início do experimento, os animais passarão por um período de adaptação de 10 dias e o fundo das caixas receberão maravilha, que após o uso, será descartada como contaminante. Além disso, os animais serão distribuídos em 5 ratos e todas as caixas receberão objetos (rolos de papel e/ou PVC) para enriquecimento ambiental.

Santa Maria, 09 de março de 2017



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

A handwritten signature in black ink that reads "Daniela Bitencourt Rosa Leal".

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

A handwritten signature in black ink that reads "Denis Broock Rosenberg".

Prof. Dr. Denis Broock Rosenberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria