

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

Fábio Fernandes Mello

**EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO  
RESISTIDO EM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NA  
ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE  
RATOS HIPERTENSOS**

Santa Maria, RS  
2016

**Fábio Fernandes Mello**

**EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO RESISTIDO EM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NA ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE RATOS HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Co-orientador: Prof. Dr. Jessié Martins Gutierrez

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mello, Fábio Fernandes  
Efeitos de diferentes intensidades de exercício resistido em biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade das ectonucleotidasas em plaquetas de ratos hipertensos / Fábio Fernandes Mello.-2016.  
51 f.; 30cm

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Coorientador: Jessié Martins Gutierres  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Hipertensão 2. Estresse oxidativo 3. Ectoenzimas  
4. Exercício físico I. Schetinger, Maria Rosa Chitolina  
II. Gutierres, Jessié Martins III. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Fábio Fernandes Mello. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: fabiomellopesquisador@gmail.com

**Fábio Fernandes Mello**

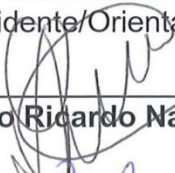
**EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO RESISTIDO EM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NA ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUETAS DE RATOS HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Aprovado em 28 de janeiro de 2016:**



**Profª Drª. Maria Rosa Chitolina Schetinger**  
(Presidente/Orientador)



**Prof Dr. Paulo Ricardo Nazario Viecili**



**Dr. Fabiano Barbosa Carvalho**



**Prof Drª. Vania Lucia Moro (Suplente)**

Santa Maria, RS  
2016

Dedico este trabalho a Deus primeiramente, por me iluminar com paciência e perseverança neste caminho importante da minha vida. Agradeço minha família, em especial a minha mãe, pelo seu apoio de sempre, principalmente nas fases difíceis, um exemplo de amor, cumplicidade e compreensão a ser seguido sempre. Aos amigos que sempre estenderam suas mãos quando precisei e, também pelos bons momentos vividos nesta etapa.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelos momentos de paz e tranquilidade durante essa minha trajetória acadêmica. Carregarei sempre estas vivências, sejam elas frustrações ou alegrias, com a certeza de que alguém esteve controlando e mostrando os caminhos a serem percorridos.

Um agradecimento especial a minha mãe, Maria Aparecida Porciuncula Fernandes, pelo apoio e encorajamento de buscar os meus sonhos, principalmente através dos estudos. Não foi fácil terminar esse ciclo, mas o seu apoio foi fundamental para que eu seguisse sempre em frente.

Gostaria de dedicar também a todos meus familiares, pelo carinho, pelas boas energias e torcida em todos os meus projetos de vida. Aos mais que primos e amigo, irmãos Claudinho, Rafael e ao Renélton, respectivamente, pelos momentos inesquecíveis juntos durante muitos anos das nossas vidas, momentos bons e ruins, mas sempre juntos. Apesar da distância estamos sempre juntos. Vocês também fazem parte dessa história.

*In memoriam*, ao meu pai, meus tios e primo que partiram cedo desta vida, dedico a vocês também o término dessa etapa. Sempre levarei vocês na minha memória e coração. Saudades...

O meu muitíssimo obrigado a professora Maria Amélia Roth e ao médico, aluno e amigo Marcelo Brum Xavier. Vocês são grandes exemplos de pessoas simples na sua essência e, só tenho a agradecer pelo enorme apoio, pela confiança e, pelos ensinamentos que me deram. Podem ter certeza que os valores simples do ser humano que eu incorporei, tiveram o espelho na história de vocês!

A médica Raquel Primo Fernandes e ao psicólogo Sandro Dibi Zamberlan por cuidarem da minha saúde mental nesses últimos anos. Vocês são fundamentais nesse processo de reorganização emocional.

O registro da minha gratidão a professora Maria Rosa pelos ensinamentos ao longo desses anos de convivência. Obrigado professoras Maria Rosa e Vera Morsh por estes anos de convívio acadêmico. Da minha parte agradeço, mais uma vez, por este ciclo que está se encerrando de aprendizados e de oportunidades proporcionados por vocês.

Obrigado amigo e irmão Jessié Gutierrez pela ajuda que você sempre me deu, independentemente do momento, mas principalmente nos momentos difíceis.

Levarei comigo ensinamentos acadêmicos e científicos, o gosto pela pesquisa, as risadas nos corredores do prédio 18, enfim orgulho de ter sido co-orientado por você nessa etapa.

Aos amigos Juliano, Aline e Thauan pelos ótimos momentos que tivemos no laboratório, pelas nossas amizades que solidificaram ao longo dessa jornada. Muito, muito obrigado mesmo por ter a amizade de vocês acima de tudo. Nesse sentido, o carinho, o apoio, as experiências pessoais e, os conselhos que sempre me deram, ficarão sempre na minha lembrança. Estaremos sempre juntos, seja presentemente ou pelas redes.

Aos colegas do laboratório EnzitoX: Nathieli, Juci, Pauline, agradeço a vocês pela grande ajuda que sempre me deram no laboratório, tirando dúvidas e ajudando em experimentos. E também ao povo que citarei com enorme carinho como a Luana, Diéssica, Mariana, Karine, Carla, Naiara, Vanessa e Aniélen. Espero que sempre mantenhamos contatos, bjos girls.

Aos professores e colegas do nosso programa de pós-graduação, pelos ensinamentos adquiridos nessa etapa acadêmica.

Aos membros da banca examinadora desta dissertação, professor Dr. Paulo Viecili e Dr. Fabiano Barbosa Carvalho por terem aceitado avaliar este trabalho e, pelas contribuições que deram para o aprimoramento do mesmo.

Ao CNPQ e CAPES pelo fomento da minha formação acadêmico e científica.

“De novo, você não pode ligar os pontos olhando para o futuro, você só pode ligá-los olhando para o passado. Então você tem que confiar que os pontos vão, de alguma maneira se ligar no futuro. Você tem que confiar em alguma coisa, seu Deus, destino, vida, karma, qualquer coisa. Porque acreditar que os pontos vão se ligar em algum momento vai te dar confiança para seguir seu coração, mesmo que te leve para um caminho diferente do previsto. E isso fará toda a diferença.”

**Steve Jobs**, discurso durante a formatura da turma de Stanford, 2005.



## RESUMO

### EFEITOS DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO RESISTIDO EM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E NA ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM PLAQUESTAS DE RATOS HIPERTENSOS

AUTOR: Fábio Fernandes Mello

ORIENTADORA: Maria Rosa Chitolina Schetinger

CO-ORIENTADOR: Jessié Martins Gutierrez

A hipertensão arterial sistêmica está associada a eventos cardiovasculares importantes como o infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de 4 semanas de exercícios resistidos de alta e baixa intensidade sobre biomarcadores de estresse oxidativo e a atividade enzimática de ectonucleotidases em ratos hipertensos. Ratos machos Wistar foram divididos em seis grupos (n=10): grupo controle, grupo exercício alta intensidade (HIE), grupo exercício baixa intensidade (LIE), grupo controle L-NAME, grupo exercício alta intensidade L-NAME (HIE+L-NAME) e, grupo exercício baixa intensidade L-NAME (LIE+L-NAME). Os resultados demonstraram uma redução significativa dos níveis de nitrito e nitrato oxidado (NOx) no grupo L-NAME em comparação ao grupo controle. Houve um aumento significativo do NOx nos grupos exercício L-NAME quando comparados ao grupo L-NAME ( $p < 0.05$ ). Foi verificado um aumento significativo LIE+L-NAME em relação ao HIE+L-NAME ( $p < 0.05$ ). Houve uma redução significativa do conteúdo da proteína carbonil no LIE+L-NAME e HIE+L-NAME em relação ao grupo L-NAME ( $P < 0.05$ ). Um aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA) foi observado no grupo L-NAME em comparação ao grupo controle ( $p < 0.05$ ). Em ambos os grupos exercício LIE+L-NAME e HIE + L-NAME foram observadas reduções significativas no MDA quando comparados ao seu grupo controle e grupo L-NAME. Reduções significativas nos níveis de glutathiona peroxidase nos grupos L-NAME e exercícios L-NAME em comparação aos seus grupos controles foram observadas. Houve um aumento na hidrólise do ATP no LIE quando comparado ao grupo controle. Foram verificados aumentos significativos na hidrólise do ADP e AMP no grupo L-NAME em relação ao grupo controle e, reduções significativas nos grupos exercícios L-NAME quando comparados ao grupo L-NAME. Foram observados aumentos significativos da atividade da adenosina desaminase (ADA) nos grupos HIE e LIE. Houve uma redução significativa da atividade ADA no grupo L-NAME em relação ao grupo controle. Houve um aumento significativo da ADA no LIE+L-NAME quando comparado ao grupo controle. Os resultados sugerem que o exercício de baixa intensidade pode reduzir o estresse oxidativo e reestabelecer a atividade das ectonucleotidases, podendo reduzir os efeitos deletérios da HAS sobre o sistema cardiovascular.

**Palavras-chave:** Hipertensão. Estresse oxidativo. Ectoenzimas. Exercício físico.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF DIFFERENT INTENSITIES OF RESISTANCE EXERCISE IN OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AND ECTONUCLEOTIDASES ACTIVITIES IN PLATELET HYPERTENSIVE RATS

AUTHOR: FÁBIO FERNANDES MELLO  
ADVISER: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER  
CO-ADVISER: JESSIÉ MARTINS GUTIERRES

The objective of this study was to compare and analyze the effects of two 4-week resistance exercise protocols on oxidative stress (OS) biomarkers and ectonucleotidases activities in hypertensive rats. Male Wistar rats were divided into six groups (n = 10): control group, high-intensity exercise group (HIE), low intensity exercise group (LIE), the control group L-NAME, high-intensity exercise group L-NAME (HIE + L -name) and low intensity exercise group L-NAME (LIE + L-NAME). The results showed a significant reduction nitrite and nitrate oxidized content (NOx) in the L-NAME control group compared to the control group. There was a significant increase in NOx in the L-NAME exercise groups compared to their control group. A significant increase LIE + L-NAME in relation to HIE + L-NAME was verified. There was a significant reduction in protein carbonyl content in HIE and HIE + L-NAME group when compared to their control group. A significant increase in the levels of malondialdehyde (MDA) was observed in the L-NAME control group compared to the control group. In both L-NAME groups exercise significant reductions were observed in the MDA when compared to their control group. Significant reductions in L-NAME control group and L-NAME exercise groups were observed in the MDA compared with the control group. There was an increase in ATP hydrolysis in LIE when compared to the control group. Significant increases were observed in the hydrolysis of ADP and AMP in the L-NAME control group compared to the control group, and significant reductions in ADP and AMP in the L-NAME exercise groups compared to their control group. Significant increases in activity of adenosine deaminase (ADA) in HIE and LIE in the control group were observed. A significant reduction in ADA was observed in L-NAME control group compared to the control group. There was a significant increase in ADA in LIE + L-NAME compared to their respective controls. The results suggest that low intensity exercise may reduce the EO and regulate the activity of ectonucleotidases, reducing the deleterious effects of hypertension on the cardiovascular system, preventing cardiovascular complications of this disease.

**Keywords:** Hypertension. Oxidative stress. Ectoenzymes. Physical exercise.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Prevalência de HAS (%) no mundo em indivíduos acima de 18 anos entre os anos de 2010 e 2014.....	15
Figura 2 – Efeitos fisiológicos do NO no sistema vascular .....	18
Figura 3 – Enzimas envolvidas na degradação dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	23

### MANUSCRITO

Fig 1.A – Levels of nitrite/nitrate oxide (NOx), Protein carbonyl values content, levels of malondialdehyde (MDA) and, levels of reactive oxygen species (ROS) in serum of rats. Bars represent means $\pm$ SE. Groups with different symbols are statistically different ( $p < 0,05$ ); $n = 10$ ) .....	36
Fig 2.A. – Levels of glutathione peroxidase (GPx) and levels of glutathione-S-transferase (GST) in serum of rats. Bars represent means $\pm$ SE. Groups with different symbols are statistically different ( $p < 0,05$ ); $n = 10$ ) .....	37
Fig 3.A – NTPDase activities in platelets of rats using ATP, ADP as substrate (nmol Pi/min/mg of protein). 5'-nucleotidase activity in platelets of rats using AMP as substrate (nmol Pi/min/mg of protein). ADA activity in platelets of rats (U/L) .Bars represent means $\pm$ SE. Groups with different symbols are statistically different ( $p < 0,05$ ); $n = 10$ ) .....	38

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Classificação de normotensão, de pré-hipertensão e, de estágios da HAS.....	14
Tabela 2 – Estudos sobre o sistema purinérgico e a HAS em modelos animais (ratos).....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ADA	– Adenosina Desaminase
ADO	– Adenosina
ADP	– Adenosina Difosfato
AMP	– Adenosina Monofosfato
ANG	– Angiotensina
ANG II	– Angiotensina II
AT1	– Receptor tipo 1 para Angiotensina
AT2	– Receptor tipo 2 para Angiotensina
ATP	– Adenosina Trifosfato
AVE	– Acidente Vascular Encefálico
DCV (s)	– Doenças Cardiovasculares
ECA	– Enzima Conversora da Angiotensina
Ecto-NTPDase	– NTPDase
ERNS	– Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	– Espécies Reativas de Oxigênio
H <sub>2</sub> O	– Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– Peróxido de Hidrogênio
HAS	– Hipertensão Arterial Sistêmica
IAM	– Infarto Agudo do Miocárdio
L-NAME- L	– Arginine Methyl Ester Hydrochloride
MDA	– Malondialdeído
NOS	– Óxido Nítrico Sintase
NOx	– Metabólitos de Óxido Nítrico (nitrito/nitrato)
NTPDases	– Nucleosídeo trifosfatos difosforilases
O <sub>2</sub>	– Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	– Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	– Peróxido nitrito
PA	– Pressão Arterial
SNC	– Sistema Nervoso Central
SOD	– Superóxido Dismutase
SRAA	– Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TA	– Treinamento Aeróbico
TA	– Treinamento aeróbico
TNF-α	– Fator de Necrose Tumoral Alfa
TR	– Treinamento Resistido
XO	– Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica e de etiologia multifatorial (KEARNEY et al., 2005). A progressão dessa doença está associada a eventos cardiovasculares importantes como o infarto agudo do miocárdio (IAM) e, o acidente vascular encefálico (AVE) (METHA, 2001). O número de hipertensos aumentou de 600 milhões em 1980 para mais de 1 bilhão de pessoas em 2008, como é observado na Figura 1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). No Brasil cerca de 30% da população adulta é hipertensa, com a prevalência acima de 50% em idosos com mais de 60 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). Conseqüentemente estima-se que até 2025 cerca de 1,25 bilhões de pessoas sejam afetadas mundialmente por essa doença (KEARNEY et al., 2005).

A HAS é caracterizada por um quadro clínico de elevação crônica da pressão arterial (PA) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). A associação entre o aumento da PA e as doenças cardiovasculares (DCVs) pode ser observada a partir de níveis acima de 130X85mmHg, estágio caracterizado como pré-hipertensão, como descrito na tabela 1. Nesse sentido, a HAS é classificada em três estágios. O diagnóstico clínico da HAS é obtido primeiramente através da consulta médica, usando o equipamento adequado (HACKAM et al., 2010; QUINN et al., 2010). Após essa avaliação inicial, é sugerido que o paciente com suspeita de possuir a HAS seja reavaliado durante a cada dois meses ou, a cada um ano no consultório médico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

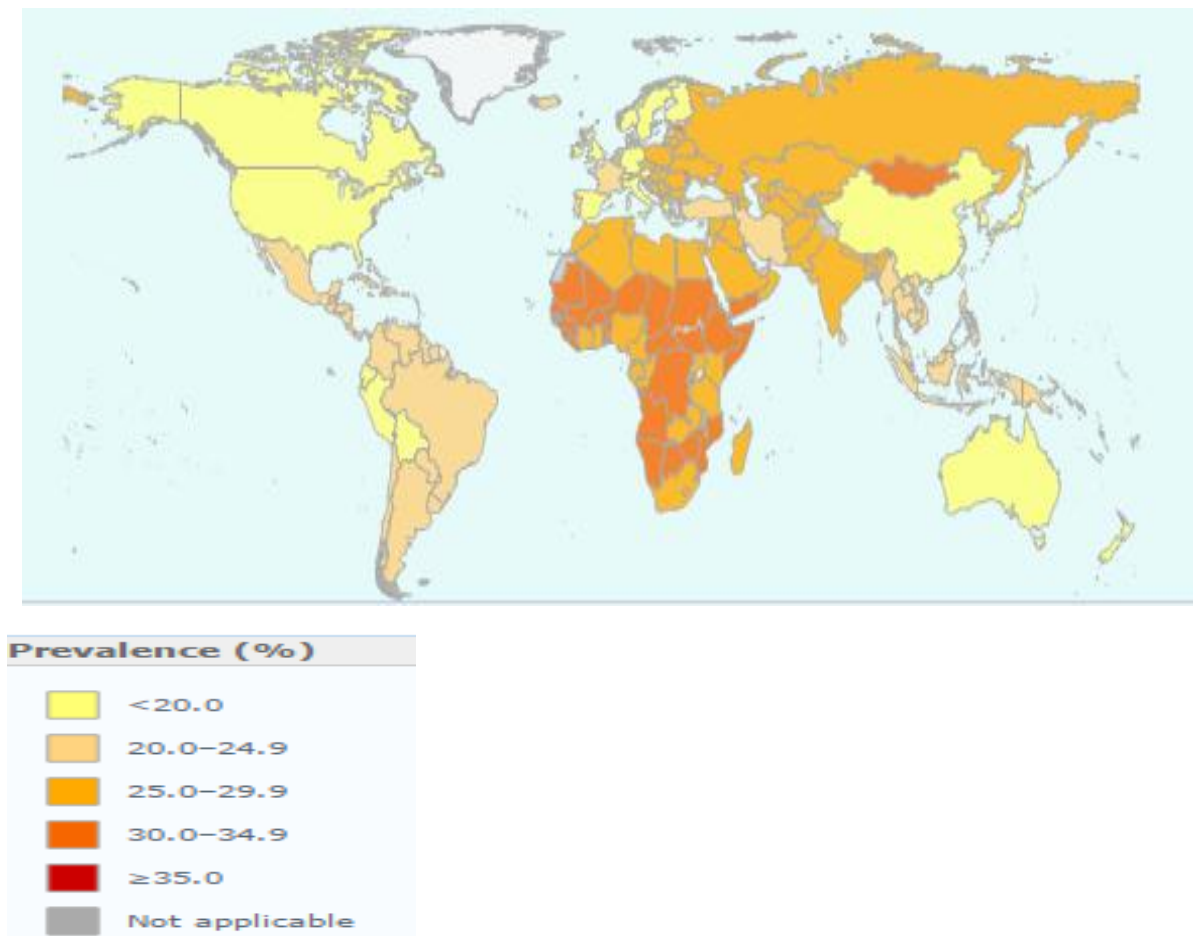
Tabela 1 – Classificação de normotensão, de pré-hipertensão e, de estágios da HAS

PA (mmHg)	Normal	Pré-Hipertensão	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
Sistólica	<130	130-139	140-159	160-179	≥180
Diastólica	<85	85-89	90-99	100-109	≥110

Fonte: Adaptada da Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2010.

Nesse sentido, durante a reavaliação outros parâmetros são importantes para a confirmação do diagnóstico clínico da HAS como a verificação da PA, sobrepeso e obesidade, histórico familiar sobre doenças cardiovasculares e, avaliação de parâmetros bioquímicos. Essas variáveis visam excluir todos os possíveis erros de diagnóstico dessa doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010; HACKAM et al., 2010; QUINN et al., 2010).

Figura 1 – Prevalência de HAS (%) no mundo em indivíduos acima de 18 anos entre os anos de 2010 e 2014



Fonte: World Health Organization (2015).

A PA é um mecanismo fisiológico importante para o sistema cardiovascular, pois regula a distribuição de sangue em nível central e periférico (GUYTON; HALL, 2011). Essa variável é dependente de estímulos fisiológicos ou ambientais tais como a ação do sistema nervoso central (SNC), através da atividade simpática e parassimpática, liberação de hormônios no sistema cardiovascular como a adrenalina, noradrenalina, aldosterona, entre outras substâncias e, através de disfunções metabólicas (resistência à insulina, hiperinsulinemia e dislipidemias) e, estresse físico e emocional (MELENOVSKY et al., 2005).

Em relação aos fatores de risco modificáveis, que possuem relação direta nas complicações da HAS, eles estão associados ao tabagismo, consumo excessivo de álcool, ingestão excessiva de sódio, sedentarismo, sobrepeso, obesidade, estresse e sedentarismo (CORNELISSEN et al., 2011). Por outro lado, existem fatores de risco não modificáveis como o gênero, a idade, o histórico familiar e, a



pré-hipertensão gestacional. Somado a isso, fatores sócio-econômicos evidenciam que países desenvolvidos reduziram a prevalência da HAS na sua população, enquanto que os países subdesenvolvidos aumentaram a incidência dessa doença nesse mesmo período (ROTH et al., 2015).

Intervenções não medicamentosas como a redução na ingestão de sódio e álcool, no peso, o abandono do tabagismo e a prática de exercícios físicos também são recomendadas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010; CORNELISSEN, 2013). Essas estratégias são preconizadas por diversas sociedades médicas especializadas, visando benefícios crônicos sobre o sistema cardiovascular, e que promovem a manutenção de valores ideais para a PA (CHOBANIAN et al., 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

O tratamento da HAS consiste na combinação de ações medicamentosas como o uso de uma ampla classe de fármacos destinados especificamente para o quadro clínico do paciente. Existem alguns fármacos comumente usados no tratamento da HAS classificados em diuréticos,  $\alpha$ -betabloqueadores,  $\beta$ -bloqueadores, vasodilatadores diretos, bloqueadores do canal de cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueadores do receptor  $AT_1$  da angiotensina II (Ang II) e, inibidor direto da renina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). Nesse sentido alguns desses medicamentos induzem a maior produção do óxido nítrico (NO), reduzindo os efeitos vasoconstritores decorrentes da HAS (SU, 2015; ZHAO et al., 2015).

A HAS possui em seus mecanismos fisiopatológicos, alterações na função endotelial que resultam numa menor produção e/ou biodisponibilidade de NO e, que está diretamente relacionada com o estresse oxidativo e com a evolução das DCVs (HUSAIN et al., 2015). Nesse sentido, a figura 2 demonstra a importância do endotélio vascular para a homeostase cardiovascular, pois é ele que controla a contratilidade e a distensibilidade de artérias, veias e capilares, além de sintetizar e liberar substâncias vasoativas que modulam o tônus, calibre vascular e fluxo sanguíneo (ZHAO et al., 2015). Geralmente é nesse tecido vascular que se iniciam os processos inflamatórios (SU, 2015). As lesões ateroscleróticas estão intimamente ligadas ao IAM, AVE, tromboembolismos periférico. As plaquetas possuem importante função na homeostase e coagulação do sangue em sítios de lesão vascular, e também em várias formas na imunidade inata e inflamação. As plaquetas são uma das primeiras células a se acumular em um local lesionado, induzindo uma

cascaata inflamatória que atrai leucócitos, células alvo ativadas, estimulando o crescimento e reparação sanguínea (VUADEN et al., 2009). Estes eventos cardiovasculares são a principal causa da morte súbita em homens entre 50 e 60 anos e, mulheres entre 60 e 70 anos (MEHTA et al., 2001).

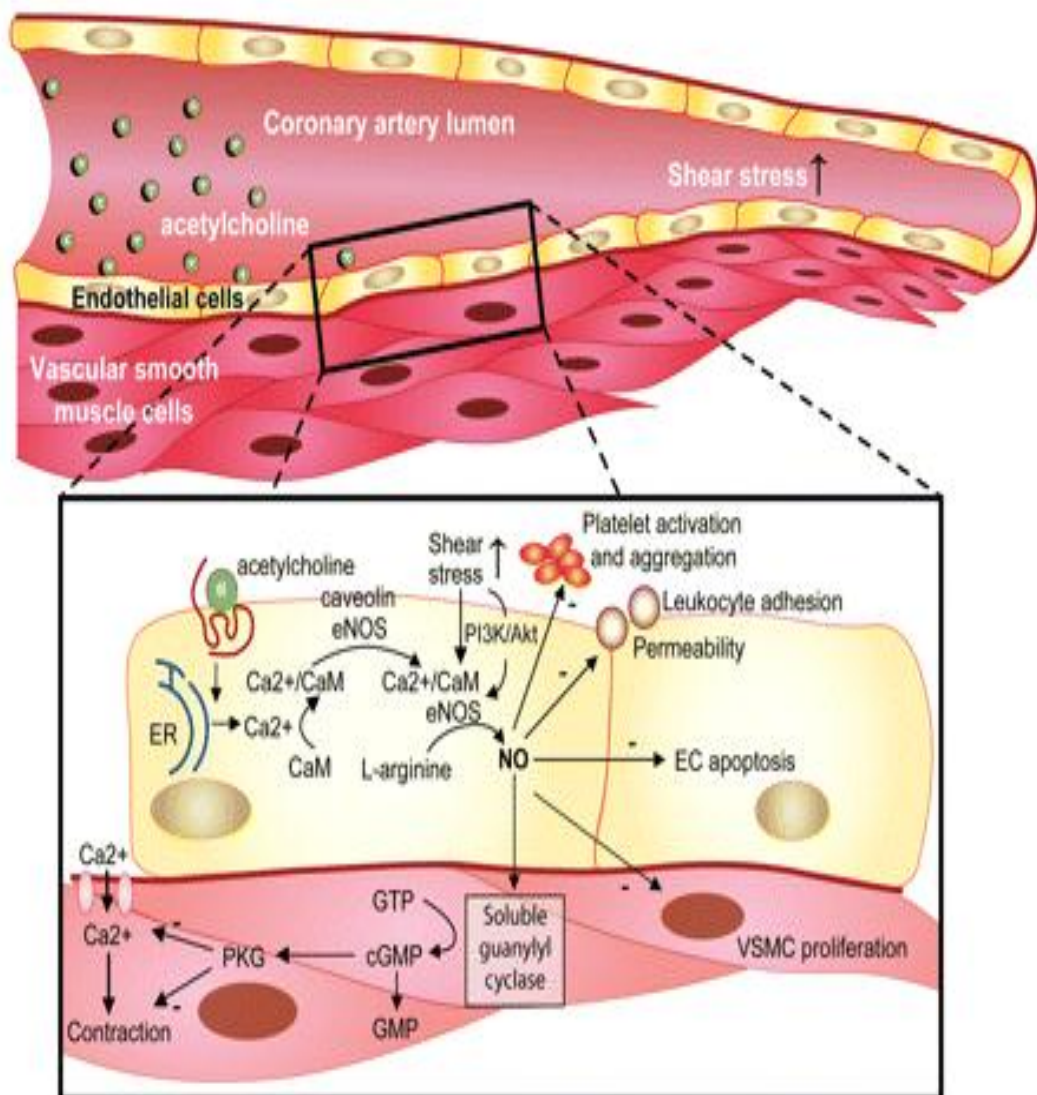
Entre os mecanismos de desenvolvimento da HAS, a disfunção endotelial exerce um papel importante, principalmente relacionado a um desequilíbrio redox-nitrosativo (HUSAIN et al., 2015). Esta é uma síndrome caracterizada pela diminuição da vasodilatação endotélio-dependente, caracterizada pela diminuição dos níveis de NO (SU, 2015). Somado a isso, outras características da função endotelial são acometidas como a coagulação e, resposta inflamatória em doenças como a HAS, diabetes, aterosclerose e insuficiência cardíaca (KOJDA et al., 1999; SU, 2015). Nesse sentido, o estresse oxidativo tem um importante papel na disfunção endotelial, pois o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) derivado da NADPH oxidase e, da xantina oxidase (XO) reduz a os níveis de NO formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (LANDMESSER et al., 2002).

A descoberta da existência do NO endógeno foi fruto da realização de inúmeros estudos fisiológicos sobre a função normal da musculatura vascular lisa (IGNARRO, 1989). Esses estudos tiveram início com Furchgott e Zawadski em 1980, quando avaliavam os efeitos de drogas vasoativas sobre os vasos sanguíneos. Eles observavam que a mesma droga que algumas vezes produzia uma dilatação do vaso, outras vezes não apresentava o mesmo efeito. Eles sugeriram que essa variação pudesse ser dependente da integridade das células que circundavam o vaso sanguíneo. Em 1980, eles demonstraram, experimentalmente, que a acetilcolina dilata os vasos sanguíneos, somente se o endotélio estiver intacto (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980). Assim, concluíram que os vasos sanguíneos se dilatam porque as células endoteliais produzem uma substância sinalizadora que faz a musculatura vascular lisa relaxar.

Nesse contexto, essa substância foi denominada então de fator relaxador derivado do endotélio (EDRF). Hoje sabe-se que o endotélio regula o tônus vascular através da produção de diversos mediadores, como prostaglandinas e endotelina, os quais agem na musculatura vascular lisa, além do EDRF (SU, 2015). Essas substâncias atuam como sinalizadores intracelulares entre o endotélio e a musculatura vascular lisa modulando a vasoconstrição ou a vasodilatação (SU, 2015).

Além de responder a estímulos farmacológicos, o NO mostrou-se ser produzido constantemente respondendo a vários estímulos fisiológicos, incluindo variações no fluxo pulsátil e hipóxia (CARDOSO et al., 2013; MARSH et al., 2015). Diminuições da produção basal de NO podem causar aumento na resistência vascular periférica sistêmica e alguns investigadores têm sugerido que a hipertensão arterial essencial possa ser decorrente de uma diminuição da liberação ou do efeito do NO sobre sistema vascular (SU, 2015; ZHAO et al., 2015). Em casos de infecções, células imunológicas como os macrófagos, por exemplo, que liberam uma quantidade enorme de NO, o qual é extremamente tóxico para bactérias e parasitas invasores.

Figura 2 – Efeitos fisiológicos do NO no sistema vascular



Fonte: Adaptado de Herrmann; Lerman (2010).

A HAS também afeta diversos órgãos-alvo como rins, cérebro e coração (STECKELINGS et al., 2011). Nesse sentido, o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) exerce um papel importante na homeostase cardiovascular (AHMADIAM et al., 2015). O SRAA é importante na regulação da PA, pois promove o aumento da volemia através da retenção renal de sódio e H<sub>2</sub>O, aumentando a PA em decorrência da perda da perfusão renal (AHMADIAM et al., 2015). Sendo assim, a renina é uma enzima produzida no rim que metaboliza angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I), que é convertida em Ang II pela ECA (WANG et al., 2013).

Ang II, o principal peptídeo efetor do SRAA, atua através de seus receptores, principalmente receptor AT1 (AT1) e o receptor AT2 (AT2) (BADER, 2010). Entretanto, a maioria dos efeitos cardiovasculares da Ang II estão relacionados a ação do AT 1, que induz a vasoconstrição, hipertrofia celular vascular, hiperplasia e retenção de sódio (BADER, 2010). A estimulação de receptores AT1 pode resultar na formação das espécies reativas de oxigênio (EROS), com efeitos inflamatórios e trombóticos (WELCH, 2008; SCHMIEDER et al., 2007).

Estudos anteriores demonstraram que a Ang II produzido pelos tecidos vasculares aumenta a geração de EROS, através da estimulação da síntese de vários fatores via indução da ANG II, via receptor de angiotensina 1 (AT1), levando a produção de mediadores inflamatórios de proliferação/migração de células vasculares, resultando na vasoconstrição vascular (WANG et al., 2013; SKORSKA et al., 2015). Estas EROS podem oxidar biomoléculas celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, que causam oxidação de fosfolipídios de membrana resultantes nas lesões em células cardíacas e endoteliais (WANG et al., 2012). Além disso, Ang II estimula a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNS), resultando na diminuição dos níveis de NO causando distúrbios na PA (AKAZAWA et al., 2013).

O estresse oxidativo é um fenômeno biológico caracterizado pelo aumento da produção das EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (MARCHESI et al., 2008). As EROS e os radicais livres (oxidantes) são mediadores de várias formas de danos nos tecidos e, estão presentes nas lesões isquêmicas e respostas inflamatórias (PARAVICINI et al., 2008; MARCHESI et al., 2008). Nesse sentido, o estresse oxidativo induz à respostas celulares características da HAS, tais como hipertrofia celular, expressão de genes e morte celular, alterações no turnover protéico e na matriz extracelular (DOUGLAS et al., 2011). Tais modificações podem

estar relacionadas à remodelação ventricular que produz tensão e inflamação na parede vascular, com liberação de hormônios como catecolaminas e angiotensina (DOUGLAS et al., 2011).

O NO é potencialmente tóxico e a sua toxicidade está relacionada ao estresse oxidativo, onde há um aumento na produção de EROS, sem o aumento equivalente da resposta antioxidante. Nitritos e nitratos são considerados metabólitos da produção de NO e, são moléculas endócrinas que são transportadas no sangue, acumulam-se nos tecidos e têm potencial para serem reconvertidas a NO sob condições fisiológicas e patológicas (JENSEN, 2009; KIM-SHAPIRO et al., 2006).

Diante do aumento do EO há um aumento das defesas antioxidantes na tentativa de recuperar o balanço oxidativo celular e compensar o excesso de radicais livres lançados na circulação sanguínea (TSUTSUI et al., 2011). Sendo assim, para avaliar o dano oxidativo em determinadas biomoléculas existem algumas análises como a produção de EROS, a determinação do produto final da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA (CARDOSO et al., 2012). Por outro lado, a determinação do EO pode ser avaliada através de alterações no sistema antioxidante como realizado através das análises de níveis de tiois totais (NPSH), de vitamina C (VIT C), de vitamina E (VIT E) e, atividade das enzimas catalase (CAT) e, superóxido dismutase (SOD) (CARDOSO et al., 2012).

O malondialdeído (MDA) é um biomarcador importante na avaliação do estresse oxidativo e, pode ser produzido em valores reduzidos como resultado de um metabolismo normal ou, em altos níveis em doenças e ou distúrbios metabólicos (DALLE-DONNE et al., 2006; SCHMATZ et al., 2013). Além disso, outras moléculas biológicas podem sofrer o EO nas células, como as proteínas, pois suas cadeias laterais podem ser carboniladas por compostos reativos (DALLE-DONNE et al., 2006). Sendo assim, o EO induz a peroxidação de lípidios das membranas e à perda da integridade da membrana, o que resulta em necrose e morte celular. Este dano na proteína total pode contribuir para o desenvolvimento de lesões no endotélio vascular e no miocárdio (DALLE-DONNE et al., 2006; HARRISON et al., 2007).

Nesse sentido, o sistema antioxidante funciona através da atividade da SOD que catalisa a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ . Conseqüentemente, o  $H_2O_2$  é reduzido a  $H_2O$  e  $O_2$  por peroxidases tais como a glutathiona peroxidase (GSPx) e a CAT (HALLIWELL et al., 1999; DALLE-DONNE et al., 2006). Desta forma, baixas concentrações de ON somado ao aumento do estresse oxidativo, induz a redução

do mecanismo de vasodilatação vascular, podendo aumentar a PA, através do aumento da resistência vascular periférica, evidenciando assim a relação entre o estresse oxidativo e a HAS (BHATT et al., 2014; SCHULZ et al., 2008).

Somado ao sistema antioxidante, as plaquetas possuem importante função na homeostase vascular, regulando processos tromboembólicos através da liberação de substâncias vasoativas, como os nucleotídeos de adenina (ADP e ATP) (MARCUS et al., 2003). As plaquetas são corpúsculos anucleados no sangue que atuam na adesão, agregação e a secreção de substâncias contidas nos grânulos citoplasmáticos. Em condições fisiológicas elas encontram-se inativas (EVERTS et al., 2006; GACHET, 2006). Entretanto, quando ocorre uma lesão vascular, as plaquetas são ativadas e, reduzem o processo hemorrágico. Sendo assim, as plaquetas ativadas, modificam seu formato discóide para irregular e, induzindo a agregação plaquetária e, conseqüentemente liberam grânulos, para reparar o tecido vascular lesionado (EVERTS et al., 2006; GACHET, 2006).

O sistema purinérgico possui uma importante função vascular, que pode estar comprometida em doenças cardiovasculares como a HAS (BURNOSTOCK et al., 2004; CARDOSO et al., 2012). Essa sinalização envolve os seus 3 principais constituintes: os nucleotídeos de adenina e o seu nucleosídeo correspondente, bem como os receptores onde eles exercem suas funções e, as ectoenzimas responsáveis pela hidrólise, controlam os níveis extracelulares destas moléculas (ATKINSON et al., 2006). Os nucleosídeos são moléculas o resultado da união de uma base púrica ou pirimídica a uma pentose. Sendo assim, a guanosina, a timina, a inosina e adenosina, são exemplos de nucleosídeos. Os nucleotídeos, por sua vez, são formados através da fosforilação realizadas por quinases específicas. Os principais nucleotídeos envolvidos nos processos biológicos são o ATP, ADP e AMP (ATKINSON et al., 2006). Os nucleotídeos extracelulares de adenina (ATP e ADP) e o seu nucleosídeo correspondente (adenosina) modulam o sistema vascular principalmente através da agregação plaquetária, tônus vascular e, funções cardiovasculares (YEGUTIN, 2008; CARDOSO et al., 2013).

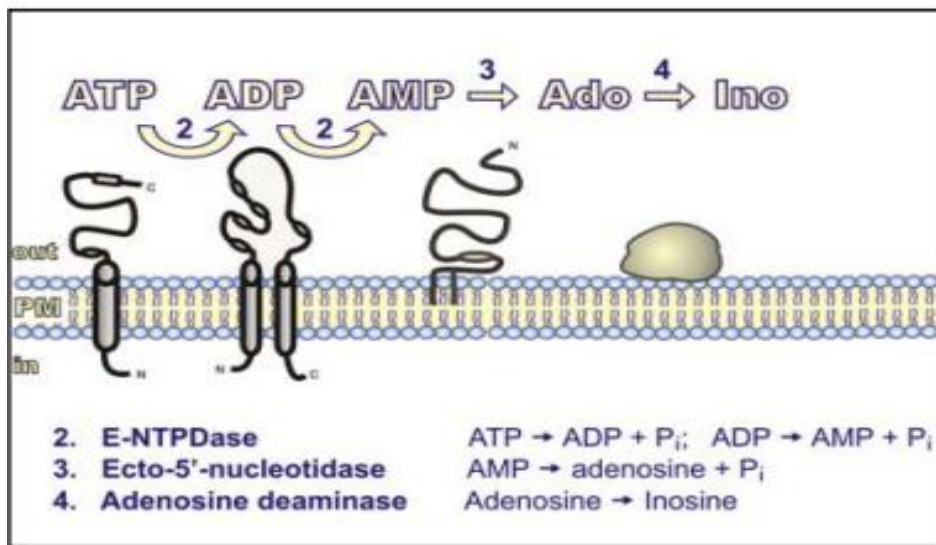
A concentração extracelular dessas moléculas varia conforme a sua quantidade liberada, dispositivos de captação, situações de lise celular e hidrólise pelas ectoenzimas (RATHBONE et al., 1999). Sendo assim, o ATP é considerado um inibidor dos efeitos induzidos pelo ADP. Conseqüentemente, o ADP pode induzir a agregação plaquetária e, enquanto que o ATP estimula a agregação plaquetária

em baixas concentrações, e inibe essa condição vascular em altas concentrações (CARDOSO et al., 2012).

A adenosina, produto da hidrólise do AMP, é importante para a homeostase cardiovascular, pois além de inibir a formação de trombos sobre a ativação descontrolada das plaquetas, exerce função vasodilatadora importante no sistema cardiovascular (DUNWIDDIE & MASINO; ZIMMERMANN et al., 2001). A adenosina possui uma função cardioprotetora, através da inibição da agregação plaquetária na HAS e na aterosclerose, induzindo a vasodilatação e redução da PA (SATO et al., 2005; LAYLAND et al., 2014). Essa molécula sinalizadora extracelular possui propriedades antitrombóticas e antiinflamatórias na maioria dos leitos vasculares e, conseqüentemente, tem ação hipotensora com redução da freqüência cardíaca. Tais propriedades são algumas das razões pelas quais a adenosina tem efeitos benéficos na maior parte dos tecidos biológicos (LAYLAND et al., 2014).

A regulação dos níveis extracelulares desses nucleotídeos é realizada por importantes enzimas do sistema purinérgico, denominadas ectonucleotidases. A ecto-NTPDase (NTPDase) hidrolisa o ATP e ADP para AMP, exercendo importante função na regulação do fluxo sanguíneo através da regulação do catabolismo do ADP (MARCUS, 2003). Após, a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa o AMP formando a adenosina, que é desaminada através da ação da enzima adenosina desaminase (ADA), gerando inosina (ZIMMERMANN et al., 2007; YEGUTKIN, 2008). Essa etapa inicial da sinalização purinérgica é importante, pois a adenosina, produto final dessa hidrólise, atua no aumento da circulação sanguínea e, inibe possíveis processos tromboembólicos decorrentes da agregação plaquetária (CARDOSO et al., 2013; SCHMATZ et al., 2013). Dessa forma, essas ectoenzimas são importantes na sinalização do sistema vascular através da regulação dos níveis das substâncias vasoativas como ATP e ADP (YEGUTKIN, 2008). Uma representação destas enzimas e substratos formados podem ser visualizadas na Figura 3.

Figura 3 – Enzimas envolvidas na degradação dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina



Fonte: Adaptado de Yegutin (2008).

Investigações recentes têm destacado a importância do exercício físico na HAS (CORNELISSEN et al., 2011; CARDOSO et al., 2013). Nesse contexto, os benefícios do exercício físico (EF) parecem estar relacionados ao aumento da função diastólica cardíaca, da função endotelial, da capacidade oxidativa do músculo esquelético, do tônus vagal cardíaco, da fração de ejeção, do débito cardíaco, de enzimas do sistema antioxidante. Em contrapartida há uma diminuição das citocinas inflamatórias, entre outras alterações metabólicas e cardiovasculares em indivíduos com HAS (CARDOSO et al., 2013). Entretanto, essas modificações são atreladas principalmente ao treinamento aeróbico. Nesse sentido, este tipo de treinamento pode promover a liberação de substâncias vasoativas na circulação sistêmica, favorecendo a perfusão tecidual, diminuição da resistência vascular periférica (SUDANO et al., 2011). Essa modalidade de treinamento também é indicada na reabilitação cardíaca, objetivando a estabilização da placa aterosclerótica, modulação do perfil lipídico e da pressão arterial (ACCF/AHA/ACP, 2009).

Os efeitos do exercício físico sobre a modulação do EO têm sido reportados em alguns estudos (CARDOSO et al., 2012; YUNG et al., 2009), principalmente associadas a mudanças nos níveis de colesterol, no sistema antioxidante, na PA, na adipogênese e inflamação. Inúmeros fatores têm sido implicados, em que exercício físico induz ações cardiovasculares protetoras, incluindo diminuição da atividade simpática, redução dos níveis de ANG II níveis, o aumento da produção de NO, o



aumento da capacidade antioxidante, a modulação dos canais de  $K^+$ , e expressão de fatores de cardioprotetores, como a apelina (YUNG et al., 2009). Além disso, estudos evidenciam que o exercício físico é uma intervenção não medicamentosa que pode reduzir o EO, que está associado com a inflamação e com a HAS (SCHIFFRIN et al., 2004).

O exercício físico previne o surgimento da aterosclerose, porém pode também induzir o estresse oxidativo, como um resultado da ineficiência da cadeia respiratória mitocondrial e, conseqüentemente aumentando a tensão de cisalhamento de fluido no endotélio (YUNG et al., 2009). Entretanto, estudos mostraram que a exposição crônica ao estresse oxidativo, decorrentes do exercício físico de leve e moderada intensidade, pode estimular os processos de adaptação para reduzir o EO, diminuindo a produção do  $O_2^{\cdot-}$ , aumentando a atividade das enzimas antioxidantes e a produção de NO, melhorando as respostas vasodilatadoras decorrentes do exercício (YUNG et al., 2009).

Diante disso, tem sido reportado que a sinalização mediada pelas EROS pode induzir a um aumento da atividade antioxidante e, a reparação de danos enzimáticos (RADAK et al., 2005). Em conseqüência, estes processos adaptativos podem resultar em níveis basais mais baixos de EROS e uma redução em dano oxidativo durante o exercício (RADAK et al., 2005). De acordo com a hipótese a formação das EROS podem estar envolvidos na adaptação ao exercício, pois foi observado que a suplementação antioxidante reduz a biogênese mitocondrial em ratos treinados (GOMEZ-CABRERA et al., 2008), impedindo a adaptação induzida por exercício no músculo esquelético de ratos (GOMEZ-CABRERA et al., 2005).

O treinamento resistido (TR), conhecido como musculação, é amplamente praticado em academias no Brasil e no mundo, caracterizado pela execução de alguns exercícios contra determinada resistência, durante um curto período de tempo, praticado principalmente em intensidade moderada ou alta, sem a utilização de oxigênio como principal substrato energético (GOMES et al., 2012). Conseqüentemente, o TR aumenta a força muscular, resistência muscular, a capacidade funcional, reduzindo possíveis morbimortalidades nas pessoas sem ou com DCVs (WILLIAMS et al., 2007). Estes benefícios estão relacionados a melhor perfusão sanguínea periférica, que é caracterizado como um mecanismo compensatório do sistema cardiovascular frente ao aumento do débito cardíaco (DC) mediante ao trabalho muscular durante o exercício físico (WILSON et al., 1998).

Neste contexto, nos últimos anos algumas sociedades médicas nacionais e internacionais, introduziram o TR como intervenção não medicamentosa, em conjunto com o treinamento aeróbico, no tratamento da HAS. Alguns estudos vêm demonstrando reduções na PA em indivíduos hipertensos através do TR (QUEIROZ et al., 2015; QUEIROZ et al., 2013). Sendo assim efeito observado é hipotensão pós-exercício (HPE), caracterizado pela diminuição dos níveis pressóricos após uma e, algumas sessões de TR. Contudo, existem algumas divergências quanto a prescrição da intensidade adequada e segura para esta população (QUEIROZ et al., 2015).

Tabela 2 – Estudos sobre o sistema purinérgico e a HAS em modelos animais (ratos)

<b>Estudos</b>	<b>Furstenau, C.B. et al., 2008</b>	<b>Furstenau, C.B. et al., 2010</b>	<b>Cardoso, A.M et al.,2012</b>	<b>Akinyemi, A.J.et., 2014</b>
<b>Indução da HAS</b>	30mg/kg/dia L-NAME	30mg/kg/dia L-NAME	30mg/kg/dia L-NAME	30mg/kg/dia L-NAME
<b>Tratamento</b>	L-NAME	L-NAME	Exercício físico	Suplementação dietética
<b>Duração</b>	14 dias	14 dias	4 semanas	4 semanas

Por outro lado, são escassos os estudos sobre o exercício físico e sua relação com sistema purinérgico (Tabela 2). Nesse sentido, as evidências sobre os efeitos do TR sobre a atividade das ectonucleotidases e, sua relação com o EO e a HAS não existe na literatura. Somado a isso, há a necessidade de estudos sobre o a intensidade do TR na HAS, pois a prescrição para indivíduos hipertensos é divergente, baseando-se na segurança desses sujeitos e, devido a possíveis elevações da PA que podem ser desencadeadas por este tipo de exercício.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de 4 semanas de duas intensidades de exercício resistido em biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade das ectonucleotidases em plaquetas de ratos hipertensos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar duas diferentes intensidades de treinamento resistido em ratos controles e hipertensos sobre:

- Conteúdo de Nitritos e Nitratos (NOX) em soro;
- Conteúdo de proteína carbonil em soro;
- Níveis de Malondialdeído (MDA) em soro;
- Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em soro;
- Níveis de Glutathione Peroxidase (GPx) em soro;
- Níveis de Glutathione-S-Transferase (GST) em soro;
- Atividade da enzima NTPDase em plaquetas;
- Atividade da enzima 5' nucleotidase em plaquetas;
- Atividade da enzima Adenosina Desaminase (ADA) em plaquetas.

### 3 MANUSCRITO

## HIGH AND LOW INTENSITY RESISTANCE EXERCISES REDUCE OXIDATIVE STRESS AND MODULATE ECTONUCLEOTIDASE ACTIVITIES IN HYPERTENSIVE RATS

Fábio Fernandes Mello<sup>a</sup>, Jessié Martins Gutierrez<sup>a</sup>, Thauan Faccin Lopes<sup>a</sup>, Pauline da Costa<sup>a</sup>, Aline Pereira da Silva<sup>a</sup>, Nathieli Bianchin Bottari<sup>a</sup>, Mariana Sauzen Alves<sup>a</sup>, Vera Maria Morsh<sup>a</sup>, Maria Rosa Chitolina Schetinger<sup>a</sup>

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Campos Universitário, Camobi, 97105-000 Santa Maria, RS, Brazil.

*Maria Rosa Chitolina Schetinger*: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil.

*E-mail address: mariachitolina@gmail.com*

### Abstract

The aim of this study was to analyze the effects of two resistance exercises on oxidative stress and ectonucleotidases activities in hypertensive rats. Sixty male Wistar rats were divided into six groups (n=10): control group, high-intensity exercise (HIE), low-intensity exercise (LIE), the L-NAME, high-intensity exercise plus L-NAME (HIE+L-NAME) and low-intensity exercise plus L-NAME (LIE+L-NAME) groups. Nitrite and nitrate content (NO<sub>x</sub>), carbonyl protein, malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) levels, as well as glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase activities (GST) were evaluated in serum. NTPDase, 5'nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) activities were verified in platelets. Results showed a significant reduction in the NO<sub>x</sub> content in the L-NAME group

compared with the L-NAME group. However, the exercise L-NAME groups showed an increase in the NOx content compared with the control group. A significant increase in MDA levels was observed in the L-NAME group compared with the control and L-NAME exercise groups. The L-NAME group had a significant increase in the hydrolysis of ADP and AMP compared with the control. Nevertheless, significant reductions in ADP and AMP hydrolysis were verified in the L-NAME exercise groups compared with the L-NAME group. Significant increases in the ADA activity in HIE and LIE in the control group were observed as well as an increase in ADA activity in LIE + L-NAME compared with their respective controls. However, a significant reduction in the ADA activity was observed in L-NAME group compared with the control group. Results suggest that HIE and LIE groups may reduce the oxidative stress and regulate ectonucleotidase activity, preventing the deleterious effects caused by hypertension in the cardiovascular system.

**Keywords:** hypertension, oxidative stress, ectoenzymes, physical exercise.

## Introduction

Hypertension is associated to the development of most cardiovascular events, such as stroke and acute myocardial infarction [1]. Projections suggest that by 2025, the hypertension prevalence may result in approximately 1.56 billion of cases worldwide [2]. Hypertension in combination with a sedentary lifestyle constitutes an important risk factor for the development of cardiovascular diseases (CVD) [3]. CVD present changes in their pathophysiological mechanisms such as endothelial function loss, which is characterized mainly by a reduced production of nitric oxide (NO). Impairments in the endothelial function are directly related to the initial stage of atherosclerosis, increased oxidative stress levels and higher blood pressure [4].

In this context, oxidative stress may be a consequence of a decrease in the primary antioxidant defense system or an elevation of reactive oxygen species (ROS) concentration in hypertension [5]. A great number of studies have indicated that superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ),  $H_2O_2$  (hydrogen peroxid), and peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), which are formed in radical-radical coupling reactions, play an important role in the

development of hypertension on vascular tone [5,6,7]. The relationship between rise ROS production and high blood pressure has been explained through the enhanced inactivation of the NO by superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) [5,6]. Under physiological conditions, ROS formation is balanced in the vascular endothelium by oxidant enzymes, while ROS levels are eliminated by antioxidant enzymes [5].

The purinergic signaling may be associated with hypertension, especially in the increased or reduced production of adenine nucleotides, such as ATP, ADP and AMP [8]. In this context, adenosine, which is a nucleoside, has important vasodilator properties such as inhibition of platelet aggregation, prevention of vascular thrombus, as well as reduced blood pressure and heart rate [8]. Extracellular levels of these molecules are controlled by a cascade of enzymes, known as Ecto-Nucleotide triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase; E.C.3.6.1.5;), Ecto-5'-Nucleotidase (E.C.3.1.3.5, 5'NT) and Ecto-Adenosine Deaminase (ADA; E.C.3.5.4.4). These enzymes are important in the regulation of ectoenzyme levels in the vascular system and are involved in some cardiovascular diseases, such as diabetes and hypertension [8,9]. Physical exercises may develop a protective action on the hydrolysis of nucleotides and adenine nucleosides, preventing possible deleterious effects of hypertension [8].

Physical exercise is associated with changes in the antioxidant system, reduced blood pressure, and inflammation in vascular endothelium [5]. More specifically, resistance exercise is associated with an increase in NO production and increase in antioxidant capacity [5,10]. There is some evidence about the possible mechanisms of physical exercise on oxidative stress [5,11]. Initially, resistance exercise induced ROS, and reactive nitric species (RNS) generation was viewed as a detriment to exercise performance because could result in muscle damage, fatigue, impaired muscle force production, and reduced immune system [12,13,14]. The RNS generation is necessary during exercise for the initiation of adaptive processes [15]. Consequently, these adaptive processes may result in lower basal levels of RNS and a reduction in oxidative damage during exercise. However, these benefits appear to be associated mainly to aerobic training [15].

It has been shown that aerobic or resistance exercises, performed regularly, decrease oxidative stress, attenuate lipid peroxidation, and increase antioxidant enzyme [16,17]. The protector effect of physical exercise in hypertension may be explained by a well-adapted antioxidant defense in physically active people [18].

Moreover, aerobic training (AT) may promote the release of vasoactive substances such as NO and bradykinin into the systemic circulation, favoring tissue perfusion and decreasing peripheral vascular resistance [19]. It is noteworthy that in people with or without CVD, resistance training (RT) increases strength and endurance, provides functional capacity, and reduces possible mortality [20].

In this context, few studies have been reported using different training loads, volumes and intensities of resistance exercise in hypertension. Thus, the aim of this study was to compare and analyze the effects of two resistance exercise protocols on oxidative stress biomarkers and ectonucleotidases activities in hypertensive rats.

## **Material and methods**

### *Chemicals*

L-NAME, DNPH, reduced glutathione (GSH), tris (hydroxy-methyl) aminomethane GR, thiobarbituric acid (TBA),  $VCl_3$ , Ficol and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Bovine serum albumin was obtained from Reagent. All the other chemical used in this experiment were of the highest purity. The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine, trizma base, HEPES, and coomassie brilliant blue G were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of purity and of the highest analytical grade.

### *Animals*

Sixty adult male Wistar rats (70 – 90 days; 220 – 300 g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23 °C) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. The Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria approved all animal procedures. All protocols were in accordance with the guidelines of the *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*, based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National

Research Council). All efforts were made to minimize the number of animals used in this study and their suffering.

#### *Induction of hypertension induced by L-NAME*

Rats were randomly divided into six groups: control group (CTRL), high intensity exercise group (HIE), low intensity exercise group (LIE), L-NAME, high intensity exercise plus L-NAME group (HIE+L-NAME), and low intensity exercise plus L-NAME group (LIE +L-NAME). The hypertension was induced by the oral administration of NOS inhibitor (L-NAME). L-NAME administration may be via drinking water, gavage and subcutaneous injection. Gavage administration was chosen to be certain on the dose ingested by rats and to be sure all rats received the same amount of dose. A medium dose was chosen as used by Furstenau, and Cardoso et al [21,5] ( $30 \text{ mg/kg}^{-1}\text{day}^{-1}$ )<sup>10</sup> and at relative medium time.

#### *RT Protocols in experimental groups*

The training was done by climbing stairs [22,23]. Two animals were put on the TR ladder to perform the exercise. The high intensity exercise groups were encouraged to perform 4 sets (80% of body weight) and low intensity exercise groups performed 10 sets (30% of body of weight) on a vertical ladder with weights attached to their tail. Rats performed series of 90 s with 60 s interval. Animals were trained three times a week for four weeks. The intensity of the load was adjusted in accordance with the increase of animal weight in the same initial intensity of both protocols. Adjustments were made every seven days of training in the four groups that performed the exercise.

#### *Blood preparation*

Twenty-four hours after the last treatment, animals were previously anesthetized with isoflurane and then submitted to euthanasia. Isoflurane was administered to animals by closed technique in a dose of 0.5%. Animals were kept in a closed chamber, having an environment saturated with anesthetic for



approximately 2 min. The exact time spent in the chamber depended on the clinical signs of each animal. Immediately after collection, rats were killed by decapitation.

Blood was collected by cardiac puncture in tubes with and without anticoagulant system to determine oxidative stress parameters and to perform biochemical analysis. In tubes without an anticoagulant system, blood was centrifuged at 1.800 g for 10 min, the precipitate was discarded, and the serum was used to determine substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), protein carbonyl.

#### *Nitrite plus nitrate content*

NO content in serum supernatant was estimated in a medium containing 400  $\mu\text{L}$  of 2%  $\text{VCl}_3$  (in 5% HCl), 200 $\mu\text{L}$  of 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediaminedihydrochloride, 200  $\mu\text{L}$  of 2% sulfanilamide (in 5% HCl). After incubating at 37 °C for 60 min, nitrite and nitrate levels, which correspond to an estimative of NO, were determined spectrophotometrically at 570 nm. This method is based on the reduction of nitrate to nitrite by  $\text{VCl}_3$  [24]. Serum nitrite and nitrate levels were expressed as nanomole of  $\text{NO}_x$ /milligram of protein.

#### *Carbonylation of serum protein*

The carbonylation of serum proteins was determined by a modified Levine method [25]. Firstly, 1 ml of serum protein was precipitated using 0.5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) and then centrifuged at 1800 g for 5 min, discarding the supernatant. The amount of 0.5 ml of 10  $\text{mmol}^{-1}$  2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2  $\text{mol}/\text{HCl}^{-1}$  was added to this protein precipitate and incubated at room temperature for 30 min. During incubation, samples were mixed vigorously every 15 min. After incubation, 0.5 ml of 10% TCA was added to the protein precipitate and centrifuged at 1800g for 5 min. After discarding the supernatant, the precipitate was washed twice with 1 ml of ethanol/ethylacetate (1:1), centrifuging out the supernatant in order to remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 ml of protein dissolving solution (2 g sodium dodecyl sulfate and 50 mg EDTA in 100 ml 80  $\text{mmol l}^{-1}$  phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37 °C for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using a spectrophotometer at 370 nm against 2  $\text{mol}$

I<sup>1</sup>HCl. Carbonyl content was calculated by using the molar extinction coefficient ( $0,021 \times 10^{-3} \text{ 1mol}^{-1} \text{ 1cm}^{-1}$ ), and results were expressed as nanomoles of carbonil protein/per milligram protein.

#### *Determination of lipid peroxidation*

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in serum samples according to a modified method of Jentschet et al., (1996). [26]. Briefly, 0.2 ml of serum was added to the reaction mixture containing 1ml of 1% ortho-phosphoric acid and 0.25 ml alkaline solution of thiobarbituric acid (final volume 2.0 ml), followed by 45 min heating at 95 °C. After cooling, samples and standards of malondialdehyde (MDA) were ad at 532 nm against the blank of the standard curve. Results were expressed as nanomoles MDA/per milliliter of serum.

#### *Reactive Oxygen Species (diclorofluoresceine levels)*

Levels as previsioudy described Halliwell and Gutteridge, 2007, of 2'-7'-Dichlorofluorescein (DCFH) were determined as an index of the peroxide production by cellular components. This experimental method of analysis is based on the deacetylation of the probe DCFH-DA, and its subsequent oxidation by reactive species to DCFH, a highly fluorescent compound [27]. The serum was added to a medium containing Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) and DCFH-DA (1 mM). After DCFH-DA addition, the medium was incubated in the dark for 1h until the start of fluorescence measurement procedure (excitation at 488 nm and emission at 525 nm; both slits used were at 1.5 nm). Results were expressed as UDCF/ml of serum).

#### *Glutathione peroxidase (GPx) and Glutathione S-transferase (GST) activities*

GPx activity was determined using glutathione reductase and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm (Paglia et al., 1967) [28]. The enzymatic activity was expressed as  $\eta\text{mol NADH/h/mg}$  of protein. GST activity was assayed spectrophotometrically at 340nm by the method of Habig et al. (1974) [29]. The mixture contained serum as test, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100

mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as  $\eta\text{molCdnb/h/mg}$  of protein.

#### *Platelet preparation*

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al. (2004) [30]. Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160g for 15 min. Next, PRP was centrifuged at 1400 g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0. The washed platelets were resuspended in salina isosmolar buffer and adjusted to 0.4–0.6 mg of protein/mL.

#### *NTPDase and 5'-nucleotidase activity determination*

NTPDase enzymatic assay was performed as described by Lunkes et al. (2004) [30]. For AMP hydrolysis, 5'nucleotidase activity was carried out as previously described by Lunkes et al. (2004) [30], except that the 5 mM  $\text{CaCl}_2$  was replaced by 10mM  $\text{MgCl}_2$ . All samples were performed in triplicate. To each triplicate, two controls without addition of enzyme were carried out to correct non-enzymatic hydrolysis of nucleotides. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) [31]. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

#### *Adenosine deaminase activity (ADA)*

The ADA activity was measured in platelets using the method of Guisti and Galanti (1974) [32]. This method is based on the production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. In brief, 50  $\mu\text{L}$  of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, and was incubated at 37 °C for 60 min. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7 and 0.9 mg/mL. Results were expressed in  $\mu\text{mol Ado/ml}$  of serum. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

### *Protein determination*

Protein content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) [33], using bovine serum albumin as standard.

### *Statistical analysis*

Data are presented as mean  $\pm$  S.E. and were analyzed statistically by Two Way ANOVA, followed by Newman Keuls test. Differences between groups were considered to be significant when  $p > 0.05$ .

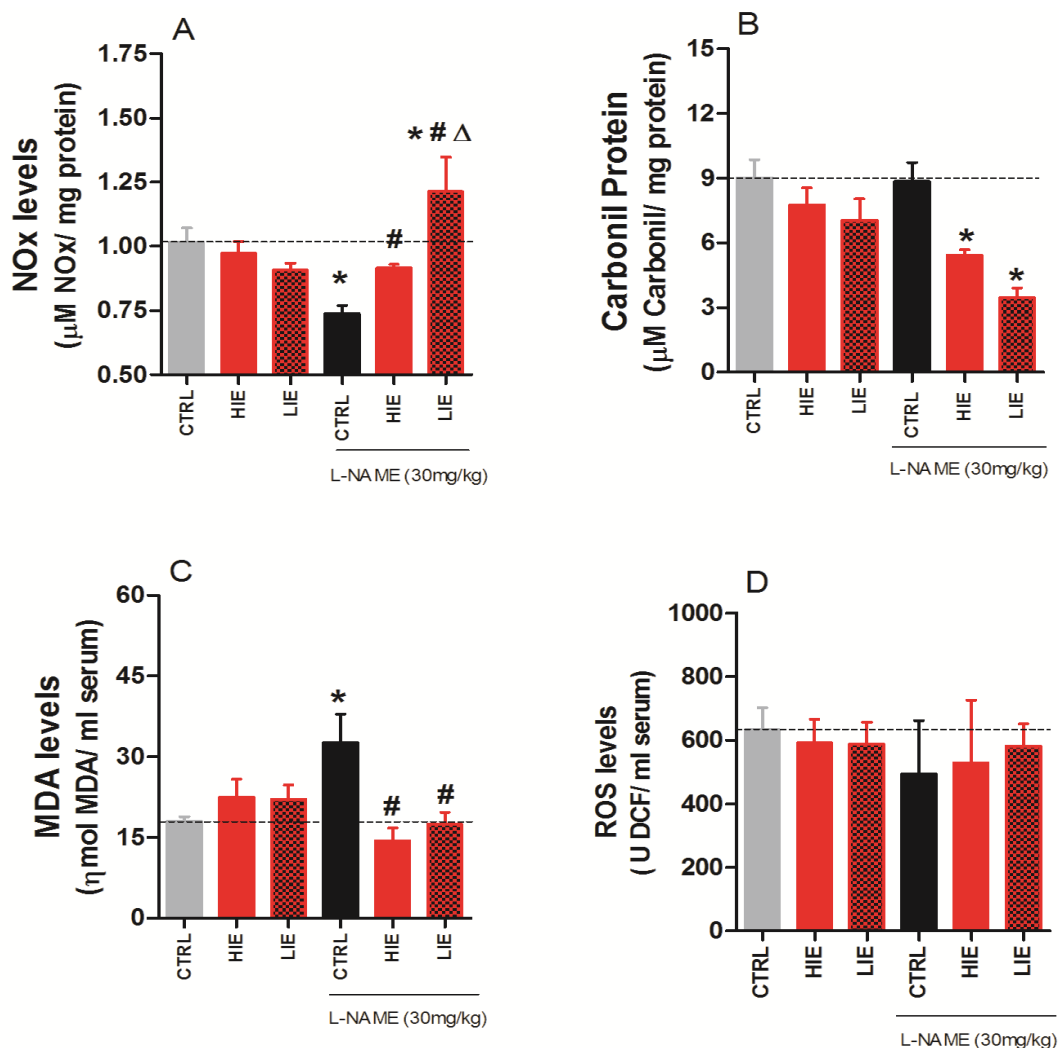
## **Results**

Results obtained for oxidative stress parameters are shown in Figure 1. A significant reduction was found for NO<sub>x</sub> levels in the L-NAME group when compared with the control (Fig A) ( $p < 0.05$ ). However, a significant increase was observed in the NO<sub>x</sub> levels in the LIE+L-NAME group when compared with the control ( $p < 0.05$ ). Increased levels of NO<sub>x</sub> in the HIE+L-NAME and LIE+L-NAME groups were observed when compared with the L-NAME group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, there was a significant increase in NO<sub>x</sub> levels in the LIE+L-NAME group when compared with the HIE+L-NAME group ( $p < 0.05$ ). A significant reduction in the protein oxidation was observed in the HIE+L-NAME group and LIE+L-NAME group when compared with the control and L-NAME group (Fig B) ( $p < 0.05$ ). Values of MDA are shown in Figure C. A rise in the lipid oxidation was observed in the L-NAME group in comparison with the control group. In both LIE+NAME and HIE+L-NAME groups, a significant decrease was found. In addition, no significant differences were observed in ROS levels (Fig D) ( $p < 0.05$ ).

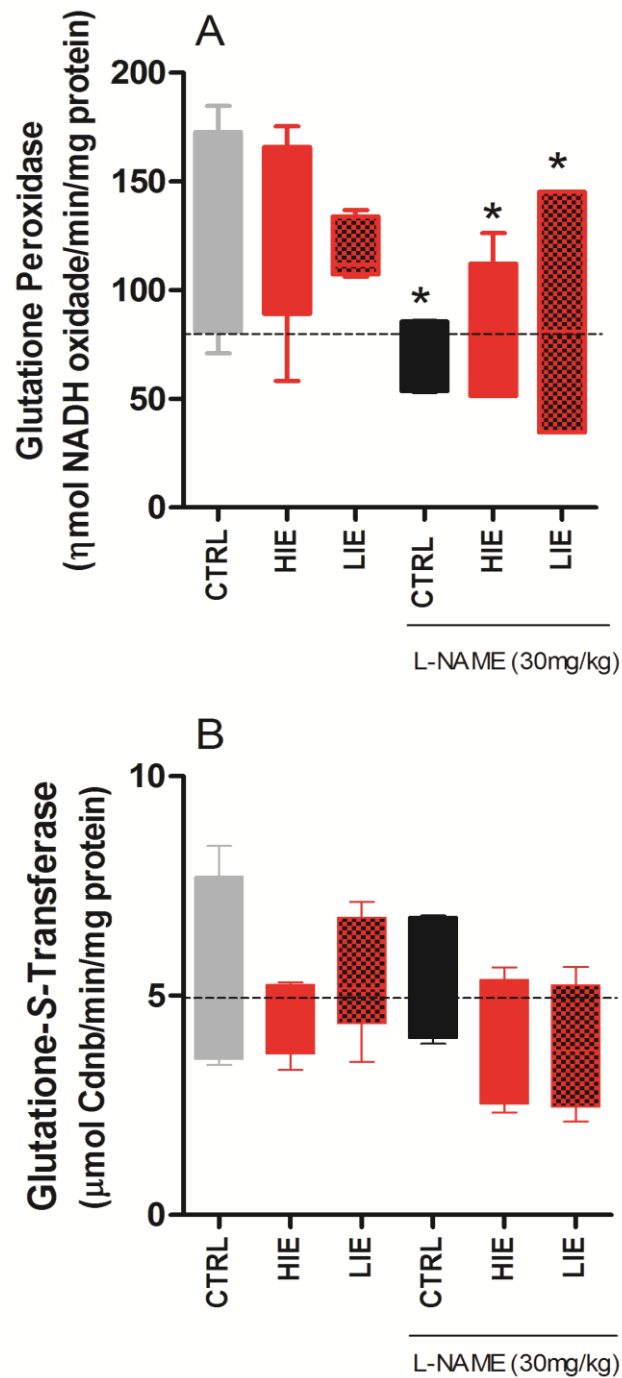
Concerning GPx (Fig 2A), significant reductions in the L-NAME, HIE+L-NAME and LIE+L-NAME groups were found when compared with the control group ( $p < 0.05$ ). No significant differences were observed in GST in comparison control group ( $p < 0.05$ ).

Regarding NTPDase, 5'nucleotidase and ADA activities in platelets are shown in Figure 3. The hydrolysis of ATP was significantly increased in the LIE when compared with the control (Fig A). Significant increases in hydrolysis of ADP and AMP in the L-NAME group were observed when compared with the control group

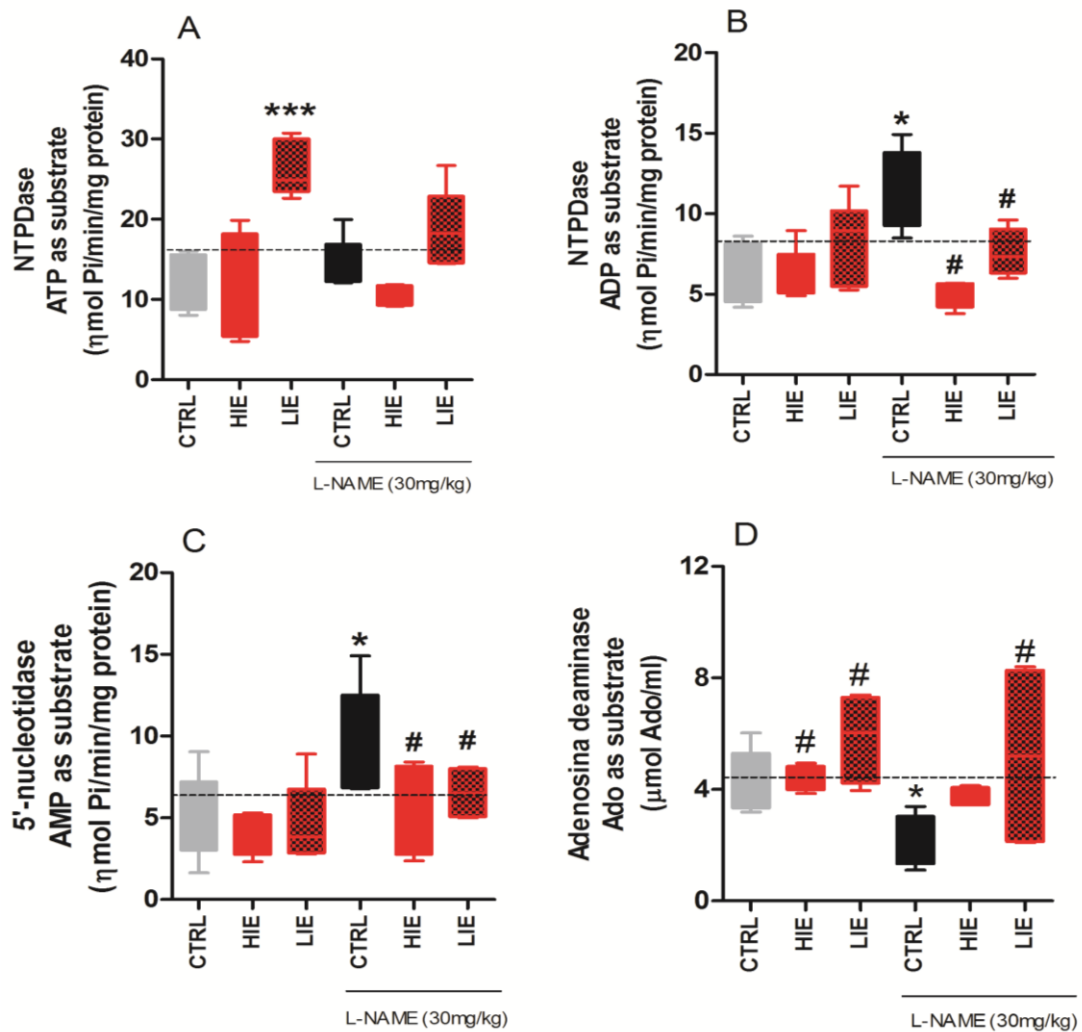
(Fig B and C). However, a significant decrease in ADP and AMP in the LIE+L-NAME group as well as in the HIE+L-NAME group were found when compared with the L-NAME group, respectively. Regarding the ADA activity, a significant increase in the HIE and LIE groups was observed when compared with the control. A reduction in the ADA activity was found in the L-NAME group when compared with the control. Nevertheless, a significant increase in the ADA activity in the LIE+L-NAME group was seen when compared with the L-NAME group.



**Fig 1.A.** Levels of nitrite/nitrate oxide (NOx) in serum of control group, high intensity exercise group (HIE), low intensity exercise group (LIE), L-NAME group (CTRL), high intensity exercise L-NAME group (HIE) and low intensity exercise L-NAME group (LIE). **B.** Protein carbonyl values content in serum of control groups and exercise L-NAME groups. **C.** Levels of malondialdehyde (MDA) in serum of control groups and exercise L-NAME groups. **D.** Levels of reactive oxygen species (ROS) in serum of control groups and exercise L-NAME groups. Data are presented as mean  $\pm$  SE. ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  to each group). ANOVA–Student Newman-Keuls test. Groups with different symbols are statistically different. \*Denotes significant difference when compared with the control group ( $p < 0.05$ ). \*\*\* Highly significant differences when compared with the control group ( $p < .001$ ). #Significant difference in the control group L-NAME group and exercise L-NAME groups. Δ shows significant difference between the exercise L-NAME groups.



**Fig 2.A.** Levels of glutathione peroxidase (GPx) in serum of control group (CTRL), high intensity exercise group (HIE), low intensity exercise group (LIE), L-NAME group (CTRL), high intensity exercise L-NAME group (HIE) and low intensity exercise L-NAME group (LIE). **B.** Levels of glutathione-S-transferase (GST) in serum of control groups and exercise L-NAME groups. Data are presented as mean  $\pm$  SD. ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  to each group). ANOVA–Student Newman-Keuls test. Groups with different symbols are statistically different. \*Denotes significant difference when compared with the control group.



**Fig 3.A.** NTPDase (ATP), **B.** NTPDase (ADP) and **C.** Ecto-5'-nucleotidase (AMP) activities in platelets of control group, high intensity exercise group, low intensity exercise group, control L-NAME group, high intensity exercise L-NAME group and low intensity exercise L-NAME group. **D.** ADA activity in platelets. Data are presented as mean  $\pm$  SE. ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  to each group). ANOVA–Student Newman-Keuls test. Groups with different symbols are statistically different. \*Denotes significant difference when compared with the control group ( $p < 0.05$ ). \*\*\* Highly significant differences when compared with the control group ( $p < .001$ ). #Significant difference in the control group, L-NAME group and exercise L-NAME groups.

## Discussion

It is known that NO has important vasodilator properties that maintain cardiovascular homeostasis [36]. However, NO levels in hypertension is reduced due to increased oxidative stress, increasing the release of free radicals such as NADPH oxidase, which may reduce NO levels in the cardiovascular system. Our results are in agreement with other study [37] that also found lower NOx levels when animals were treated with L-NAME [5,38]. Nevertheless, the increase in NOx levels in high and low intensity exercises, especially in the LIE+ L-NAME group, suggest that these types of exercises may increase NO production by reducing the deleterious effects of hypertension [5]. Moreover, training variables such as time and volume of exercise may induce larger amounts of NO. In this study, we observed that LIE had positive effects on hypertension, since there was an increase in NOx production and a decrease in NO inactivation, leading to an increase in NO bioavailability.

Although there is evidence for the association of high blood pressure with oxidative stress through a possible role of oxidative stress in endothelial dysfunction and pathophysiology of hypertension, the relationship between blood pressure and oxidative stress parameters is still not clear, even less if we compare the resistance and aerobic exercise in the context disease. Results showed a significant reduction in protein carbonyl content and lipid peroxidation (MDA) level in the LIE+L-NAME and HIE+L-NAME groups as, indicating a protective effect of exercise on the decrease of the oxidative stress observed in the hypertensive rats [5].

It has been shown that hypertension is associated with disturbances in glutathione metabolism. According to Chaves et al, (2007), mononuclear cells from hypertensive subjects display significant lower GSH and higher GSSG values than the control group [40]. Furthermore, the enzyme activity involved in the glutathione metabolism is also disturbed in hypertension since a decrease in GR and GPx activities has been reported [40,41]. A reduction in antioxidant enzymes in hypertension has been explained by impaired enzyme expression response and enzyme inactivation in the conditions of oxidative stress [40]. It has been also demonstrated that antihypertensive treatment reduces oxidative stress [42,43], increases GSH level and decreases GSSG, besides enhancing enzymes involved in the glutathione metabolism [40,44]. In the current study, the observed reduction in GPx, an enzyme of the antioxidant system, may be due to the action of other



enzymes such as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), which are initially triggered by the antioxidant system when there is imbalance in the redox state.

Up to the moment, only one study has been found in literature reporting the relationship between ectonucleotidase activities, resistance exercises and hypertension. In the L-NAME groups, HIE and LIE increased the ADA activity in platelets of hypertension rats. These findings in our study regarding the intensity resistance exercise are very important because adenosine level is considered a potent vascular vasodilator, which is mainly associated with aerobic training [45]. Moreover, a decrease in the ADA activity in the hypertensive control group appears to be related to decreased levels of NO, which is also observed in other investigations [35,11]. The increased ADA activity in the LIE groups suggests that resistance exercise at lower intensities may be more effective as vascular vasodilator.

Adenosine has some effects as an extracellular signaling molecule inducing vasodilation in most vascular beds, having antithrombotic properties and reducing blood pressure and heart rate. Our results were similar to those observed by Cardoso et al. (2013), who observed a reduction in ADP and AMP hydrolysis, demonstrating that resistance exercise can also regulate the activities of these nucleotides, thereby reducing the vasoconstriction present in hypertension.

As already reported by Mortensen et al., physical training [46] may reduce the vasodilator response in blood, suggesting that the sensitivity of the P2 purinergic receptors and/or degradation of ATP in plasma changes with the formation in the hypoxic state. Consequently, the release of ATP in erythrocytes is controversial, since ATP controls the blood flow and is sensitive to oxy-hemoglobin, not being sensitive to changes in partial pressure of oxygen ( $PO_2$ ) [47]. However, the inhibition of the production of ATP in erythrocytes by inhalation of carbon monoxide (CO) makes plasma ATP levels not reduce blood flow in response to the increase induced by exercise [48]. These findings suggest that ATP is not responsible for this increase in blood flow as found in our study, indicating that other nucleotides such as ADP, AMP, and adenosine nucleosides may be involved in vascular vasodilatation.

In conclusion, after four weeks testing the low and high-intensity exercise training it was possible to verify a considerable improvement in the oxidative status, reversing the adverse effects of hypertension on the production of nitric oxide

increasing its availability, which may considerably affect the cardiovascular function in hypertension. However, the antihypertensive mechanism of the resistance exercise training is not fully understood. Here, we provide new insight into the enzymatic mechanism by which resistance exercise training is usable to improve the cardiovascular homeostasis mediated by the up-regulation of ectonucleotidases in hypertensive rats.

### References

- [1] Roth GA, Huffman MD, Moran AE, Feigin V, Mensah GA, Naghavi M. Global and Regional Patterns in Cardiovascular Mortality From 1990 to 2013. *Circulation*. 132 (2015) 1667-78.
- [2] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 365 (2005) 217-23.
- [3] Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc*. 2 (2013) 1-9.
- [4] Rush JW, Ford RJ. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. *Clin hemorheol microcirc*. 37 (2007) 185-92.
- [5] Cardoso AM, Martins CC, Fiorin FS, Schmatz R, Abdalla FH, Gutierrez J. et al. Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. *Cell Biochem Func*. 31(2013) 136-151.
- [6] Fukui T.; Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antiox Redox Signal*. 2011;15: 1583-06.
- [7] Zhang C. Effects of interventions on oxidative stress and inflammation of cardiovascular diseases. *World J Cardiol*. 2011; 3(1): 18-24.
- [8] Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D, Schmatz R. et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 371 (2012) 147-56.
- [9] Schmatz R, Pereira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats.
- [10] Nyberg M, Gliemann L, Hellsten Y. Vascular function in health, hypertension, and diabetes: effect of physical activity on skeletal muscle microcirculation. *Scand J Med Sci Sports*. 25 (2015) 60-73.

- [11] Diaz, KM. et al. Oxidative stress response to short duration bout of maximal aerobic exercise in health young adults. *Int J Exerc Sci.* 4 (2011) 247–256.
- [12] Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 88 (2008) 287–332.
- [13] Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med.* 37(2004) 480–487.
- [14] Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88 (2008) 1243–1276.
- [15] Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology.* 6 (2005) 71–75.
- [16] Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, Pouliopoulou S, Fotinakis P, Taxildaris K, Deliconstantinos G. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc.* 36 (2004) 2065-2072.
- [17] Vincent KR, Vincent HK, Braith RW, Lennon SL, Lowenthal DT. Resistance exercise training attenuates exercise-induced lipid peroxidation in the elderly. *Eur J Appl Physiol.* 87 (2002) 416-423.
- [18] Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basílico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improve plasma antioxidant status. *Clin Sci (Lond).* 96 (1999): 381–385.
- [19] Sudano I. et al. Endothelial function and the effects of aldosterone blockade. *Eur Heart J Suppl.* 13 (2011) 21–26.
- [20] Williams MA. et al. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation.* 116 (2007) 572-84.
- [21] Fürstenau CR, Trentin DS, Gossenheimer AN. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol Dis* (2008) 223 – 229.
- [22] Kim JY, Choi MJ, So B, Kim HJ, Seong JK, Song W. The Preventive Effects of 8 Weeks of Resistance Training on Glucose Tolerance and Muscle Fiber Type Composition in Zucker Rats. *Diabetes Metab J.* 39 (2015) 424-33.
- [23] Lee S, Farrar RP. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. *JEP online* 6 (2003) 80-87.
- [24] Miranda KM, Espay MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 5 (2001) 62 – 71.

- [25] Levini RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464 – 478.
- [26] Jentzsch AM. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (1996) 251 – 256.
- [27] Halliwell B; Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press: Oxford, 1999.
- [28] Paglia DE, Valentine WD. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70 (1967) 158-69.
- [29] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol. Chem.* 249 (1974) 7130 – 7139.
- [30] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsh A, Morsh VM, Mazzanti CM, et al. Enzymes that hydrolyzes adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res.* 109 (2003) 189-94.
- [31] Chan K, Delfert D, Junger, KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem.* 157(1986) 375–378.
- [32] Guisti G, Galanti B. Colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 315–323, 1984.
- [33] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [34] Mehta RH, Rathore SS, Radford MJ, Wang Y, Wang Y, Krumholz HM. Acute myocardial infarction in the elderly: differences by age. *J Am Coll Cardiol.* 38 (2001) 736-41.
- [35] Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdall FH, Zanini D, Schmatz, R. et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 371 (2012) 47-56.
- [36] Treuer AV, Gonzales DR. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities (review) *Mol Med Rep.* 11 (2015) 1555-65.
- [37] Fukui T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidant Redox Signaling.* 15 (2011) 1583-06.
- [38] Claudino MA, Franco-Penteado CF, Priviero FB et al. Upregulation of gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase contributes to erectile dysfunction caused by long-term nitric oxide inhibition in rats: reversion by regular physical training. *Urology.* 75 (2010) 961 – 967.

- [39] Ghiasi R, Mohammadi M, Ashrafi Helan J, Jafari Jozani SR, Mohammadi S, Ghiasi A, Naderi R. Influence of two various durations of resistance exercise in the male rat's hearts. *J Cardiovasc Thorac Res.* 7 (2015) 149-53.
- [40] Chaves FJ, Mansego ML, Blesa S, Gonzalez-Albert V, Jimenez J, Tormos MC. et al. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *Am J Hypertens.* 20 ( 2007) 62–69.
- [41] Da Silva AP, Marinho, C., Goncalves MC, Monteiro C, Laires MJ, Falcão, LM et al. Decreased erythrocyte activity of methemoglobin and glutathione reductases may explain age-related high blood pressure. *Rev Port Cardiol.* 29 (2010) 403–412.
- [42] Grossman E. Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care,* 31 (2008) 185–189.
- [43] Apelt J, Bigl M, Wunderlich P, Schliebs R. Aging related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. *Int J Dev Neurosc.* 22 (2004) 475–484.
- [44] Wassmann, S., Wassmann, K., & Nickenig, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertens.* 44 ( 2004) 381–386.
- [45] Layland J, Carrick D, Lee M, Oldroyd K, Berry C. Adenosine: physiology, pharmacology, and clinical applications. *JACC Cardiovasc Interv.* 7 (2014) 581-91.
- [46] Mortensen SP, Nyberg M, Gliemann L, Thaning P, Saltin B, Hellsten Y. Exercise training modulates functional sympatholysis and  $\alpha$  -adrenergic vasoconstrictor responsiveness in hypertensive and normotensive individuals. *J Physiol.* 592 (2014) 3063–73.
- [47] González-Alonso J, Richardson RS, Saltin B. Exercising skeletal muscle blood flow in humans responds to reduction in arterial oxyhaemoglobin, but not to altered free oxygen. *J Physiol.* 530 (2001) 331–41.
- [48] González-Alonso J, Olsen DB, Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ Res* 91 (2002) 1046–55.
- [49] Lamina S, Okoye CG, Hanif SM. Effects of interval exercise training programme on the indices of adiposity and biomarker of inflammation in hypertension: a randomised controlled trial. *Niger Postgrad Med J.* 21 (2014) 136–43.
- [50] Leggio M, Mazza A, Cruciani G et al. Effects of exercise training on systo-diastolic ventricular dysfunction in patients with hypertension: an echocardiographic study with tissue velocity and strain imaging evaluation. *Hypertens Res.* 37 (2014) 649–54.

## 4 CONCLUSÃO

- ✓ A redução significativa no conteúdo de NOx no grupo controle L-NAME evidencia esse distúrbio vascular decorrente da HAS. Porém, o exercício resistido preveniu esse efeito, sugerindo um efeito vasodilatador vascular decorrentes das duas intensidades de treinamento, prevenindo.
- ✓ A redução significativa do conteúdo de proteína carbonil nos grupos exercício de alta e de baixa intensidade L-NAME, evidencia um possível efeito protetor do exercício contra a carbonilção protéica que está associada a HAS.
- ✓ As reduções significativas nos níveis de MDA nos grupos exercício de alta e de baixa intensidade L-NAME, sugerem que estes exercícios podem reverter o dano oxidativo, que é observado no quadro clínico da HAS.
- ✓ A redução significativa na atividade da GPx nos grupos exercício de alta e de baixa intensidade L-NAME, demonstram que essa enzima talvez não seja o principal mecanismo de ação antioxidante desencadeadas por estes dois protocolos de exercício sobre a diminuição do estresse oxidativo relacionado a HAS.
- ✓ Os grupos exercício de alta e baixa intensidade L-NAME reduziram significativamente o aumento das atividades da NTPDase para ADP e, da 5'nucleotidase induzidos pelo L-NAME. Consequentemente a redução da hidrólise desses nucleotídeos podem prevenir distúrbios vasculares importantes como a agregação plaquetária, formação de trombos, entre outras complicações associadas à HAS.
- ✓ .A redução significativa na atividade da ADA no grupo L-NAME pode estar relacionada às respostas cardiovasculares desencadeadas pela HAS, como a diminuição da vasodilatação que pode ser associado à redução da atividade desta ectoenzima. Entretanto, somente o exercício baixa intensidade reverteu essa resposta, aumentando a produção de adenosina extracelular, podendo reduzir essas complicações vasculares relacionados a esta doença.

## REFERÊNCIAS

ACCF/AHA/ACP. Competence and training statement: a curriculum on prevention of cardiovascular disease. **Journal of American College of Cardiology**, v. 54, n. 14, p. 1336-63, 2009.

AHMADIAM, E.; JAFARI, S.; YARIKHOSROUSHAHI, A. Role of angiotensin II in stem cell therapy of cardiac disease. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 4, p. 702-711, 2015.

AKAZAWA et al. Angiotensin II Type 1 and Type 2 receptor-induced cell signaling. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 17, p. 2988-2995, 2013.

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 439-465, 2010.

BHATT, S. R.; LOKHANDWALA, M. F.; BANDAY, A. A. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. **Clinical Experimental Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 367-373, 2014.

BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Advances Immunology**, v. 86, p. 1-41, 2005.

BOMFIM-SILVA, R.; RIOS, D. L. S. Polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina-aldosterona na doença arterial coronariana e na hipertensão arterial sistêmica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 28-40, 2012.

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, A. M. et al. Acute effects of resistance exercise and intermittent intense aerobic exercise on blood cell count and oxidative stress in trained middle-aged women. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 45, n. 12, p. 1172-1182, 2012.

CARDOSO, A. M. et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. **Molecular Cell and Biochemistry**, v. 371, n. 1-2, p. 147-156, 2012.

CHOBANIAN et al. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-1252, 2003.

CORNELISSEN et al. Impact of resistance training on blood pressure and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Hypertension**, v. 58, n. 5, p. 950-958, 2011.

CORNELISSEN, V. A.; SMART, N. A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2013.

DALLE-DONNE et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-23, 2006.

DOUGLAS, B.; SAWYER, M. D. Oxidative stress in heart failure: What are a missing? **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 342, n. 2, p. 120-124, 2011.

DUNWIDDIE, T.; MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31-55, 2001.

EVERTS, P. A. et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. **Growth Factors**, v.24, n. 3, p.165-71, 2006.

FLESCH, M. et al. Plasma lipids and lipoproteins and essential hypertension. **The Clinical Investigator**, v.72, n. 12, p.944-950, 1994.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583- 1606, 2011.

GACHET, C. Regulation of Platelet Functions by P2 Receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.46, p.277-300, 2006.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; DE OLIVEIRA, M. R. Oxidants, antioxidants and the beneficial roles of exercise induced production of reactive species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 756, p. 1-12, 2012.

GOMEZ-CABRERA et al Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **The Journal of Physiology**, v. 567, n. 1, p. 113-120, 2005.



\_\_\_\_\_. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hamperstraining-induced adaptations in endurance performance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 1, p. 142-49, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HACKAM et al. The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 – therapy. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, p. 5, p. 249-258, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERDIGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: Oxford, 1999.

HARRISON et al. Oxidative stress and hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 1, n. 1, p. 30-44, 2007.

HERMANN, J.; LERMAN, L.; LERMAN, A. Simply say yes to NO? Nitric Oxide (NO) sensor-based assessment of coronary endothelial function. **European Heart Journal**, v. 31, n. 23, p. 2834-6, 2010.

HUSAIN et al. Inflammation, oxidative stress and rennin angiotensin system in atherosclerosis. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 209-217, 2015.

\_\_\_\_\_. Chronic alcohol-induced oxidative endothelial injury relates to angiotensin II levels in the rat. **Molecular Cellular and Biochemistry**, v. 307, n. 1-2, p. 51-58, 2008.

\_\_\_\_\_. Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. **American Journal of Nephrology**, v. 29, n. 5, p. 465-472, 2009.

\_\_\_\_\_. Effects of paricalcitol and enalapril on atherosclerotic injury in mouse aortas. **American Journal of Nephrology**, v. 32, n. 4, p. 296-304, 2010.

ISHIZUKA et al. Effect of angiotensin II on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into mesodermal progenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, n. 1, p. 148-155, 2012.

JENSEN, F. B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, n. 7, p. 841-848, 2009.

JENTZSCH et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251-256, 1996.

KAWASHINA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2157-2162, 2000.

KEARNEY et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.

KIM-SHAPIO, D. B.; SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, n. 4, p. 697-705, 2006.

KODJA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 562-71, 1999.

LANDMESSER et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation**, v. 106, n. 24, p. 3073-3078, 2002.

MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 7, p. 367-374, 2008.

MARCUS et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 12, p. 2497-2509, 2003.

MARSCH et al. The effect of prolonged dietary nitrate supplementation on atherosclerosis development. **Atherosclerosis**, v. 245, p. 212-221, 2015.

METHA et al. Acute myocardial infarction in the elderly: differences by age. **Journal of American College and Cardiology**, v. 38, n. 33, p. 736-741, 2001.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, suppl 2, p. 170-180, 2008.

PASCHALIS et al. Beneficial changes in energy expenditure and lipid profile after eccentric exercise in overweight and lean women. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 20, n. 1, p. 103-111, 2010.

QUIMM et al. The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 – therapy. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, n. 5, p. 241-248, 2010.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. **Biogerontology**, v. 6, n. 1, p. 71-75, 2005.

RATHBONE et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 6, p. 663-690, 1999.

ROTH et al. Global and Regional Patterns in Cardiovascular Mortality From 1990 to 2013. **Circulation**, v. 132, n. 17, p. 1667-1678, 2015.

RUSH, J. W.; FORD, R. J. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 37, n. 1-2, p. 185-192, 2007.

SATO et al. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 4, p. 1633-1640, 2005.

SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 2, p. 435-46, 2004.

SCHMATZ et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cellular Biochemistry and Biophysics**, v. 65, n. 2, p. 129-143, 2013.

SCHMIEDER et al. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. **Lancet**, v. 369, p. 1208-1219, 2007.

SCHULZ et al. Nitric oxid, tetrahydrobiopterin, oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 10, n. 6, p. 1115-26, 2008.

SKORSKA et al. The CD4+AT2R+ T-cell subpopulation improves post- infarction remodelling and restores cardiac function. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1975-1985, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **VI Brazilian guidelines on hypertension**, v. 95, suppl. 1, p. 1-51, 2010.

STECKELINGS et al. Non-peptide AT2-receptor agonists. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 187-192, 2011.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 11, p. 719-741, 2015.

SUDANO et al. Endothelial function and the effects of aldosterone blockade. **European Heart Journal**. v. 13, p. 21-26, 2011.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 6, p. 2181-2190, 2011.

UKOH, V. A.; OFOROFUO, I. A. Plasma lipid profiles in Nigerians with normal blood pressure, hypertension and other acquired cardiac conditions. **East African Medical Journal**, v. 84, n. 6, p. 264-270, 2008.

VUADEN et al. Endotoxemia alters nucleotide hydrolysis in platelets of rats. **Platelets**, v. 20, n. 2, p. 83-89, 2009.

WELCH, W. J. Angiotensin II-dependent superoxide: Effects on hypertension and vascular dysfunction. **Hypertension**, v. 52, p. 51-56, 2008.

WILLIAMS et al. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. **Circulation**, v. 116, n. 5, p. 572-584, 2007.

WILSON et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. **Circulation**, v. 97, n. 18, p. 1837-1847, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013. Disponível em [http://www.who.int/gho/map\\_gallery/en/](http://www.who.int/gho/map_gallery/en/). Acessado em janeiro de 2016.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

YUNG et al. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). **Sports Medicine**, v. 39, n. 1, p. 45-63, 2009.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZIEMAN, S. J.; MELENOVSKY, V.; KASS, D. A. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, n. 5, p. 932-943, 2005.

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

ZIMMERMANN et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, n. 2, p. 537-66, 2007.