

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

**Caroline Curry Martins**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE  
ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE  
ADENINA EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2016**

**Caroline Curry Martins**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE  
DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PACIENTES  
COM SÍNDROME METABÓLICA**

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

**Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch  
Coorientadora: Margarete Dulce Bagatini**

**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).

Curry Martins, Caroline  
EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE  
ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE  
ADENINA EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA / Caroline  
Curry Martins.- 2016.  
110 p.; 30 cm

Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch  
Coorientadora: Margarete Dulce Bagatini  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2016

1. Síndrome Metabólica 2. Exercício Físico 3.  
Ectonucleotidases 4. Plaquetas 5. Linfócitos I. Maria  
Melchiors Morsch, Vera II. Dulce Bagatini, Margarete  
III. Título.

Caroline Curry Martins

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE  
DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PACIENTES  
COM SÍNDROME METABÓLICA**

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

Aprovado em 12 de agosto de 2016:



---

**Vera Maria Melchior Morsch, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Margarete Dulce Bagatini, Dr<sup>a</sup> (UFFS)**  
(Coorientadora)



---

**Carina Rodrigues Boeck, Dr<sup>a</sup> (UNIFRA)**



---

**Dáiana Silva de Avila, Dr<sup>a</sup> (UNIPAMPA)**



---

**Ana Flávia Furian, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**



---

**Fábio Vasconcellos Comim, Dr (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Luiz e Marta  
Ao meu esposo Maurício*

*A vocês, meus amores, que em muitos momentos acreditaram mais  
em mim do que eu mesma, que sustentaram comigo cada minuto  
de dificuldade e de alegria,  
dedico este trabalho e todo o meu amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me iluminado ao longo desta jornada, me fazendo confiar no Seu tempo, por me amparar nos momentos difíceis e por me mostrar os caminhos a serem seguidos.

À professora Vera, minha orientadora, por confiar no meu potencial ao longo desses anos, apoiando e incentivando a minha vida acadêmica, assim como a realização deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, incentivos e dedicação a mim concebidos, e acima de tudo por sempre ter sido um ombro amigo nos momentos de aflição. A vocês, Professoras Vera e Rosa, minha eterna gratidão pela oportunidade que me deram de ingressar no seu grupo de pesquisa, do qual tenho imenso orgulho de fazer parte, e por ter tido a chance de evoluir academicamente e pessoalmente ao longo desses anos.

A minha coorientadora, Margarete, a qual me faltam palavras para decifrar todo o meu agradecimento. Minha comadre, minha amiga, tenho um imenso orgulho de ter tido a minha vida acadêmica guiada por uma pessoa tão especial como você. Muitíssimo obrigada pela sua dedicação sem fim, por todos os ensinamentos, pelo apoio, pela paciência e por todo o carinho a mim concedidos. Obrigada por, em muitos momentos, ter acreditado mais em mim do que eu mesma e por toda a confiança em mim depositada. Quero que saibas que serei eternamente grata por tudo e sempre estarei à disposição para retribuir todo esse carinho!

Ao meu esposo Maurício, obrigada por todo o apoio recebido ao longo desses anos. Obrigada por ter estado do meu lado, por ter me sustentado nos momentos de insucesso, por ter acreditado que eu chegaria ao final e por ter me incentivado nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Luiz e Marta, por todo o amor, carinho e dedicação em mim depositados. A compreensão e o apoio recebidos de vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço infinitamente pela educação a mim concedida e por acreditarem na minha caminhada, incentivando e acompanhando meus passos. Obrigada por apoiarem as minhas escolhas e por serem a melhor família que eu poderia ter. Amo muito todos vocês!

Aos membros da banca examinadora dessa tese, professoras Carina, Daiana, Ana Flávia e professor Fábio, pela disponibilidade em avaliar esse trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o aprimoramento do mesmo.

A minha amiga e dinda Déia, por todo o companheirismo, pela parceria, pelas palavras de conforto e por todos os conselhos, minha eterna amizade e gratidão.

A Diéssica, minha amiga e companheira de experimentos. Obrigada por toda a tua dedicação e parceria ao longo da realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas que fazem ou que já fizeram parte do laboratório Enzitox, Dani, Juci, Robi, Fátima, Aline M., Naia, Carla, Gustavo, Jessié, Luana, Karine, Taís, Aline P., Juliano, Pauline, Lisi, Luciane, Victor, Fabiano, Nathi, Fábio, Ani, Karen, Eduardo, Marília... pela amizade e por todo o companheirismo durante a realização deste trabalho. Vocês são parte da minha história e agradeço a todos, de coração, por todos os momentos compartilhados. Muitíssimo obrigada!

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

A professora Daniela Lopes dos Santos e ao professor Félix Antunes Soares e aos seus grupos de pesquisa, pela colaboração e parceria na realização deste trabalho.

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

Aos amigos Cindi, Carlos, Lali, Djone, Kim, Mussa, Jé e Rafinha, que sempre estiveram presentes durante esta caminhada, me apoiando e me proporcionando momentos de felicidade.

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

***“Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.”***

Clarice Lispector



# RESUMO

## Tese de Doutorado

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

### EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS QUE DEGRADAM NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

AUTORA: Caroline Curry Martins

ORIENTADORA: Vera Maria Melchiors Morsch

COORIENTADORA: Margarete Dulce Bagatini

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 12 de agosto de 2016.

A síndrome metabólica (SMet) é uma condição caracterizada pela presença de múltiplos fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, hiperglicemia, dislipidemia e obesidade abdominal. A associação desses fatores propicia condições pró-trombóticas e pró-inflamatórias, as quais contribuem para o processo da aterosclerose. A agregação plaquetária e a resposta imune-inflamatória são reguladas por diversos mecanismos, incluindo a sinalização purinérgica via nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo de adenina extracelulares. Os níveis extracelulares destas moléculas são controlados por enzimas como as E-NTPDases (Ecto-nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolases), E-NPPs (Ecto-Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases), E-5'-nucleotidase e a ADA (Adenosina Desaminase). Estudos têm demonstrado que o treinamento físico favorece a produção de adenosina e controla os níveis de ATP e de ADP, diminuindo os efeitos danosos sobre o sistema cardiovascular. Comparativamente, tem sido observado uma série de ações benéficas e de efeitos cardioprotetores do exercício físico na SMet. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da prática regular de exercícios físicos sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas e linfócitos, bem como sobre a agregação plaquetária e marcadores inflamatórios de pacientes com SMet. Esses parâmetros foram avaliados em pacientes com SMet (n=38) no momento do diagnóstico e após um plano de 30 semanas de exercícios físicos do tipo concorrente, praticado 3 vezes por semana. Todos os parâmetros também foram avaliados em um grupo de indivíduos saudáveis (n=30) sem intervenção física. Os resultados obtidos demonstraram significativo aumento na atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP e E-5'-nucleotidase, e diminuição na atividade da enzima ADA em plaquetas de pacientes com SMet, acompanhado de um aumento na agregação plaquetária. Semelhantemente, em linfócitos a atividade da E-NTPDase se mostrou aumentada e a atividade da enzima ADA diminuída, concomitante à elevação nos níveis dos marcadores inflamatórios na SMet. Por outro lado, a prática regular de exercícios físicos foi capaz de reverter essas alterações ao final das 30 semanas de treinamento, retornando as atividades enzimáticas para o nível basal ou próximo a ele tanto em plaquetas quanto em linfócitos. Da mesma forma, a agregação plaquetária, os marcadores inflamatórios e os parâmetros antropométricos e bioquímicos também retornaram aos níveis normais após as 30 semanas de intervenção. Após 15 semanas de treinamento físico foi observado uma melhora nas atividades enzimáticas em linfócitos e nos parâmetros bioquímicos e inflamatórios dos pacientes com SMet, porém os resultados não chegaram a atingir os níveis basais. Assim, os resultados descritos aqui sugerem que as enzimas do sistema purinérgico tenham significativas funções na SMet, com efeitos cardioprotetores e participação no controle do desequilíbrio metabólico; e suas dosagens poderiam servir como parâmetros inflamatórios, trombóticos e metabólicos. Já a prática regular de exercício físico desempenha importantes funções de regulação metabólica e efeitos anti-trombóticos e anti-inflamatórios, modulando, assim, a atividade das enzimas do sistema purinérgico na SMet. Conclui-se também que a prática regular e a longo prazo é essencial para a obtenção dos efeitos benéficos do exercício na condição da SMet.

**Palavras-chave:** Síndrome Metabólica. Ectonucleotidases. Exercício Físico. Plaquetas. Linfócitos. Agregação Plaquetária. Inflamação.

# ABSTRACT

## Doctoral Thesis

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

### EFFECTS OF THE EXERCISE TRAINING ON THE ACTIVITIES OF ENZYMES THAT DEGRATE ADENINE NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

AUTOR: Caroline Curry Martins

ADVISOR: Vera Maria Melchioris Morsch

CO-ADVISOR: Margarete Dulce Bagatini

Place and Date of the Defense: Santa Maria, August 12<sup>th</sup>, 2016.

Metabolic syndrome (MetS) is a condition characterized by the presence of multiple cardiovascular risk factors such as hypertension, hyperglycemia, hyperlipidemia and abdominal obesity. The association of these factors provides pro-thrombotic and pro-inflammatory conditions, which contribute to the atherosclerosis process. Platelet aggregation and the immune-inflammatory response are governed by several mechanisms, including the purinergic signaling way extracellular adenine nucleotides (ATP, ADP, and AMP) and nucleoside. Extracellular levels of these molecules and the consequent control of purinergic signaling induced by them is performed by enzymes such as E-NTPDases (Ecto-nucleotide Triphosphate Diphosphatases), E-NPPs (Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterases), E-5'-nucleotidase and ADA (Adenosine Deaminase). Studies have shown that exercise training promotes the production of adenosine and controls the ATP and ADP levels, decreasing the harmful effects on the cardiovascular system. By comparison, it has been observed a series of beneficial actions and cardioprotective effects of exercise training on MetS. In this context, the aim of this study was to verify the effect of the regular practice of physical exercise on the activity of the purinergic enzymes in platelets and lymphocytes, as well as on platelet aggregation and inflammatory markers of the MetS patients. These parameters were evaluated in MetS patients (n = 38) at the time of diagnosis and after 30 weeks of a concurrent physical exercises plan, practiced 3 times a week. All parameters were also measured in a group of healthy subjects (n = 30) without exercise intervention. The obtained results demonstrated significant increase in the activity of the E-NTPDase, E-NPP and E-5'-nucleotidase enzymes, and decrease in the activity of the ADA enzyme in platelets of MetS patients, accompanied by an increase in platelet aggregation. Similarly, in lymphocytes, the E-NTPDase activity was increased and ADA activity was diminished, concomitant to an elevation in the levels of inflammatory markers in MetS group. On the other hand, the regular practice of exercise training was able to revert these changes at the end of the 30-weeks of training, returning the enzymatic activities to the basal level or close to it in both platelets and lymphocytes. Similarly, platelet aggregation, inflammatory markers and the anthropometric and biochemical parameters also returned to normal levels after the 30 weeks. After 15 weeks of the exercise training it was observed an improvement in the enzymatic activities in lymphocytes and in biochemical and inflammatory parameters of MetS patients, but the results did not reach basal levels. Thus, the results described here suggest that the purinergic enzymes have significant functions in SMet, with cardioprotective effects and participation in the control of metabolic imbalance; and their measure could serve as inflammatory, thrombotic and metabolic markers. Additionally, the regular exercise training plays important roles of metabolic regulation and anti-trombóticos and anti-inflammatory effects by modulating the activity of enzymes of the purinergic system in MetS. It is also concluded that the long-term and regular practice are essential to obtain the beneficial effects of exercise training on the MetS condition.

**Keywords:** Metabolic Syndrome. Ectonucleotidases. Exercise Training. Platelets. Lymphocytes. Platelet Aggregation. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

<b>Quadro 1</b> – Definições da síndrome metabólica de acordo com as três principais organizações internacionais.....	18
<b>Figura 1</b> – Esquema representativo das alterações lipídicas durante a SMet.....	23
<b>Figura 2</b> – Mecanismos potenciais ligando a obesidade visceral, a qual caracteriza a SMet, inflamação e a doença vascular aterotrombótica.....	29
<b>Figura 3</b> – Receptores purinérgicos e seus agonistas.....	31
<b>Figura 4</b> – Sinalização purinérgica na membrana celular.....	33
<b>Figura 5</b> – Membros da Família das E-NTPDases.....	34

### ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

<b>Figure 1</b> - E-NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrates and ADA activity (C) using adenosine as substrate in lymphocytes of control and MetS before and after exercise interventions.....	85
--	----

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO PUBLICADO

<b>Table 1</b> - Baseline characteristics of the study population.....	62
<b>Table 2</b> - Activities of ectonucleotidase enzymes and aggregation profile in platelets of the control subjects and MetS group before and after the exercise intervention.....	63
<b>Table 3</b> - Pearson's correlation between activities of ecto-nucleotidase enzymes in platelet and pro-thrombotic risk factors .....	64

### ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

<b>Table 1</b> - General and biochemical characteristics of the study population.....	83
<b>Table 2</b> - Inflammatory parameters of the study population.....	83
<b>Table 3</b> - Activities of the hepatic enzymes of the study population.....	84
<b>Table 4</b> - Pearson's correlation between activities of E-NPTDase and ADA enzymes in lymphocytes and cardiovascular risk factors .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADA** – Adenosina Desaminase

**ADP** – Adenosina Difosfato

**AMP** – Adenosina Monofosfato

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**AGL** – Ácido Graxo Livre

**AMP** – Adenosina Monofosfato

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**DCV** – Doença Cardiovascular

**DMT2** – Diabetes *Mellitus* tipo 2

**E-NPP** – Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

**E-NTPDase** – Ecto-Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**FNT- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

**IDF** – *International Diabetes Federation*

**IL-1  $\beta$**  – Interleucina 1 $\beta$

**IL-2** – Interleucina 2

**IL-6** – Interleucina 6

**IMC** – Índice de Massa Corporal

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**LDLpd** – Lipoproteína de baixa densidade pequena e densa

**MPO** – Mieloperoxidase

**NCEP –ATP III** – *National Cholesterol Education Program– Adult Treatment Panel III*

**NTPDase** – Ectonucleosídeo trifosfato-difosfohidrolase

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PAI-1** – Inibidor do ativador do plasminogênio – 1

**PC-R** – Proteína C-Reativa

**SMet** – Síndrome Metabólica

**VLDL** – Lipoproteína de muito baixa densidade

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO A</b> - Carta de aprovação pelo Comitê de Ética .....	104
--	-----

## **LISTA DE APÊNDICES**

<b>APÊNDICE A</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	107
<b>APÊNDICE B</b> – Questionário para Anamnese.....	109

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>41</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>41</b>
<b>3. ARTIGOS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 ARTIGO PUBLICADO</b>	
Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients.....	<b>43</b>
<b>3.2 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO</b>	
Exercise training positively modulates the ectonucleotidase enzymes in lymphocytes of metabolic syndrome patients.....	<b>65</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>87</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>93</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>94</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>95</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>104</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>107</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SMet) é uma condição caracterizada pela coexistência de diversos fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), incluindo hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia e obesidade abdominal (HAN & LEAN, 2015). Como a integração de mais de um fator de risco dobra as chances de desenvolvimento de DCV e aumenta em até cinco vezes o risco para diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (SADIKOT & HERMANS, 2010), a identificação de pessoas portadoras de SMet tem sido considerada uma importante estratégia para a prevenção de desordens cardiometabólicas no âmbito da saúde pública (SCHMIDT et al., 2011).

Atualmente, o estilo de vida caracterizado pela inatividade física e por dietas desbalanceadas tem favorecido o aumento em proporções epidêmicas no número de diagnósticos da SMet (KIM & CHOI, 2016). A SMet está presente em aproximadamente 20 a 30% da população mundial adulta e estima-se que o número de diagnosticados deva atingir 1 bilhão até o ano de 2025 (KASTORINI et al., 2016). No Brasil, aproximadamente 30% da população é portadora de SMet, sendo que as prevalências variam de acordo com as transições demográficas, epidemiológicas e nutricionais, bem como nas diferentes macrorregiões do país, demonstrando 29,8%, 20,1% e 41,5% de prevalência para as regiões urbana, rural e indígena, respectivamente (VIDIGAL et al., 2013).

Entre os gêneros, a prevalência da SMet tem sido predominante no sexo feminino, uma vez que alterações nos níveis hormonais de estrogênio contribuem para o aumento dos riscos cardiovasculares (HEVENER, CLEGG, & MAUVAIS-JARVIS, 2015). Em adultos brasileiros a prevalência da SMet foi demonstrada ser de 48,9% para homens e 59% para mulheres (MURUCI, FRANCISCO & ALVES, 2015). Entretanto, alguns estudos demonstram não ter diferenças entre a prevalência de gêneros, o que poderia ser justificado pelas variações de etnia e de idade entre os estudos (DUTRA et al., 2012; GRONNER et al., 2011). De fato, a prevalência da SMet aumenta com a idade e tem sido mais expressiva na faixa etária de 55 a 65 anos (DUARTE et al., 2016).

Da mesma forma, as prevalências dos fatores de risco cardiovasculares nas populações diagnosticadas com SMet variam de acordo com as características da região estudada. No Brasil, os baixos níveis de colesterol-HDL (*high-density*

*lipoprotein*, em inglês) (VIDIGAL et al., 2013) e a hipertensão (SCHMIDT et al., 2011) foram os componentes da SMet mais comumente presentes.

Diabetes, obesidade, hipertensão e as conseqüentes DCV são responsáveis por aproximadamente 40% do total de mortes no Brasil (SCHMIDT et al., 2011). Entretanto, o desenvolvimento de programas de controle do tabagismo e a melhoria no acesso aos cuidados primários têm ajudado a diminuir as taxas de mortalidade por DCV, mas apresentam pouco efeito sobre as taxas de mortalidade pelos fatores de risco (hipertensão, dislipidemia, obesidade e diabetes), as quais permanecem estáveis em proporções de 2 a 11% ou crescentes, conforme o fator de risco (SCHMIDT et al., 2011).

Além disso, a ampla prevalência das DCV e dos seus fatores de risco promovem elevados custos médicos e socioeconômicos com tratamentos, internações, profissionais especializados, entre outros. Apenas para o tratamento de doenças associadas à obesidade, o sistema único de saúde (SUS) gasta anualmente R\$ 488 milhões e ainda assim o número de brasileiros mortos por complicações diretamente relacionadas à obesidade não para de crescer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Segundo a OMS, um investimento maior na assistência e nos tratamentos das DCV e dos seus fatores de risco poderia levar a uma perda econômica de US \$ 4,18 bilhões para o Brasil (SCHMIDT et al., 2011).

A preocupação com a SMet, entretanto, teve seu início ainda nos anos oitenta, quando o pesquisador Reaven (1988) foi o primeiro a apontar este agrupamento de anormalidades metabólicas, nomeando-o de Síndrome X. Com o tempo outros termos foram sendo criados para representar essa condição, incluindo Síndrome Plurimetabólica, Síndrome de Reaven, Síndrome de resistência à insulina e, por fim, a SMet, que ganhou a aceitação internacional e o código E88.81 na Classificação Internacional de Doenças nas duas últimas décadas (HAN & LEAN, 2016).

Conforme o tipo de critério utilizado para o diagnóstico da SMet, os valores de prevalência e incidência podem ser ainda maiores, já que diferentes organizações, incluindo a Organização Mundial da Saúde (OMS), *International Diabetes Federation* (IDF) e *National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP-III), apresentam variações na definição da SMet, conforme demonstrado no Quadro 1 (HAN & LEAN, 2016). A intolerância à glicose ou a resistência insulínica é um componente essencial da SMet segundo a OMS (1998), enquanto que a obesidade abdominal é o critério essencial segundo a IDF (2006). O NCEP-ATP III

(NIH, 2001), por sua vez, considera os mesmos critérios, entretanto não exige a presença de um componente essencial. Entretanto, mesmo que todas as definições tenham sido desenvolvidas com o intuito de incluir a SMet na prática-clínica, a definição do NCEP/ATP-III é a mais amplamente utilizada como critério de diagnóstico (HAN & LEAN, 2015).

**Quadro 1** – Definições da síndrome metabólica de acordo com as três principais organizações internacionais.

<b>Critério Clínico</b>	<b>OMS</b>	<b>IDF</b>	<b>NCEP/ATPIII</b>
<b>Resistência à insulina</b>	Intolerância à glicose, alteração na glicemia de jejum, DMT2 ou baixa sensibilidade à insulina	Intolerância à glicose ou alteração na glicemia de jejum	Não requer
<b>Peso corporal ou Circunferência abdominal</b>	Homem: relação cintura/quadril > 0,9 Mulher: relação cintura/quadril > 0,85 e/ou IMC > 30 Kg/m <sup>2</sup>	Homem: circunferência abdominal ≥ 94 cm Mulher: Circunferência abdominal ≥ 80 cm	Homem: circunferência abdominal ≥ 102 cm Mulher: Circunferência abdominal ≥ 88 cm
<b>Perfil lipídico</b>	TG ≥ 150 mg/dL e/ou Homem: HDL < 35 mg/dL Mulher: HDL < 39 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL ou medicação específica para dislipidemia e/ou Homem: HDL < 40 mg/dL Mulher: HDL < 50 mg/dL Ou medicação específica para dislipidemia	TG ≥ 150 mg/dL ou medicação específica para dislipidemia e/ou Homem: HDL < 40 mg/dL Mulher: HDL < 50 mg/dL Ou medicação específica para dislipidemia
<b>Pressão arterial</b>	≥ 140/90 mg Hg	≥ 130/85 mg Hg Ou medicação anti-hipertensiva	≥ 130/85 mg Hg Ou medicação anti-hipertensiva
<b>Glicose</b>	Intolerância à glicose, alteração na glicemia de jejum ou DMT2	≥ 100 mg/dL e inclui DM	≥ 100 mg/dL e inclui DM
<b>Outros</b>	Microalbuminúria		
<b>Sujeito é considerado com Síndrome Metabólica se apresentar</b>	Intolerância à glicose ou resistência insulínica mais dois outros fatores	Obesidade abdominal mais dois outros fatores	Pelo menos três dos fatores acima

FONTE: RYAN et al., 2010, com adaptações.

Contudo, cabe destacar que nem todos os indivíduos são capacitados a desenvolver os componentes da SMet devido à variação genética. Estima-se que aproximadamente 30% das variações de IMC e 70% das variações na distribuição de

gordura corporal são decorrentes de fatores genéticos (BOUCHARD, 1995). Tornou-se claro, entretanto, que o desenvolvimento da obesidade e da SMet a partir da causa genética requer a interação com o ambiente.

De fato, o aumento da gordura intra-abdominal e o surgimento dos riscos metabólicos são favorecidos por dietas ricas em gordura saturada, tabagismo, inatividade física e ingestão excessiva de álcool (HAN et al., 1998). Adicionalmente, o estresse psicossocial também tem contribuído no desenvolvimento da SMet, já que populações de baixo nível socioeconômico apresentam elevada prevalência para a maioria dos fatores de risco (SMOYER-TOMIC et al., 2008).

O principal objetivo de diagnosticar a SMet, além de desenvolver inquéritos epidemiológicos, é iniciar intervenções preventivas e assim evitar o aumento no número de casos de DM2 e de DCV. No entanto, de forma geral, o aparecimento do fenótipo da SMet é marcado pelo aumento de peso, particularmente relacionado ao aumento da circunferência abdominal (HAN & LEAN, 2016).

Conseqüentemente, a obesidade tem sido considerada uma das principais causas da SMet e um importante indicador clínico de superalimentação e de desequilíbrio energético positivo (GRUNDY, 2016). Quando a quantidade de nutrientes ingerida excede a demanda energético-metabólica, o excesso de triglicerídeos é estocado nos adipócitos, forçando a expansão do tecido adiposo. Contudo, as complicações metabólicas aumentam quando o tecido adiposo intra-abdominal passa a exercer a função de estocagem de gordura, uma vez que esse tecido exibe maior densidade mitocondrial e maiores taxas de lipólise e de glicólise que o tecido adiposo subcutâneo (HAN & LEAN, 2015; WELTY, ALFADDAGH & ELAJAMI, 2016).

Conforme aumenta em massa, o tecido adiposo eleva gradativamente a sua taxa metabólica e o excesso de gordura induz hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, elevando a necessidade local de oxigênio (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010). Entretanto, como a expansão do tecido reduz a capacidade de ampliação da rede capilar ao redor dos adipócitos, o suprimento adequado de oxigênio é impedido, favorecendo a ocorrência de hipóxia e de necrose tecidual (KRANENDONK et al., 2015). Nesse contexto, vias de estresse celular e de secreção local de citocinas inflamatórias são ativadas. Excessiva quantidade dessas substâncias liberadas por uma gordura intra-abdominal expandida são associadas ao aumento das desordens metabólicas (WELTY, ALFADDAGH & ELAJAMI, 2016).

Dessa forma, na SMet o tecido adiposo é um tecido de metabolismo altamente ativado, preconizado como um órgão endócrino capaz de liberar mais de 50 diferentes tipos de moléculas conhecidas como adipocinas, as quais podem agir localmente ou sistemicamente regulando a inflamação, a função imune e os componentes da SMet (WELTY, ALFADDAGH & ELAJAMI, 2016). Entre as adipocinas estão a adiponectina, a resistina, a leptina, as interleucinas (IL), como IL-1 e IL-6, e o fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ), os quais são importantes fatores da regulação energética (HAN & LEAN, 2015).

Postula-se que a adiponectina é a única adipocina negativamente regulada na resistência à insulina e parece agir como inibidor da secreção das demais adipocinas (GRUNDY, 2016). É uma molécula que apresenta várias atividades biológicas, incluindo propriedades anti-aterogênicas, porém seus níveis plasmáticos diminuem a medida que o tecido adiposo aumenta, como em indivíduos obesos e diabéticos. Por outro lado, a secreção e os níveis plasmáticos de resistina, leptina, IL-1, IL-6 e FNT- $\alpha$  estão elevados em obesos, uma vez que essas adipocinas têm importante papel inflamatório local e sistêmico, diminuem a ação da insulina e são considerados biomarcadores da obesidade associada às doenças metabólicas (GRUNDY, 2016).

Além das desordens causadas a partir das adipocinas, os altos níveis sistêmicos de ácidos graxos livres (AGL) também têm sido associados à disfunções do tecido adiposo, à resistência à insulina e à esteatose hepática não-alcoólica. A limitada capacidade de estocagem do tecido adiposo subcutâneo e a maior atividade lipolítica basal dos adipócitos viscerais permitem um persistente aumento do fluxo de AGL para a circulação a partir do tecido adiposo expandido (COOKE et al., 2016). A grande quantidade de AGL liberados via sistema portal para o fígado pode interferir no *clearance* da insulina pelo fígado, aumentar a taxa de *turnover* dos AGL e assim favorecer a resistência à insulina e a acumulação dos AGL nos tecidos na forma de ceramidas, acil CoA e esfingolipídeos (HAN & LEAN, 2015).

A conexão entre o aumento da oferta de AGL e o acúmulo de triglicerídeos e de diacilglicerol nas células hepáticas caracteriza o passo inicial da esteatose hepática não-alcoólica, a qual tem sido fortemente associada à SMet (SORESÌ et al., 2015). Como consequência desse processo, alguns indivíduos com SMet podem vir a desenvolver hepatotoxicidade, já que o aporte excessivo de AGL ao fígado promove o esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos

intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios e parecem ativar fibroblastos, propiciando a fibrogênese. Assim o estresse oxidativo induz necroinflamação e fibrose no fígado gorduroso (HYOGO & YAMAGASHI, 2008).

Na tentativa de caracterizar a esteatose hepática não-alcoólica na SMet, dosagens de marcadores de função e lesão hepática têm sido amplamente utilizados. Entre esses marcadores estão inclusas as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), sendo esta última uma importante ferramenta de diagnóstico, já que na esteatose hepática está significativamente elevada e correlacionada de forma positiva com os fatores de risco cardiovasculares (ELIZONDO-MONTEMAYO et al., 2014).

O grande fluxo de AGL para o fígado a partir da obesidade intra-abdominal, além de todas as alterações descritas até aqui, também condiciona a dislipidemia, a qual é um risco independente para DCV e está presente na maioria dos portadores da SMet. A dislipidemia associada à SMet é caracterizada pela tríade: hipertrigliceridemia, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e partículas de lipoproteína de baixa densidade pequena e densa (LDL-pd) (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010).

O acúmulo da gordura visceral, a elevação plasmática de AGL e a consequente resistência à insulina promovem uma diminuição da expressão e da atividade da enzima lipase lipoprotéica (LPL). Da mesma forma, o FNT- $\alpha$  e a IL-6 produzidos pelo tecido adiposo visceral também demonstram efeitos inibitórios sobre a LPL (KERN et al., 1995). Como essa enzima é responsável pela hidrólise dos triglicerídeos presentes nos quilomícrons e nas partículas de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), a sua inibição contribui para o acúmulo de triglicerídeos na circulação (SALAH et al., 2009).

Adicionalmente, na condição da SMet a atividade da enzima lipase hormônio sensível (LHS) não é suprimida, já que os efeitos da insulina estão diminuídos. Conseqüentemente, a lipólise nos tecidos periféricos, especialmente no tecido adiposo, é estimulada mesmo em estado energético positivo, aumentando o aporte de AGL para o fígado e para a circulação. No fígado, esse excesso de AGL é convertido em VLDL, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento da hipertrigliceridemia na SMet (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010).

A diminuição na atividade da LPL também resulta em prejuízos na produção das partículas precursoras de HDL, uma vez que componentes lipídicos dos

quilomícrons e das VLDL são necessários para a formação e maturação das partículas de HDL. Além disso, na SMet ocorre aumento da troca de triglicerídeos e ésteres de colesterol entre as partículas ricas em triglicerídeos e as HDL, fazendo com que as partículas de HDL se enriqueçam em triglicerídeos e se tornem mais suscetíveis a lipase hepática que, normalmente, já tem a sua atividade aumentada nos estados de resistência à insulina. Assim, as partículas de HDL são remodeladas a uma forma capaz de ser mais rapidamente retirada da circulação pelos receptores *scavenger* classe B tipo I nos hepatócitos, o que justifica os baixos níveis dessa lipoproteína encontrados em portadores da SMet (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010).

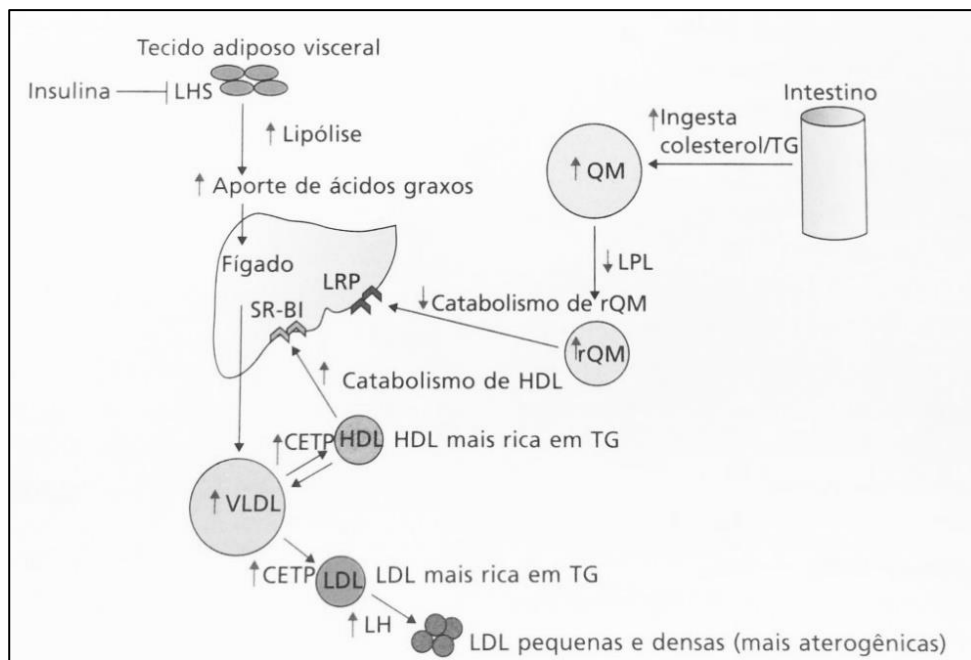
É importante destacar que, embora a hipertrigliceridemia e a diminuição nos níveis de HDL estejam favorecidos na SMet, de forma geral os níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) estão normais ou levemente alterados nesses indivíduos. No entanto, há uma fração elevada de partículas de LDL-pd. Como as partículas de VLDL estão em maior quantidade na circulação, ocorre alta transferência de triglicerídeos das VLDL para as LDL. Entretanto, as LDL enriquecidas com triglicerídeos são mais suscetíveis à ação da lipase hepática que assim retira conteúdo destas partículas tornando-as menores e mais densas. Essas partículas de LDL-pd são altamente aterogênicas por serem mais suscetíveis à oxidação e assim mais facilmente captadas pelos macrófagos da parede arterial, facilitando a formação de células espumosas (VERGES, 2005). O mecanismo das alterações lipídicas na SMet está resumido na Figura 1.

Dessa forma, o grau de dislipidemia correlaciona-se com a quantidade de tecido adiposo visceral, coerente com o papel metabólico crítico que os adipócitos desta região parecem desempenhar na fisiopatologia da SMet. Adicionalmente, o diagnóstico precoce das dislipidemias pode evitar danos tardios, já que nos pacientes com SMet a dislipidemia parece preceder o aparecimento de diabetes e outras complicações (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010).

O tecido adiposo, através dos seus produtos de secreção, indiretamente exerce significativa influência sobre a sensibilidade à insulina e sobre a homeostasia glicídica (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010). Como a insulina estimula a captação de glicose pelo tecido adiposo e músculo esquelético, ao mesmo tempo em que inibe a gliconeogênese hepática, ajudando a regular a homeostase glicêmica, a redução na sensibilidade ou responsividade às ações da insulina resultam em um aumento

significativo no nível sanguíneo de glicose e a promoção de disglucemia (ACCILI, 2004).

**Figura 1** – Esquema representativo das alterações lipídicas durante a SMet. CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LH: lipase hepática; LHS: lipase hormônio-sensível; LPL: lipase lipoprotéica; LRP: proteína relacionada ao receptor de LDL; QM: quilomícron; rQM: remanescentes de quilomícron; SR-BI: receptor *scavenger* classe B tipo I; TG: triglicerídeos; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.



FONTE: GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010, p. 408, com adaptações.

A disglucemia é definida como uma alteração na glicemia que, embora não corresponda aos critérios diagnósticos de diabetes, encontra-se em níveis elevados em relação à normalidade. A prevalência da SMet é maior com o aumento nos níveis de glicemia de jejum e de hemoglobina glicada e esta associação ocorre mesmo nos níveis que não caracterizam o diabetes (UNWIN et al., 2002).

A elevação da glicose plasmática na SMet pode estar na faixa tanto de pré-diabetes, como de diabetes. No pré-diabetes a glicemia de jejum encontra-se na faixa de 100-125 mg/dL ou um nível pós-prandial de 2h de 140-199 mg/dL, enquanto que no diabetes a glicose de jejum é  $\geq 126$  mg/dL ou um nível pós-prandial de 2h  $\geq 200$  mg/dL. Embora a resistência à insulina seja apontada como o principal fator desencadeante da hiperglicemia na SMet, pessoas que apresentam resistência à insulina podem evitar a elevação da glicemia pelo mecanismo compensatório da



hiperinsulinemia. Somente quando as células  $\beta$ -pancreáticas começam a diminuir a produção de insulina é que os níveis plasmáticos de glicose começam a subir. Então, a hiperglicemia não é o primeiro fator da SMet, mas é capaz de desenvolver sequelas tardias. Cabe ressaltar que no consenso da definição da SMet, ambas as faixas de pré-diabetes e de diabetes estão incluídas como fatores de risco metabólicos (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010).

Entre os danos causados pela hiperglicemia, as doenças microvasculares estão em destaque, já que a hiperglicemia sustentada pode acarretar anormalidades bioquímicas e estruturais de olhos, rins, coração, vasos sanguíneos e nervos periféricos (de AGUIAR, VILLELA & BOUSKELA, 2007). O dano endotelial parece ser o fator desencadeante na patogênese das complicações microvasculares, já que o acentuado aumento do metabolismo da glicose na hiperglicemia está associado a uma formação aumentada de radicais livres, os quais modificam as células endoteliais e a funcionalidade dos microvasos, alterando o fluxo sanguíneo e aumentando a permeabilidade vascular. A duração e a magnitude da hiperglicemia estão ambas fortemente correlacionadas com a extensão e a velocidade de progressão da doença microvascular (de AGUIAR, VILLELA & BOUSKELA, 2007; WAJCHENBERG, 2002).

Estas alterações precoces podem ser revertidas através do controle da glicemia. Entretanto, se não controlada, a hiperglicemia pode estimular um remodelamento estrutural nos microvasos com consequente espessamento da membrana basal capilar, perda dos pericitos capilares e formação de microaneurismas (de AGUIAR, VILLELA & BOUSKELA, 2007; KOWLURU, ZHONG & KANWAR, 2010). Por conseguinte, doenças macrovasculares, como a aterogênese, podem ser desencadeadas a partir da hiperglicemia, porém ainda é incerto se esse risco pode ser exercido apenas pela hiperglicemia, ou em associação com outros fatores de risco (GRUNDY, 2016).

A hipertensão arterial, outro fator de risco que constitui a SMet, também tem sido fortemente associado à obesidade e aos distúrbios lipêmicos e glicêmicos. A proporção de indivíduos obesos cresce continuamente nas sociedades ocidentais e isso ocorre paralelo ao aumento na incidência da hipertensão (RAO, PANDYA & WHALEY-CONNELL, 2015).

A ativação do nervo simpático e a consequente retenção de sódio parece representar um dos principais mecanismos associados ao desenvolvimento da hipertensão. O aumento na atividade do nervo simpático é desencadeado pelos

estados de hiperleptinemia e de hiperinsulinemia presentes na obesidade (EGAN, 2003). Outros fatores que favorecem a maior reabsorção de sódio pelos indivíduos obesos estão relacionados ao aumento da filtração glomerular e do fluxo plasmático renal, assim como à maior ativação do sistema renina-angiotensina-alosterona (SRAA), os quais contribuem para uma maior vasoconstrição (RAO, PANDYA & WHALEY-CONNELL, 2015).

Além disso, a obesidade e o ganho de peso estão relacionados ao aumento do débito cardíaco absoluto. Embora o aumento do débito cardíaco se deva em parte ao aumento do suprimento sanguíneo ao tecido adiposo, o fluxo sanguíneo para os demais tecidos, incluindo coração, trato gastrointestinal, rins e músculo esquelético, também aumenta com o ganho de peso. Entretanto, nos pacientes hipertensos não ocorre redução adequada da resistência periférica diante do aumento no débito cardíaco para a manutenção da pressão arterial (SINGH, MENSAH & BAKRIS, 2010).

Assim, a fisiopatologia da pressão arterial elevada nos portadores da SMet é considerada multifatorial e influenciada por diversas desordens que ocorrem concomitantemente, mas pelas evidências se pode inferir que a obesidade seja a maior causa da hipertensão (EGAN, 2003; RAO, PANDYA & WHALEY-CONNELL, 2015; SINGH, MENSAH & BAKRIS, 2010).

Nesse contexto, é importante destacar que cada componente da SMet (obesidade abdominal, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão) são considerados fatores de risco independentes para as DCV. Entretanto, a associação desses fatores de risco observada na SMet não representa uma simples soma de anormalidades, mas sim efeitos multiplicativos que intensificam os riscos relacionados às DVC. Por isso, é compreensível que a SMet tenha um grande impacto na saúde pública mundial (SADIKOT & HERMANS, 2010).

Entre os principais efeitos causados pela associação dos fatores de risco cardiovascular, os estados pró-inflamatório e pró-trombótico estão entre os mais discutidos por terem importante papel no processo da aterogênese e no aumento dos riscos cardiovasculares. O endotélio vascular é capaz de receber estímulos locais ou sistêmicos e assim modificar a sua funcionalidade para garantir a homeostase da parede vascular. Contudo, condições pró-inflamatórias e pró-trombóticas representam complicações que promovem a deterioração da função do endotélio e assim propiciam o desenvolvimento da aterosclerose (BADIMÓN, VILAHUR & PADRÓ, 2009).

A origem do estado pró-inflamatório na SMet está associada à produção anormal de adipocinas e citocinas pelos adipócitos hipertróficos e pelas células do sistema imune, seguida da ativação das vias inflamatórias. Contudo, a ingestão excessiva de nutrientes também pode perturbar a homeostasia imune e desencadear uma resposta inflamatória (LI et al., 2014). De fato, os altos níveis de glicose e de AGL circulantes ativam em vários tipos celulares (leucócitos, célula endotelial, epitelial, muscular) os inflamassomas, que são um grupo de complexos proteicos intracelulares formados rapidamente em resposta a diversos estímulos de estresse celular, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (LI et al., 2014; SCHRODER & TSCHOPP, 2010).

Um dos inflamassomas mais bem estudados são os receptores de ligação a nucleotídeo contendo um domínio com sequência repetida de leucina e um domínio 3 de pirina (NLRP3), que são essenciais para a resposta imune inata contra agentes patogênicos. Entretanto, a ativação inapropriada dos inflamassomas NLRP3 tem sido observada em diversas doenças e distúrbios metabólicos, incluindo aterosclerose, obesidade e DMT2 (LI et al., 2014). NLRP3 pode ser ativado por diversas vias, incluindo indicadores de estresse e injúria celular, como a adenosina trifosfato (ATP), cristais de colesterol, ácido úrico, ceramidas e EROs formados a partir do aumento nos níveis de glicose e AGL (ESSER et al., 2014; LI et al., 2014).

Em geral, a ativação dos inflamassomas induz a produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18 e FNT- $\alpha$ , e o recrutamento de células imunes tais como macrófagos e linfócitos em vários tecidos incluindo no tecido adiposo, fígado, músculo, ilhotas pancreáticas e no endotélio vascular. Dessa forma, além das citocinas pró-inflamatórias, a contagem de leucócitos totais e proteínas de fase aguda da inflamação, como a proteína C-reativa (PC-R) e a enzima mieloperoxidase (MPO), também estão elevados em pacientes obesos e/ou diabéticos, enquanto que esses níveis tendem a se reduzir após perda de peso estimulada por mudanças positivas no estilo de vida (ESSER et al., 2014).

É importante destacar que o tecido adiposo, além dos adipócitos, é também constituído por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente os macrófagos. Essas células do sistema imune residentes no tecido adiposo têm papel crítico na secreção de citocinas que facilitam a vascularização e o remodelamento da matriz extracelular necessários para a expansão do tecido na obesidade (ASTERHOLM et al., 2014). Entretanto, se o tecido adiposo permanecer em expansão

crônica, a secreção de citocinas e o processo inflamatório local não são suprimidos, mantendo constante o recrutamento das células imunes com acumulação e remodelamento das populações de células residentes (OH et al., 2012). Nesse contexto, as disfunções inflamatórias locais assumem caráter sistêmico, representando a inflamação crônica de baixo grau característica da SMet e que favorece as complicações das desordens metabólicas, tais como diabetes e aterosclerose (LI et al., 2014).

Durante a remodelação do tecido adiposo os macrófagos se tornam metabolicamente mais ativados por mediação de linfócitos pró-inflamatórios. Estudos têm demonstrado que linfócitos B e linfócitos T estão infiltrados no tecido adiposo visceral de obesos antes mesmo do grande influxo de macrófagos (DUFFAUT et al., 2009; NISHIMURA et al., 2009; WINER et al., 2009). Além disso, a distribuição, o subconjunto e/ou as funções das duas principais populações de linfócitos, células B e células T, estão alteradas no diabetes e na obesidade com o intuito de fornecer sinais pró-inflamatórios que suportam a inflamação tanto no tecido adiposo quanto sistemicamente, sendo, por isso, células de fundamental importância para a inflamação associada a SMet (IP et al., 2015).

Os linfócitos dos tipos citotóxico ( $CD8^+$ ), Th1 e Th17 apresentam características pró-inflamatórias, uma vez que modulam a transformação dos macrófagos para a forma mais ativada (M1), estimulando o processo inflamatório. Por outro lado, os linfócitos Th2 e T regulatório (Treg) atuam como anti-inflamatórios ao liberarem IL-10, uma molécula anti-inflamatória e assim promovem a polarização dos macrófagos para a forma menos ativa (M2), diminuindo a inflamação. Entretanto, sujeitos obesos, especialmente relacionados à obesidade abdominal, apresentam um predomínio de linfócitos  $CD8^+$ , Th1 e Th17, o que contribui para o aumento do número e do estado de ativação dos macrófagos no tecido adiposo, para a inflamação sistêmica e para a resistência à insulina (ESSER et al., 2014).

De forma semelhante, alterações no perfil plaquetário que propiciam o estado pró-trombótico também são observadas na SMet, na obesidade e nas DCV. De fato, as plaquetas apresentam relevante papel na patogênese da aterosclerose já que, além das funções na homeostase sanguínea, as plaquetas também participam da ativação endotelial e da modulação das respostas inflamatórias, favorecendo o aparecimento e a formação de lesões ateroscleróticas e as suas subseqüentes complicações (BADIMÓN, VILAHUR & PADRÓ, 2009).

As plaquetas respondem às injúrias vasculares e assim previnem o processo hemorrágico através dos processos de adesão e de agregação no local de lesão a partir de múltiplas interações sinérgicas entre os sinais de ativação e seus receptores. Assim, iniciam uma série de respostas bioquímicas e morfológicas nas plaquetas, ligada a remodelação do citoesqueleto, a secreção de grânulos e a produção e liberação de agonistas endógenos solúveis, como o ADP e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Com esse mecanismo as plaquetas mantêm a homeostase sanguínea e garantem a integridade vascular (VAN DER STOEP, KORPORAAL & VAN ECK, 2014).

Entretanto, em condições de desordem metabólica ou de risco cardiovascular, as respostas plaquetárias se demonstram alteradas, com aumento da sua adesividade e da sua ativação. A hiperatividade plaquetária e o volume plaquetário médio (MPV) são importantes ferramentas de avaliação do risco de aterotrombose em pacientes com obesidade abdominal e na DM2. Ambos são padronizados como preditores independentes para eventos cardiovasculares e estão aumentados em pacientes obesos, independentemente de outros fatores de risco cardiovasculares (RUSSO, 2012; SANTILLI et al., 2012).

Nesse contexto, as adipocinas e as citocinas pró-inflamatórias produzidas na obesidade e na SMet parecem representar uma importante via de alteração das plaquetas, uma vez que na superfície plaquetária são expressos numerosos receptores de moléculas pró-inflamatórias. A ativação desses receptores poderia alterar a função plaquetária e contribuir para o processo pró-trombótico na condição da SMet. (VON HUNDELSHAUSEN & WEBER, 2007).

Em paralelo, a dislipidemia e a resistência à insulina também contribuem para a ativação plaquetária. Em condições fisiológicas, a insulina diminui a agregação plaquetária por meio de redução da resposta plaquetária ao difosfato de adenosina (ADP) e à trombina, dois importantes agonistas da agregação. Contudo, com a resistência à insulina esses efeitos protetores são prejudicados (ALESSI & JUHAN-VAGUE, 2008). Semelhantemente, a diminuição nos níveis de HDL também favorece a agregação plaquetária, uma vez que essa lipoproteína apresenta ações antitrombóticas através da modulação da reatividade plaquetária, da coagulação e da função endotelial (VAN DER STOEP, KORPORAAL & VAN ECK, 2014).

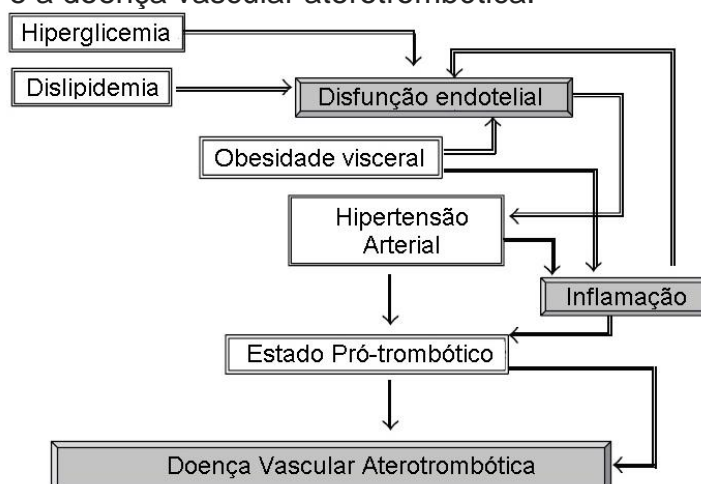
Além disso, o tecido adiposo visceral, a dislipidemia e a resistência à insulina podem afetar diretamente a ativação e a expressão de fatores de coagulação, tendendo a um processo pró-coagulante através da síntese aumentada do ativador

do plasminogênio 1 (PAI-1), do aumento da ativação do fator VII, da supressão da síntese de vasodilatadores pelo endotélio, como o óxido nítrico e a prostaciclina, e da síntese e biodisponibilidade aumentada da endotelina 1, que é um vasoconstritor (ALESSI & JUHAN-VAGUE, 2008).

Conseqüentemente, as alterações na homeostasia e na integridade vascular observadas na SMet e na DMT2 contribuem para o estado pró-trombótico e para o aumento do risco de aterosclerose. Uma vez que tanto a ativação de plaquetas quanto a disfunção endotelial são eventos precoces na história natural da aterosclerose, é concebível que a sua interação exerça significativos efeitos fisiológicos e implicações clínicas (SANTILLI et al., 2012).

Em condições fisiológicas o endotélio vascular apresenta propriedades anti-trombóticas. Isso permite a troca de numerosas substâncias entre o sangue e os tecidos e controla o tonus vascular e o tráfico de células inflamatórias para o leito vascular. Contudo, a permeabilidade do endotélio aumenta na presença de concentrações elevadas de LDL (BADIMÓN, VILAHUR & PADRÓ, 2009), assim como todos os componentes da SMet apresentam efeitos adversos sobre o endotélio vascular (TZIOMALOS et al., 2010), o que favorece a sua disfunção e o surgimento da doença vascular aterotrombótica (Figura 2) (RUSSO, 2012). Dessa forma, é possível inferir que a associação dos fatores de risco cardiovasculares da SMet potencializam a disfunção endotelial, o desbalanço inflamatório e o estado pró-trombótico e assim contribuem de forma significativa para o aumento no risco de DCV e DMT2 (AHIRWAR et al., 2014).

**Figura 2** – Mecanismos potenciais ligando obesidade visceral, a qual caracteriza a SMet, inflamação e a doença vascular aterotrombótica.



FONTE: RUSSO, 2012, com adaptações.

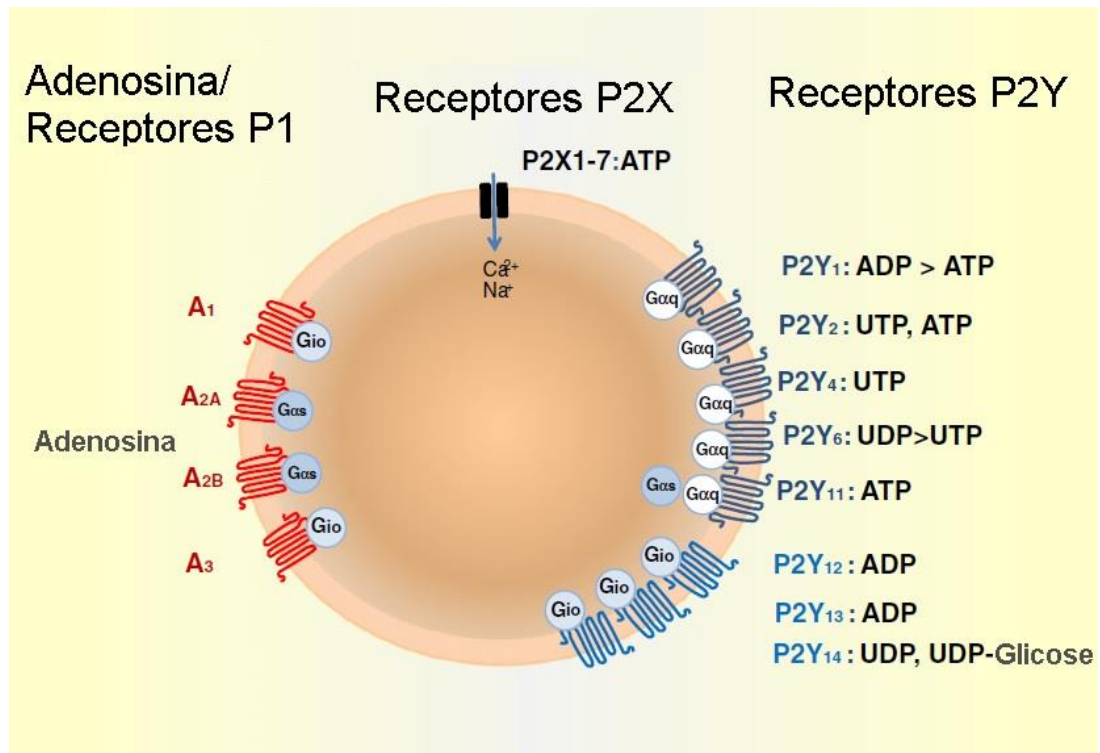
Recentes estudos têm demonstrado a participação da sinalização purinérgica durante todos os estágios da aterosclerose, no processo inflamatório e em DCV (FERRARI et al., 2015; ELTZSCHIG, SITKOVSKY & ROBSON, 2012; RUSSO, 2012). Isso porque os nucleotídeos extracelulares atuam como moléculas sinalizadoras que podem estimular ou evitar o desenvolvimento da doença aterosclerótica através dos receptores purinérgicos (FERRARI et al., 2015; ELTZSCHIG, SITKOVSKY & ROBSON, 2012).

Os nucleotídeos de adenina ATP, ADP e AMP (adenosina monofosfato) e o nucleosídeo adenosina estão presentes em concentrações elevadas no meio intracelular, onde exercem funções como: modulação da atividade de enzimas, intermediários na transferência de energia e fornecimento de elementos para a produção de ácidos nucleicos. Contudo, em condições patológicas como estresse celular e inflamação, esses nucleotídeos e nucleosídeo podem atingir o espaço extracelular e atuar como mediadores de comunicação entre as células. Células vasculares e circulantes são capazes de liberar ATP por exocitose, transportadores (ABC), enzimas (F(1)/F(0)-ATP sintase) e através de canais específicos (conexina e panexina) (FERRARI et al., 2015).

Uma vez presente no meio extracelular, esses nucleotídeos e nucleosídeo podem exercer diversas funções nas mais variadas células através da sua interação com os receptores purinérgicos. Os subtipos de receptores purinérgicos são designados P1 e P2. O primeiro grupo, os receptores P1, tem a adenosina como agonista, enquanto que o segundo grupo de receptores, os receptores P2, são ativados por ATP e/ou outros nucleotídeos, conforme representados na Figura 3 (RALEVIC & DUNN, 2015.).

Os receptores P1 são divididos em quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3, todos acoplados à proteína G. Os receptores de adenosina A1 e A3 são acoplados a proteína  $G_{i/o}$  e medeiam a inibição da adenilil ciclase, reduzindo o acúmulo intracelular de AMP cíclico; enquanto que os receptores de adenosina A2A e A2B são acoplados a proteína  $G_s$  e podem ativar a adenilil ciclase, aumentando a concentração intracelular de AMP cíclico (FERRARI et al., 2015; RALEVIC & DUNN, 2015). É importante destacar que ao interagir com os receptores do tipo A2A e A2B presentes na superfície das plaquetas e dos leucócitos, a adenosina exerce funções de cardioproteção, como a inibição da agregação plaquetária e da atividade inflamatória (JACQUIN et al., 2013; JOHNSTON-COX & RAVID, 2011).

**Figura 3 –** Receptores purinérgicos e seus agonistas.



FONTE: RALEVIC & DUNN, 2015, com adaptações.

Já os receptores P2 são distinguidos em dois grandes grupos: os P2X que são ionotrópicos e dos quais existem sete subtipos (P2X1-P2X7); e os P2Y que são acoplados à proteína G e dos quais existem oito subtipos (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) (FERRARI et al., 2015; RALEVIC & DUNN, 2015). Os P2X1-7 são receptores para ATP e atuam como canais de cátion para provocar a despolarização da membrana. Entre eles, o receptor P2X7 tem sido associado a importantes funções no sistema imune, incluindo o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos, o estímulo da diferenciação e da maturação das células imunes, entre outras funções (DI VIRGILIO & VUERICH, 2015; MEHTA et al., 2014).

Por outro lado, os receptores P2Y podem ser divididos de acordo com o seu agonista endógeno preferido: os nucleotídeos de adenina (P2Y1, P2Y11, P2Y12 e P2Y13) ou os nucleotídeos de uracila (P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y14). Entre o grupo de receptores de nucleotídeos de adenina, os receptores P2Y1, P2Y12 e P2Y13 são ativados pelo ADP, enquanto que o ATP é um agonista de pouca eficácia (RALEVIC & DUNN, 2015).



Nas plaquetas, os receptores P2Y<sub>12</sub> desempenham importante papel na amplificação da atividade plaquetária em resposta ao ADP secretado por células danificadas e pelos grânulos plaquetários (STOREY et al., 2000). Além disso, o receptor P2Y<sub>1</sub> também participa do processo da agregação plaquetária, onde o ADP atua ativando vias que levam a produção de tromboxano A<sub>2</sub>, outro agonista plaquetário (KAHNER et al., 2006). Já o ATP parece modular diferentemente a agregação plaquetária quando presente em baixa ou alta concentração, estimulando ou inibindo a agregação plaquetária, respectivamente (BIRK et al., 2002). Através da interação com os receptores P2X<sub>1</sub> o ATP auxilia a mobilização do influxo de Ca<sup>2+</sup> nas plaquetas e assim estimula a modificação do formato celular discóide para irregular, etapa essencial para o processo inicial da ativação plaquetária e que auxilia a amplificação das respostas mediadas por outros agonistas (KAHNER et al., 2006).

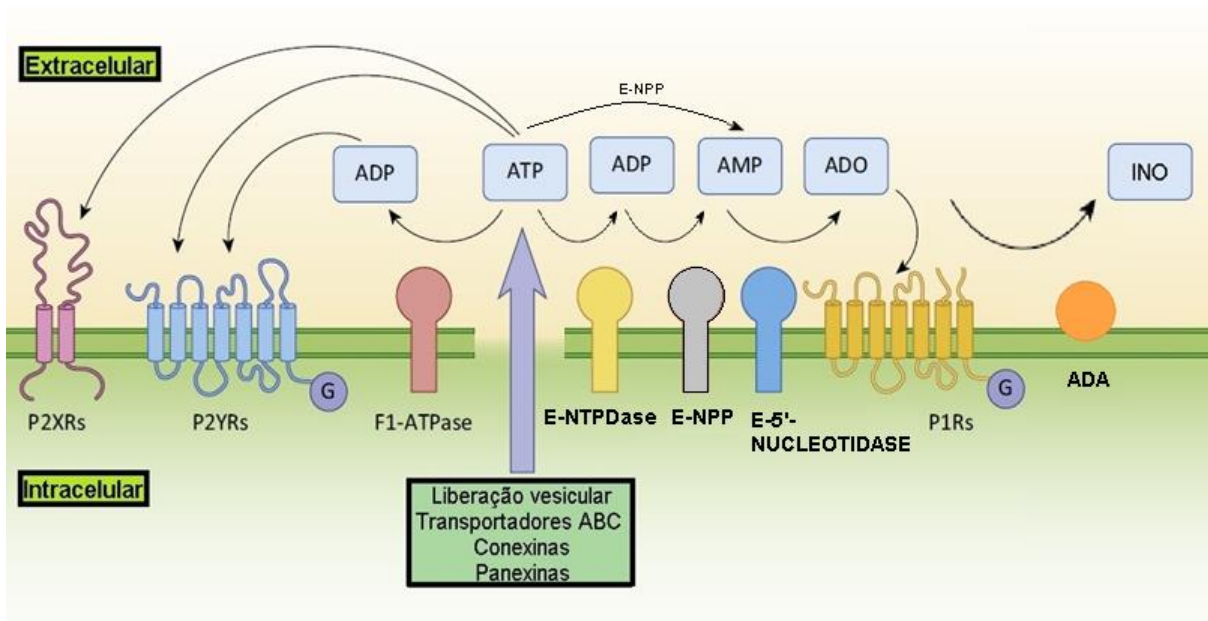
Embora uma liberação moderada e controlada de ATP ou UTP possa exercer efeitos benéficos para tecidos danificados ao ativar as respostas homeostáticas reparadoras, uma liberação grande e descontrolada de ATP por estresse mecânico, desbalanço metabólico, trauma ou infecções provoca a ativação excessiva dos receptores P2 em células imunes e não imunes. Esses eventos são seguidos por uma produção anormal de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios, tais como prostaglandina, leucotrienos, e EROs que, além de causar danos nos tecidos, induzem ao recrutamento maciço de células imunes que levam à condições inflamatórias crônicas (FERRARI et al., 2015).

Nesse sentido, o controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina é uma importante via de regulação dos efeitos do sistema purinérgico sobre as condições trombóticas e inflamatórias presentes na SMet. Cabe destacar que esse controle é realizado por uma variedade de enzimas que estão ancoradas à membrana plasmática ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel (ZIMMERMANN et al., 2007). Essas enzimas, denominadas ectonucleotidases, são divididas em quatro famílias, das quais se destacam a Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase, CD39, apirase, EC 3.6.1.5), a Ecto-nucleotídeo pirofosfato/ fosfodiesterase (E-NPP, EC 3.1.4.1) e a Ecto-5'-nucleotidase (E-5'-nucleotidase, CD73, EC 3.1.3.5), que juntas atuam em conjunto para hidrolisar os nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos (SCHETINGER et al., 2007; YEGUTKIN, 2008).

A enzima E-NTPDase atua hidrolisando os nucleotídeos ATP e ADP até AMP, enquanto que a E-NPP atua hidrolisando o ATP diretamente à AMP. Por sua vez, o AMP é metabolizado pela enzima E-5'-Nucleotidase para formar a adenosina. Seguindo a cascata enzimática, a adenosina ainda pode ser convertida em inosina através da ação da enzima adenosina desaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4) também presente na superfície celular (YEGUTKIN, 2008), conforme esquematizado na Figura 4.

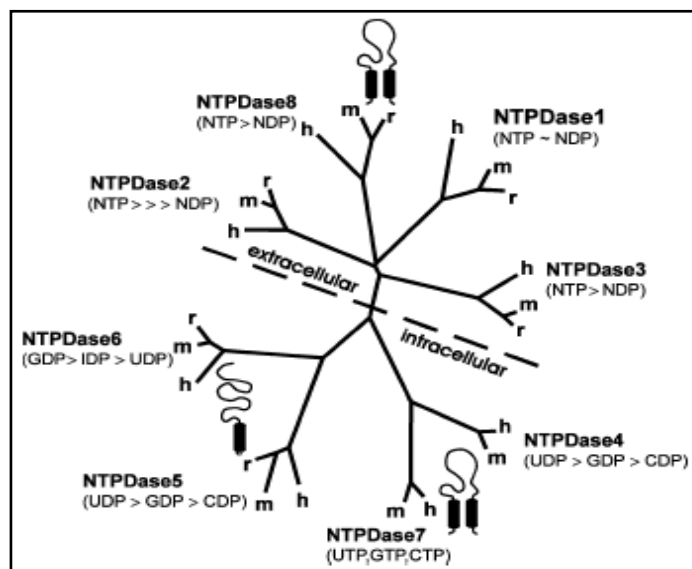
Através da cascata enzimática acima descrita, as ectonucleotidases, juntamente com a ADA, atuam controlando os níveis dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina e assim modulam os efeitos do sistema purinérgico. Corroborando com a importância biológica das ectonucleotidases, doenças imunes, inflamatórias e cardiovasculares têm demonstrado alterações na atividade e na expressão dessas enzimas em linfócitos e em plaquetas (RALEVIC & DUNN, 2015; YEGUTKIN, 2008).

**Figura 4** – Sinalização purinérgica na membrana celular. O ATP é liberado através de diferentes vias para o meio extracelular, onde pode agir sobre os receptores purinérgicos P2X (P2XRs) ou P2Y (P2YRs), ou ainda ser hidrolisado à ADP e à AMP pela enzima E-NTPDase ou direto à AMP pela enzima E-NPP. O AMP é hidrolisado pela enzima E-5'-nucleotidase à adenosina (ADO), a qual age sobre os receptores P1 (P1Rs) ou é metabolizada à inosina pela enzima ADA à inosina (INO).



A família da E-NTPDase é composta por oito membros e diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (BIOGENNESE et al., 2004; SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001). As E-NTPDase 1, -2, -3 e -8 são enzimas tipicamente localizadas na membrana celular com um sítio catalítico na face extracelular e hidrolisam todos os nucleotídeos capazes de ativar os receptores P2. Por outro lado, as E-NTPDase 4, -5, -6 e -7 exibem localização intracelular tendo pouca contribuição para a hidrólise dos nucleotídeos extracelulares (Figura 5) (ROBSON, SÉVIGNY & ZIMMERMANN, 2006). Cabe destacar, entretanto, que as E-NTPDase 5 e 6 podem aparecer na superfície celular ou ainda serem secretadas para o meio extracelular, onde contribuem com a regulação dos níveis de ADP, UDP e UTP (BRAUN et al., 2000).

**Figura 5 –** Membros da Família das E-NTPDases.



FONTE: ROBSON, SÉVIGNY & ZIMMERMANN, 2006.

Essas enzimas são amplamente distribuídas nos tecidos e células, incluindo endotélio vascular, células musculares lisas do sistema circulatório, células imunes e plaquetas (SCHETINGER et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 1999). A E-NTPDase 1 hidrolisa ATP e ADP e atua como principal responsável pelo término das ações dos receptores P2, pois não permite a acumulação de ADP durante a hidrólise do ATP (KUKULSKI, LÉVESQUE, & SÉVIGNY, 2011). Esta enzima está amplamente expressa em leucócitos, o que lhe confere um importante envolvimento no processo

inflamatório (DWYER et al., 2007). Nos linfócitos, principalmente no subtipo Treg, a E-NTPDase 1 parece ser essencial para a produção de adenosina e por isso é considerada parte do arsenal imuno-supressivo dessas células (BONO et al., 2015). Em plaquetas intactas, a E-NTPDase 1 está envolvida na concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular (GAYLE III et al., 1998; ENJYOJI, 1999).

As E-NTPDase 2, -3 e -8 apresentam preferência pela hidrólise do ATP e por isso propiciam a ativação dos receptores de ADP, já que permitem o acúmulo deste nucleotídeo. Entretanto, apresentam expressão reduzida em células endoteliais e sanguíneas, sendo poucas as informações relacionadas à importância dessas enzimas no processo inflamatório e trombótico (KUKULSKI, LÉVESQUE, & SÉVIGNY, 2011)

A família das E-NPPs, por sua vez, é constituída por sete enzimas (E-NPP1-7) ligadas à membrana por um único domínio transmembrana, com exceção da E-NPP2, a qual pode ser secretada para o espaço extracelular. (STEFAN, JANSEN & BOLLEN, 2005). As E-NPPs são capazes de hidrolisar o ATP diretamente à AMP e, por tanto, podem cancelar a sinalização purinérgica através dos receptores P2. Contudo, as E-NPPs apresentam uma ampla especificidade por substratos e somente as E-NPP1-3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos e assim ser relevantes no contexto da sinalização purinérgica (STEFAN, JANSEN & BOLLEN, 2005). Cabe destacar também que as E-NPPs possuem ampla distribuição tecidual, o que lhe confere múltiplos papéis biológicos, incluindo reciclagem de nucleotídeos, proliferação e motilidade celular (KUKULSKI, LÉVESQUE, & SÉVIGNY, 2011; STEFAN, JANSEN & BOLLEN, 2005).

Juntamente com as E-NTPDases e as E-NPPs, a E-5'-nucleotidase também participa do metabolismo dos nucleotídeos de adenina extracelulares ao catalisar a hidrólise do AMP até adenosina e fosfato. A família das 5'-nucleotidase apresenta sete membros, sendo seis citosólicos e uma ecto-enzima, a E-5'-nucleotidase, que tem importante atuação no controle dos níveis extracelulares de adenosina e assim é responsável pela ativação dos receptores P1 (YEGUTKIN, 2008).

A E-5'-nucleotidase é amplamente distribuída nos tecidos, como rins, fígado, endotélio vascular, plaquetas e células do sistema imune e tem se demonstrado ser co-expressa com a E-NTPDase, sendo juntas consideradas uma importante via de controle dos níveis dos nucleotídeos extracelulares e de produção de adenosina

(BONO et al., 2015; COLGAN et al., 2006; YEGUTKIN, 2008). Por favorecer a produção de adenosina, a E-5'-nucleotidase desempenha importantes funções conforme o tecido ou célula em que está presente, incluindo a inibição da agregação plaquetária e a regulação do tônus vascular, sendo assim uma enzima de relevância para os processos de cardioproteção (FERRARI et al., 2015).

Entretanto, em linfócitos a expressão da E-5'-nucleotidase varia de acordo com o subtipo celular e a condição do sistema imune. De forma geral, os linfócitos apresentam essa enzima predominantemente intracelular e em baixa expressão na superfície celular (BONO et al., 2015; LEAL et al., 2005). Linfócitos Treg e linfócitos B apresentam maior expressão da E-5'-nucleotidase superficial, mas nessas células a enzima não apresenta apenas a função de imunossupressão através da produção de adenosina, mas também está relacionada ao processo de maturação e diferenciação celular, em que após a sua ativação rapidamente diminui a atividade e expressão (BONO et al., 2015).

Da mesma forma que as ectonucleotidases já mencionadas, a enzima ADA, além da isoforma solúvel, também se apresenta ancorada à membrana celular e faz parte do conjunto de enzimas do sistema purinérgico. Por desaminação da adenosina e consequente formação de inosina, essa enzima tem a importante função de controlar os níveis de adenosina extracelular e, assim, regular diversos processos como a inflamação e estados pró-trombóticos (FRANCO et al., 1997; YEGUTKIN, 2008).

Estudos do nosso grupo de pesquisa têm evidenciado significativas modificações na atividade e na expressão das enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5'-nucleotidase e ADA em diversas condições patológicas, como a hipertensão (CARDOSO et al., 2012, 2015), infarto agudo do miocárdio (BAGATINI et al., 2008), cardiopatia isquêmica (BAGATINI et al., 2011), diabetes (LUNKES et al., 2003; SCHMATZ et al., 2013), esclerose múltipla (POLACHINI et al., 2014; SPANEVELLO et al., 2010), tabagismo (THOMÉ et al., 2012), câncer de pulmão (ZANINI et al., 2012), hipotireoidismo (BALDISSARELLI et al., 2016), entre outras (SCHETINGER et al., 2007).

Considerando que as alterações nas ectonucleotidases e na ADA em condições patológicas refletem uma importante participação do sistema purinérgico no controle ou na progressão dessas desordens, também se torna interessante elucidar as possíveis conexões entre essas enzimas purinérgicas e as condições

relacionadas à SMet, incluindo as alterações plaquetárias e o perfil pró-inflamatório, já que há pouco conhecimento disponível sobre o sistema purinérgico na SMet. Além disso, esse complexo sistema enzimático tem sido alvo de novos agentes farmacológicos, em especial para as doenças em que ainda não há um tratamento medicamentoso eficiente, como a SMet quando analisada em seu contexto geral (MATHIEU, 2012; SADIKOT & HERMANS, 2010).

A SMet, de fato, não possui um tratamento medicamentoso específico, mas sim um conjunto de medicamentos em que cada um atua especificamente sobre um fator de risco cardiovascular, como anti-hipertensivos, hipolipemiantes e hipoglicemiantes. Entretanto, os fatores de riscos ocultos, como os estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios, que surgem a partir da interação dos fatores de risco clássicos da SMet, não apresentam um tratamento específico. O tratamento com os medicamentos específicos para cada fator de risco representa a diminuição de apenas 50% do risco total de DCV na SMet (SADIKOT & HERMANS, 2010). Cabe destacar que o captopril, a metformina e a sinvastatina têm sido os medicamentos de maior escolha para o tratamento da SMet (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

Apesar dos medicamentos utilizados no tratamento da SMet fazerem parte do programa Farmácia Popular desenvolvido pelo Governo Federal Brasileiro, o que permite uma facilidade de acesso ao tratamento pela população, os mesmos ainda não são suficientes para minimizar o número de casos e os riscos associados à SMet. Neste contexto, o tratamento não-farmacológico ganha destaque, uma vez que permite através de modificações no estilo de vida uma melhora nas respostas aos tratamentos e na qualidade da saúde desses pacientes (MATSUO et al., 2015).

A adoção de estilos de vida relacionados à manutenção da saúde, como dieta adequada e prática regular de exercícios físicos são componentes básicos não só no tratamento, mas também na prevenção da SMet. A adoção de um plano alimentar saudável é fundamental no tratamento da SMet. Entretanto, ele deve ser cautelosamente elaborado e de forma individualizada a fim de prever uma redução de peso sustentável de 5% a 10% do peso corporal inicial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

O exercício físico, contudo, é um fator determinante no aumento do gasto calórico e é fundamental para o balanço energético e o controle de peso. Estudos evidenciam de forma clara que o exercício atenua os riscos de doenças crônicas e

melhora a expectativa de vida, além de ter efeitos significativos sobre condições patológicas em que a disfunção metabólica e o desequilíbrio energético são o dilema desafiador, tais como DMT2, obesidade e SMet (CAMPOS, GOMES & FERREIRA, 2013; CHURCH, 2011; PEERIA & AMIRI, 2015; SHEPHARD & BALADY, 1999).

Entre os efeitos benéficos do exercício físico relacionados à condição da SMet, se destacam a capacidade de ativar enzimas lipolíticas no músculo esquelético, induzindo à lipólise e à redução do tecido adiposo. Conseqüentemente, o exercício promove redução dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, aumento nos níveis de HDL, além do aumento da massa magra e redução da adiposidade total e abdominal, em grande parte independente da perda de peso (PEDERSEN & SALTIN, 2015).

Da mesma forma, o exercício regular atua positivamente no controle do nível glicídico. O aumento da rede capilar e do fluxo sanguíneo nos músculos a partir do exercício favorecem um maior transporte de glicose, um aumento na sua captação pelas fibras musculares esqueléticas e na sensibilidade à insulina, promovendo, assim, a redução da glicemia (PEDERSEN & SALTIN, 2015).

Como aumenta o fluxo sanguíneo, o exercício aumenta a força de cisalhamento na parede dos vasos, o que se presume ser um estímulo para a produção endotelial de óxido nítrico, o qual induz o relaxamento das células do músculo liso. Assim, o treinamento regular também é capaz de promover a vasodilatação e a redução da pressão arterial (MCALLISTER, HIRAI & MUSCH, 1995).

Além de ser capaz de reduzir os fatores de risco cardiovasculares que constituem a SMet, a prática regular de exercício físico também tem demonstrado potenciais efeitos sobre os fatores de riscos ocultos. O treinamento melhora a capacidade antioxidante e anti-inflamatória, reduz a esteatose hepática e diminui os riscos relacionados à condição pró-trombótica por melhorar a função endotelial e cardiorrespiratória (MONTESI et al., 2013; PEDERSEN & SALTIN, 2015; SHEPHARD & BALADY, 1999; WANG et al., 2014).

O exercício regular de intensidade moderada também melhora a função mitocondrial através de mecanismos como aumento da biogênese mitocondrial e do transporte de glicose, eliminação do dano mitocondrial por autofagia e, conseqüentemente, inibe a inflamação por controlar a produção mitocondrial de EROs (PEERI & AMIRI, 2015). Todos esses efeitos, porém, cessam na ausência ou

inadequação do estímulo ao exercício, reforçando a importância da regularidade e a orientação correta do programa de treinamento (PEDERSEN & SALTIN, 2015).

Como recomendações gerais de exercícios para pacientes com SMet se enquadram a prática de pelo menos 30 minutos de atividade física leve a moderada de forma contínua ou acumulada na maioria dos dias de semana, incluindo mudanças no cotidiano, como por exemplo usar escadas e não elevadores. De forma mais específica entram as seguintes recomendações: exercício do tipo aeróbio ou resistido, com frequência de 3 a 5 vezes por semana, de duração de 30 a 60 min e com intensidade moderada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

Entretanto, essas recomendações diferem entre os estudos, de forma que ainda não há um consenso sobre o melhor programa de treinamento para pacientes com SMet (da SILVA et al., 2012; DRIGNY et al., 2011; GREENWOOD et al., 2016). Dessa forma, apesar do amplo conhecimento em relação aos benefícios do exercício físico na condição da SMet, ainda são necessários mais estudos no sentido de se conhecer o tipo de treinamento capaz de alcançar o máximo de resultados positivos para a saúde desses pacientes.

De fato, o treino resistido estimula mudanças como: aumento de massa corporal e da densidade óssea, bem como melhora a coordenação inter e intramuscular (DUDLEY & FLECK, 1987). Já o treino aeróbico desencadeia resultados não menos importantes e consegue aumentar de maneira singular o consumo máximo de oxigênio, as atividades das enzimas oxidativas, os estoques de glicogênio intramuscular, a densidade e capacidade mitocondrial dos músculos, o débito cardíaco, a densidade capilar, podendo ainda elevar o controle da saturação da hemoglobina (HAKKINEN et al., 2003).

Dessa forma, tem sido proposto que ambos os tipos de exercícios são importantíssimos para a saúde, tornando ambos indispensáveis para um programa habitual de exercícios físicos. Assim, o termo treinamento concorrente se refere a programas que combinam treinamento de força (resistido) e o treinamento aeróbio em uma mesma seção e tem recebido destaque para o tratamento não-farmacológico de DCV (COLATO et al., 2014; SHEPHARD & BALADY, 1999).

Adicionalmente, durante o exercício físico ocorre um aumento na concentração plasmática de ATP, o qual pode ser liberado via células endoteliais, eritrócitos ou células musculares em contração. O ATP liberado pode agir sobre os receptores P2 do endotélio vascular, promover vasodilatação e limitar o efeito



vasoconstritor simpático, preservando, assim, o fluxo sanguíneo adequado para o tecido ativo durante o exercício. Entretanto, esses efeitos do ATP são limitados, uma vez que essa molécula pode ser rapidamente degradada pelas ectonucleotidasas presentes na superfície das células do endotélio vascular ou das células sanguíneas circulantes (CRECELIUS, KIRBY & DINENNO, 2015).

Nesse sentido, o exercício, via atividade das ectonucleotidasas, tende a um aumento na concentração plasmática de adenosina, a qual é uma molécula cardioprotetora que inibe os efeitos inflamatórios e pró-trombóticos (LE, ESSACKJEE & BALLARD, 2014). Estas proposições demonstram claramente o envolvimento das ectonucleotidasas e do sistema purinérgico como um todo nos efeitos observados pela prática de exercícios físicos, já que os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina possuem papéis fundamentais em diversas patologias e seus desequilíbrios podem contribuir para maiores complicações.

Assim, tendo em vista que a SMet é acompanhada por alterações de metabolismo, de perfil trombótico e de perfil inflamatório e, desta forma, pode estar relacionada a mudanças na atividade das ectonucleotidasas em componentes sanguíneos, e que o exercício pode ter um papel modulador sobre essas variáveis, torna-se interessante o estudo dos mecanismos patofisiológicos desta doença e a possível contribuição do exercício físico no controle da mesma, como uma forma de tratamento não-medicamentoso.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar o efeito do exercício físico concorrente sobre a atividade de enzimas do sistema purinérgico e sobre parâmetros inflamatórios em pacientes com SMet.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os parâmetros antropométricos (peso, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal) e hemodinâmicos (pressão arterial), assim como o perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos) e o nível glicêmico em pacientes com SMet, antes e após um plano de exercício físico concorrente.
- Verificar, antes e após um plano de exercício físico concorrente, o nível dos parâmetros inflamatórios (PC-R, MPO e ácido úrico) e a contagem total de leucócitos e de linfócitos em pacientes com SMet.
- Determinar a taxa de agregação plaquetária em pacientes com SMet, antes e após um plano de exercício físico concorrente.
- Avaliar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5'-nucleotidase e ADA em plaquetas de pacientes com SMet, antes e após um plano de exercício físico concorrente.
- Avaliar, antes e após um plano de exercício físico concorrente, a atividade das enzimas E-NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com SMet.

## APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese estão apresentados na forma de um artigo publicado e um artigo aceito para publicação, os quais encontram-se no item “**ARTIGOS**”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

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

### **3. ARTIGOS**

#### **3.1 Artigo Publicado**

**Exercício regular reverte alterações nas ectonucleotidasas e reduz a hiperagregação de plaquetas em pacientes com síndrome metabólica**

**REGULAR EXERCISE TRAINING REVERSES ECTONUCLEOTIDASE  
ALTERATIONS AND REDUCES HYPERAGGREGATION OF  
PLATELETS IN METABOLIC SYNDROME PATIENTS**

**Caroline Curry Martins, Margarete Dulce Bagatini, Andréia Machado Cardoso,  
Daniela Zanini, Fátima Husein Abdalla, Jucimara Baldissarelli, Diéssica Padilha  
Dalenogare, Juliano Boufleur Farinha, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera  
Maria Morsch**

**Publicado na revista “CLINICA CHIMICA ACTA”**



## Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients



Caroline Curry Martins<sup>a</sup>, Margarete Dulce Bagatini<sup>a,b</sup>, Andréia Machado Cardoso<sup>a</sup>, Daniela Zanini<sup>a</sup>, Fátima Husein Abdalla<sup>a</sup>, Jucimara Baldissarelli<sup>a</sup>, Diéssica Padilha Dalenogare<sup>a</sup>, Juliano Boufleur Farinha<sup>a,c</sup>, Maria Rosa Chitolina Schetinger<sup>a</sup>, Vera Maria Morsch<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Post-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Collegiate of Nursing, University of Southern Frontier, Chapecó Campus, SC, Brazil

<sup>c</sup> Physical Activity Group, Center of Physical Education and Sports, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 May 2015

Received in revised form 17 December 2015

Accepted 18 December 2015

Available online 21 December 2015

#### Keywords:

Metabolic syndrome

Ectonucleotidases

Exercise training

Platelet aggregation

### ABSTRACT

**Background:** Alterations in the activity of ectonucleotidase enzymes have been implicated in cardiovascular diseases, whereas regular exercise training has been shown to prevent these alterations. However, nothing is known about it relating to metabolic syndrome (MetS). We investigated the effect of exercise training on platelet ectonucleotidase enzymes and on the aggregation profile of MetS patients.

**Methods:** We studied 38 MetS patients who performed regular concurrent exercise training for 30 weeks. Anthropometric measurements, biochemical profiles, hydrolysis of adenine nucleotides in platelets and platelet aggregation were collected from patients before and after the exercise intervention as well as from individuals of the control group.

**Results:** An increase in the hydrolysis of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and a decrease in adenosine deamination in the platelets of MetS patients before the exercise intervention were observed ( $P < 0.001$ ). However, these alterations were reversed by exercise training ( $P < 0.001$ ). Additionally, an increase in platelet aggregation was observed in the MetS patients ( $P < 0.001$ ) and the exercise training prevented platelet hyperaggregation in addition to decrease the classic cardiovascular risks.

**Conclusions:** An alteration of ectonucleotidase enzymes occurs during MetS, whereas regular exercise training had a protective effect on these enzymes and on platelet aggregation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lifestyles characterized by excessive calories intake and low practice of physical exercise are responsible for the high prevalence of metabolic syndrome (MetS), which represents a collection of cardiovascular risk factors: hypertension, hyperglycemia, dyslipidemia and abdominal obesity [1,2]. More than 312 million adults worldwide have been diagnosed with MetS and it is estimated that this number will rise to 1 billion by 2025. In Brazil, approximately 29.6% of the population have MetS and it is considered a public health problem [3].

Current treatments of MetS do not consider the cardiovascular risk factor associations, which are a greater damage than each risk factor alone by favoring pro-thrombotic and pro-inflammatory states [4]. Indeed, purinergic system, that is involved in modulation of inflammatory and thromboembolic processes, has been shown altered in cardiovascular diseases (CVD). Infarcted patients showed alterations in the activity

of ectonucleotidase enzymes in platelets [5], as well as patients with acute coronary syndrome, hypertension and diabetes [6–8]. However, the effects of MetS on purinergic enzymes are still unknown.

Ectonucleotidase enzymes are expressed on surface of several cells, including platelets, to hydrolyze extracellular nucleotides (ATP, ADP and AMP) and then controlling their levels. This enzymatic complex includes the enzymes E-NTPDase (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase), E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase), E-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) [9]. E-NTPDase hydrolyzes ATP and ADP in AMP [10], whereas the E-NPPs hydrolyze 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives to produce nucleotide monophosphate [11]. AMP, resulting from the actions of E-NTPDase and E-NPP, is subsequently hydrolyzed into adenosine by E-5'-nucleotidase [12].

Additionally, adenosine can be directly inactivated on the cell surface through the sequential actions of ADA, which catalyzes the irreversible deamination of adenosine and leads to inosine [13]. Together, these ecto-enzymes constitute a highly organized enzymatic cascade capable of regulating the extracellular concentrations of adenine

\* Corresponding author.

E-mail address: [veramorsch@gmail.com](mailto:veramorsch@gmail.com) (V.M. Morsch).

**ABSTRACT**

Alterations in the activity of ectonucleotidase enzymes have been implicated in cardiovascular diseases, whereas regular exercise training has been shown to prevent these alterations. However, nothing is known about it relating to metabolic syndrome (MetS). In this study, we investigated the effect of exercise training on platelet ectonucleotidase enzymes and on the aggregation profile of MetS patients. We studied 38 MetS patients who performed regular concurrent exercise training for 30 weeks. Anthropometric measurements, biochemical profiles, hydrolysis of adenine nucleotides in platelets and platelet aggregation were collected from patients before and after the exercise intervention as well as from individuals of the control group. An increase in the hydrolysis of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and a decrease in adenosine deamination in the platelets of MetS patients before the exercise intervention were observed ( $P<0.001$ ). However, these alterations were reversed by exercise training ( $P<0.001$ ). Additionally, an increase in platelet aggregation was observed in the MetS patients ( $P<0.001$ ) and the exercise training prevented platelet hyperaggregation in addition to decrease the classic cardiovascular risks. In conclusion, our results clearly indicated an alteration of ectonucleotidase enzymes during MetS, whereas regular exercise training had a protective effect on these enzymes and on platelet aggregation.

**Keywords:** Metabolic Syndrome; Ectonucleotidases; Exercise training; Platelet aggregation

## ***1 INTRODUCTION***

Lifestyles characterized by excessive calories intake and low practice of physical exercise are responsible for the high prevalence of metabolic syndrome (MetS), which represents a collection of cardiovascular risk factors: hypertension, hyperglycemia, dyslipidemia and abdominal obesity [1,2]. More than 312 million adults worldwide have been diagnosed with MetS and it is estimated that this number will rise to 1 billion by 2025. In Brazil, approximately 29.6% of the population have MetS and it is considered a public health problem [3].

Current treatments of MetS do not consider the cardiovascular risk factor associations, which are a greater damage than each risk factor alone by favoring pro-thrombotic and pro-inflammatory states [4]. Indeed, purinergic system, that is involved in modulation of inflammatory and thromboembolic processes, has been shown altered in cardiovascular diseases (CVD). Infarcted patients showed alterations in the activity of ectonucleotidase enzymes in platelets [5], as well as patients with acute coronary syndrome, hypertension and diabetes [6-8]. However, the effects of MetS on purinergic enzymes are still unknown.

Ectonucleotidase enzymes are expressed on surface of several cells, including platelets, to hydrolyze extracellular nucleotides (ATP, ADP and AMP) and then controlling their levels. This enzymatic complex includes the enzymes E-NTPDase (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase), E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase), E-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) [9]. E-NTPDase hydrolyzes ATP and ADP in AMP [10], whereas the E-NPPs hydrolyze 5'-phosphodiester bonds in nucleotides and their derivatives to produce nucleotide monophosphate [11]. AMP, resulting from the actions of E-NTPDase and E-NPP, is subsequently hydrolyzed into adenosine by E-5'-nucleotidase [12].

Additionally, adenosine can be directly inactivated on the cell surface through the sequential actions of ADA, which catalyzes the irreversible deamination of adenosine and leads to inosine [13]. Together, these ecto-enzymes constitute a highly organized enzymatic cascade capable of regulating the extracellular concentrations of adenine nucleotides and nucleoside. This cascade plays an important role in the maintenance of normal homeostasis and thrombogenesis by regulating platelet aggregation [14]. It is noteworthy that micromolar concentrations of ADP can act in platelet P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> receptors and induce human platelet aggregation, whereas adenosine (the final product of ATP hydrolysis) can inhibit platelet aggregation [15].

Recent studies have demonstrated a potential effect of the physical exercise in reversing purinergic system alterations during CVD [16, 17], while epidemiological and clinical studies have demonstrated that regular physical exercise is an important factor to the prevention and treatment of MetS [18-20]. Concurrent training, which combines aerobic and strength exercises in the same training session, has shown benefits in insulin action, endothelial function, lean body mass, and glycemic control (especially when the exercise is performed in moderate intensity and regularly) [19]. Therefore, concurrent training can act on all the cardiovascular risk factors simultaneously and can be a powerful tool to improve the quality of life in patients with MetS [21]. Besides, it was observed in animal models that the exercise training induces a downregulation in the activity of ectonucleotidase enzymes, which results in a protective effect against hypertension [16]. However, the effect of exercise training on ectonucleotidase activities in patients with MetS is still unknown.

Taking into account that exercise training exerts a modulating effect on ectonucleotidase activities and that we hypothesized that ectonucleotidase activities can be altered in the platelets of MetS patients, including impairment of vascular homeostasis, we investigated the effect of 30 weeks of regular concurrent training on the activity of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides and nucleoside in the platelets of patients with MetS. Exercise training is widely known to benefit the cardiovascular system. However, studying the association between the activity of ectonucleotidases in MetS patients and the influence of exercise on these enzymatic activities can be a source of information for producing new treatments for MetS.

## ***2 PATIENTS AND METHODS***

### ***2.1 Chemicals***

Nucleotides, sodium azide, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), and the Trizma base were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and highest purity.

### ***2.2 Metabolic syndrome patients***

Thirty-eight volunteer MetS patients from the study group at the Center of Physical Education at the Federal University of Santa Maria were selected for this study. The MetS patients were recruited through a single-stage, using a random sampling with ages between 55 and 65 years and a representative number of both sexes. MetS was characterized according to



the classification of the National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP - ATP III, 2001) [22].

All subjects signed the consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center at the Federal University of Santa Maria, protocol number 19435813.8.0000.5346, Brazil.

The first collection of samples was carried out during the diagnosis of MetS patients, which constituted the MetS pre-intervention measurements. Then, the MetS group conducted the exercise intervention for thirty weeks. Approximately 24 hours after the last exercise session, the second collection of samples was carried out, which constituted the MetS post-intervention measurements. Ten milliliters of peripheral blood were collected by venipuncture from each patient pre- and post-intervention to isolate platelets and obtaining serum.

### ***2.3 Exercise intervention***

The exercise plan proposed for the MetS patients was concurrent and moderate with aerobic and resistance exercises. The supervised training took place in the Physical Education and Sports Center gym of the Federal University of Santa Maria. MetS patients initially received a training adaptation for the exercises with a low intensity indoor walking for 10 min and resistance training with few exercises and low volume and intensity for familiarization of movement performance technique. After one week of adaptations, the volunteers performed the exercise training during 30 weeks, and the activities were performed three times a week totaling 90 sessions. Volume and intensity of training were progressive to avoid adaptations to stimuli caused by exercise and a good technique practice was emphasized, reducing the potential for excessive muscle soreness and injury.

For aerobic training, the volunteers were instructed to walk on a moderate rate for about 30 minutes in the first weeks. After, they increased the walk intensity over the months to about 45 minutes with relatively fast speed.

In resistance training, the practice initially was performed with only 4 different types of exercises. Every two weeks, a different exercise was added to the plan totaling 11 types of exercises: chest press, rower machine, lat pull-down, triceps pulley extension, biceps curl, leg press, leg curl, ankle plantar flexion, hip abduction, hip adduction and abdominals. The MetS patients performed all exercises in three sets of ten repetitions with an interval of 1' to 1'30'' between sets and 2' to 3' between exercises, alternating upper and lower resistance machines. The intensity of the work was set at 70% of the maximum force, which was calculated for each

patient using the test of the repetition maximum [23]. This test is used to determine the approximate percentage of the workload for resistance. In the end of the sessions, the stretching was performed individually, with emphasis in the upper and lower back, shoulders, arms, chest, abdomen, thighs and calves.

#### ***2.4 Control subjects***

Thirty healthy patients were recruited from the study group at the Center of Physical Education at the Federal University of Santa Maria through a single-stage, using a random sampling. They were aged between 55 and 65 years, both sexes, with normal blood pressure and were free of diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, alcoholism, cigarette smoking, or chronic diseases. Moreover, they had received no pharmacological therapy during the month before the study and had no cardiovascular disease.

No exercise intervention was assigned to the control subjects, and all of them signed the consent to take part in the study. Ten milliliters of peripheral blood were collected by venipuncture from each patient and used for the isolation of platelets and for obtaining serum.

#### ***2.5 Anthropometric characteristics and blood tests***

We measured the height, body weight, and abdominal circumference in all subjects studied. The body mass index (BMI) was calculated as the subject's weight divided by their height squared ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). The morning blood pressure was recorded between 7 and 9 a.m. after subjects had been in a relaxed state for at least 10 min. The blood was collected after 12 h of overnight fasting in tubes without an anticoagulant system and centrifuged at  $1800 \times g$  for 10 min. The precipitate was discarded, and the serum was used to determine the level of HDL, total cholesterol, triglycerides, and glucose using standard enzymatic methods with Ortho-Clinical Diagnostics<sup>®</sup> reagents on a fully automated analyzer (Vitros<sup>®</sup> 950 dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). The level of LDL-cholesterol (mg/dl) was calculated by using the Friedewald formula:  $[\text{total cholesterol (mg/dl)} - [\text{HDL-cholesterol (mg/dl)} + (\text{triglyceride (mg/dl)}/5)]]$ . Total blood with EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) was used to determine the total platelet count and the mean platelet volume (MPV) with a Coulter-STKS analyzer (USA).

#### ***2.6 Platelet isolation***

The platelets were prepared from human donors using the method of Pilla et al. [24] and modifications from Lunkes et al. [7]. Briefly, blood was collected into 0.129 mol/l citrate, and the total blood-citrate system was centrifuged at 160 x g for 15 min to remove residual blood cells. The platelet-rich plasma (PRP) was centrifuged at 1400 x g for 15 min and washed twice with 3.5 mmol/l HEPES isosmolar buffer. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer, and the protein was adjusted to 0.4–0.6 mg/ml.

### **2.7 LDH**

The integrity of the platelet preparations was confirmed by determining the lactate dehydrogenase (LDH) activity, which was obtained after platelet lysis with 0.1% Triton X-100 and comparing it with an intact preparation, using the Labtest kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

### **2.8 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities**

The E-NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 6 mmol/l glucose and 50 mmol/l Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 µl as described by Pilla et al. [24]. For AMP hydrolysis, the E-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described by Pilla et al. with modifications from Lunkes et al. [7, 24], except 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub> was replaced with 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>. Twenty microliters of the enzyme preparation (8–12 µg of protein) was added to the reaction mixture, and the mixture was pre-incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM and AMP at a final concentration of 2 mM. The incubation time was 60 min. Both enzyme assays were stopped with the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed using the method of Chan et al. [25] with malachite green as the colorimetric reagent and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as the standard. The controls were assessed to correct for the non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding the enzyme preparation after TCA addition. All samples were run in triplicate. The enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

### **2.9 E-NPP activity**

The ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) activity from platelets was assessed using p-nitrophenyl 5'-thymidinemonophosphate (p-Nph-5'-TMP) as a substrate as described by Fürstenau et al. [9]. The reaction medium containing 50 mmol/l Tris-HCl buffer, 120 mmol/l NaCl, 5.0 mmol/l KCl, 60 mmol/l glucose, and 5.0 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 8.9 was pre-incubated with approximately 20 mg per tube of platelet protein for 10 min at 37 °C at a final volume of 200 ml. The enzyme reaction was started by the addition of p-Nph-5'-TMP at a final concentration of 0.5 mmol/l. After 80 min of incubation, 200 ml NaOH 0.2 mol/l was added to the medium to stop the reaction. The amount of p-nitrophenol released from the substrate was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of  $18.8 \times 10^{-3}$ /mol/l/cm. All sample analyses were performed in triplicate. The enzyme activities were expressed as nmol p-nitrophenol released/min/mg protein.

### ***2.10 Adenosine deaminase activity***

ADA from platelets was determined according to the method of Guisti and Galanti [26] based on the Bertholet reaction, which is the formation of a colored indophenol complex from ammonia released from adenosine and quantified spectrophotometrically. Briefly, 50 µl of platelets were reacted with 21 mmol/l of adenosine pH 6.5 and incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia that occurs when ADA produces excess of adenosine. The protein content used for the platelet experiment was adjusted between 0.7 and 0.9 mg/ml. The results were expressed in U/l. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

### ***2.11 Platelet aggregation***

The preparation of PRP was obtained by centrifugation of citrated-blood for 15 min at 200 x g, and the platelet aggregation profile was evaluated using Born's method [27] by measuring turbidity with a Chrono-log optical aggregometer (AGGRO/IINK® Model 810-CA software for Windows ver. 5.1). Aggregation was measured at 37°C and expressed as the maximal percent change in light transmittance from baseline to 5 min after the agonist, ADP, was added. ADP was used at the 2.5 and 5 µmol/l concentrations. The results were expressed as the percentage of aggregation.

### ***2.12 Protein determination***

Protein amounts were determined with the Coomassie blue method using bovine serum albumin as a standard [28].

### **2.13 Statistical analysis**

Data were analyzed statistically using Graphpad Prism 5.0 software. First, a Shapiro-Wilk test was conducted to verify the normality of the data. With normally data, an unpaired Student's *t* test was performed to compare the control group with the MetS group pre- and post-exercise intervention, and paired Student's *t* test was used to compare the MetS group before and after the exercise intervention. However, when our data did not follow a normal distribution, Mann-Whitney U test was used to compare the control group with the MetS group pre- and post-exercise intervention, and Wilcoxon test was used to compare the MetS group before and after the exercise intervention. To indicate how closely two variables changed in relationship to each other, Pearson's correlation coefficient was used. Continuous variables are presented as the mean  $\pm$  SD, and the other variables are shown as percentages. The level of significance was set at 0.05 in all analyses.

## **3 RESULTS**

### **3.1 Anthropometric and Biochemical Characteristics**

The clinical characteristics, biochemical determinations and anthropometric parameters of the control, MetS pre- and MetS post-intervention groups are shown in Table 1. As expected, the MetS group had a high mean for all cardiovascular risk factors that are included in the MetS definition compared to the control group. However, at the end of thirty weeks of training, MetS group had a reduction in triglyceridemia to 44%, glycemia to 25%, systolic blood pressure to 14%, diastolic blood pressure to 10% and abdominal obesity to 14%, whereas the HDL cholesterol level increased by approximately 20% when compared to the mean values before the exercise intervention.

The MetS post-exercise intervention group showed glycemia and triglyceridemia levels that were statistically similar to the control group ( $P < 0.001$ ). For other cardiovascular factors, the MetS post-exercise intervention group showed a significant decrease in risk factors compared with MetS pre-exercise intervention group ( $P < 0.05$ ), and there was a tendency for these decreases to match the control group levels. Furthermore, we also observed a decrease in cardiovascular risk factors that not are included in the MetS definition, such as total cholesterol

and LDL cholesterol, in the MetS post-exercise intervention group when compared to the MetS pre-exercise intervention group ( $P<0.05$ ), and there were no differences in these parameters when they were compared to the control group.

### **3.2 Ectonucleotidases and ADA activities**

According to Table 2, the effect of the exercise training on E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities in platelets, ATP, ADP and AMP hydrolyses were significantly increased in MetS patients without exercise training (MetS) compared to the control group (approximately 127% higher for ATP, 60% for ADP and 114% for AMP;  $P<0.001$ ). However, after the exercise intervention, the MetS group (MetS Ex) had significant decreases in ATP, ADP, and AMP hydrolysis that approached the hydrolysis levels of the control group ( $P<0.001$ ).

Similar results were observed for the E-NPP enzyme (Table 2). Exercise training reversed the significant increase in enzymatic activity observed in the MetS group ( $P<0.001$ ). However, the ADA enzyme demonstrated the opposite results. As shown in Table 2, the MetS group had a significant decrease in ADA activity (52% less than the control group,  $P<0.001$ ). In contrast, exercise training increased the adenosine deamination for the MetS group, which reached similar ADA activity levels to the control group ( $P<0.001$ ).

### **3.3 Platelet aggregation**

The results for platelet aggregation showed that for both ADP concentrations (2.5  $\mu\text{mol/l}$  and 5  $\mu\text{mol/l}$ ), there was a significant decrease of platelet aggregation in the MetS group after the exercise intervention when compared to MetS patients before the exercise intervention (22% less for ADP 2.5  $\mu\text{mol/l}$  and 23% less for ADP 5.0  $\mu\text{mol/l}$ ), as shown in Table 2 ( $P<0.0001$ ). Additionally, the platelet aggregation observed in the MetS patients after exercise had similar values to the control group.

### **3.4 Correlation analysis**

To observe the possible connections between the ectonucleotidase activities in platelets and pro-thrombotic conditions present in MetS, we performed the correlation analysis between all the purinergic enzymes activities and parameters of lipid profile as well as platelet functionality. According to the data shown in Table 3, a significant positive correlation was observed between E-NTPDase activity to ATP and ADP hydrolysis and plasma triglycerides

(ATP:  $r=0.671$ ,  $P<0.001$ / ADP:  $r=0.452$ ,  $P<0.01$ ), MPV (ATP:  $r=0.414$ ,  $P<0.01$ / ADP:  $r=0.518$ ,  $P<0.001$ ), Platelet aggregation to ATP hydrolysis (ADP 2.5 $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.771$ ,  $P<0.001$ / ADP 5.0  $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.774$ ,  $P<0.001$ ) and Platelet aggregation to ADP hydrolysis (ADP 2.5 $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.634$ ,  $P<0.001$ / ADP 5.0  $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.698$ ,  $P<0.001$ ). However, opposite result was observed in the correlation between E-NTPDase activity and HDL-cholesterol (ATP:  $r=-0.443$ ,  $P<0.01$ / ADP:  $r=-0.336$ ,  $P<0.05$ ).

Similarly, platelet E-5'-nucleotidase and E-NPP activities demonstrated a significant positive correlation with plasma triglycerides level (E-5'-nucleotidase:  $r=0.579$ ,  $P<0.001$ / E-NPP:  $r=0.663$ ,  $P<0.001$ ) and platelet aggregation (E-5'-nucleotidase: ADP 2.5 $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.541$ ,  $P<0.01$  - ADP 5.0  $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.512$ ,  $P<0.01$ / E-NPP: ADP 2.5 $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.743$ ,  $P<0.001$  - ADP 5.0  $\mu\text{mol/l}$ :  $r=0.749$ ,  $P<0.001$ ), on the other hand they showed a negative correlation with HDL-cholesterol (E-5'-nucleotidase:  $r=-0.514$ ,  $P<0.001$ / E-NPP:  $r=-0.347$ ,  $P<0.05$ ) and no significant difference when they were correlated with MPV ( $P>0.05$ ), as shown in Table 3.

In contrast, according to the Table 3, we observed that the platelet ADA activity was positively correlated with the HDL-cholesterol ( $r=0.479$ ,  $P<0.01$ ), however negatively correlated with plasma triglycerides level ( $r=-0.485$ ,  $P<0.001$ ), MPV ( $r=-0.357$ ,  $P<0.05$ ) and Platelet aggregation (ADP 2.5 $\mu\text{mol/l}$ :  $r=-0.635$ ,  $P<0.001$ / ADP 5.0  $\mu\text{mol/l}$ :  $r=-0.647$ ,  $P<0.001$ )

#### **4 DISCUSSION**

The prescription of antihypertensive, hypoglycemic and lipid-lowering drugs is the clinical procedure to treat a patient with MetS. However, the “residual risk” or hidden risks, as oxidative stress, pro-thrombotic and pro-inflammatory processes that arise due to the associations between the risk factors, are not eliminate efficiently by these therapies [29, 30]. In this sense, physical exercise has been highlighted because it promotes favorable physiological adaptations, which may improve quality of life and attenuate the cardiovascular risk factors as well as the hidden risks present in MetS [18, 21].

In this study, regular exercise training was able to reduce blood pressure, triglyceridemia, glycemia and abdominal circumference, simultaneously to increase HDL cholesterol in MetS patients. Even though, the benefits of physical exercise for reducing classic cardiovascular risk factors are nothing new since several studies have demonstrated a direct relationship between physical inactivity and the presence of multiple risk factors, such as those found in MetS [16-21, 31]. However, it is noteworthy that the full potential of exercise training for treatment and prevention of MetS is still poorly explored because its effects on hidden risks

is not well understood [30]. Additionally, considering that the purinergic system plays an important role in the control of thrombotic processes [32], which represents one of the MetS hidden risks, we analyzed the purinergic enzymes and the effect of exercise training on these enzymes in platelets.

Alterations in purinergic enzyme activities have been verified in CVDs, suggesting that these enzymes are important pathological parameters by controlling the adenine nucleotide and nucleoside levels [5-8, 16, 32]. Corroborating with these findings, we also observed that the ectonucleotidase activities of platelets were altered in MetS patients through activation of E-NTPDase, E-NPP and E-5'-nucleotidase enzymes and inhibition of ADA enzyme, which could result in a depletion of ATP, ADP and AMP levels as well as elevate adenosine levels. Similar enzymatic activities were observed in platelets of patients with acute coronary syndrome, acute myocardial infarction, hypertension and diabetes [6-8], suggesting that these enzymatic activities could be a cardiovascular compensatory mechanism, since ATP and ADP can induce platelet aggregation whereas adenosine is a cardioprotector molecule that induces vasodilatation and inhibits platelet aggregation [5, 32]. Then, the compensatory mechanism may also be present in MetS and the high adenosine production by ectonucleotidase enzymes could be a platelet response to metabolic imbalance and an attempt to maintain the homeostasis [5, 6].

Nonetheless, it is interesting to note that despite the compensatory mechanism by ectonucleotidase activities in platelets was activated, the platelet aggregation in the MetS patients before the exercise intervention was higher than the healthy subjects for both agonist concentrations. Similarly, the MPV, which reflects the size and degree of platelet activation, was also significantly higher in MetS patients, conforming also observed by Santilli et al. [33]. As the total platelet count was similar in all groups, the activated and hyperaggregator profile of the platelets observed in MetS may be a result of platelet integrity loss caused by the set of MetS risk factors, including oxidative and inflammatory conditions as well as alterations in lipid profile [30, 34].

In fact, plasma triglycerides and its remnant lipoproteins have been correlated with platelet hyperaggregation whereas HDL has been considered an important platelet anti-aggregator [35, 36]. On the other hand, dyslipidemia and oxidative stress conditions can promote the formation of heavily oxidized HDL, which binds to platelets via CD36, like oxidized LDL and fatty acids do, thereby inducing platelet activation [36]. Then, the anti-aggregator mechanism via ectonucleotidase activities may not be enough to hold these



dyslipidemia pro-aggregatory conditions present in MetS. Likewise, it has been proposed that CD36 action is modulated by ecto-enzymes as E-NTPDase [37]. Corroborating with this hypothesis, we observed a significant correlation between all ectonucleotidase activities in platelet, especially E-NTPDase activity, and plasma triglycerides, HDL-cholesterol and platelet aggregation levels. Then, we may clearly infer with these results that ectonucleotidase enzymes play an important role in modulation of platelet activation and aggregation in conditions such as the MetS.

Comparatively, after exercise intervention, besides a reduction in all classic cardiovascular risks, we also demonstrated that MetS patients had a reversion of platelet ectonucleotidase activities to basal levels as well as a decrease in platelet aggregation. The same effect was observed by Cardoso et al. (2012) in platelets of hypertensive rats subjected to a swimming regimen [16]. Indeed, exercise training has been recognized by many beneficial effects that could be associated with the results mentioned previously, including: decrease in fat stores and plasma triglycerides, increase in caloric expenditure, higher metabolic rate at rest, improve insulin sensitivity, decrease inflammatory state, increase antioxidant defenses and elevate native HDL levels [38,39].

This way, regular exercise training could promote positive metabolic adaptations that ensure the platelet integrity and inactive the compensatory mechanism by ectonucleotidase enzymes [16]. Equally, some studies have reported that the use of antioxidant and anti-inflammatory substances could modulate the activity of ectonucleotidases in platelets since they are membrane enzymes and the membrane integrity could influence their conformational state [40-42]. On this basis, we may infer that lower production of pro-inflammatory molecules and higher scavenging of reactive oxygen species caused by regular exercise training could favor the reversion in ectonucleotidase activities of platelets during the MetS.

Concomitantly, exercise training is also known to decrease plasma triglycerides and its remnant lipoproteins as well as to increase the native HDL levels regardless of the type and duration of exercise [39]. Likewise, the enhanced antioxidant defenses triggered by training could protect native HDL, ensuring that the HDL molecules have a higher affinity for receptors that suppress platelet activation instead of the CD36 on the platelet membrane [36]. Several studies have demonstrated that the increase in HDL levels by training is simultaneous to a decrease in MPV and in platelet aggregation degree, which highlights HDL as antithrombotic molecule and the importance of the training in modulation its levels [43]. Apart from these findings, we also observed that the higher HDL level after exercise intervention in MetS

patients was correlated with a decrease in ectonucleotidase activities in platelets. Perhaps, these data could be correlated to lower binding of oxidized HDL or triglycerides-rich lipoproteins remnant to the CD36 receptor on platelets and consequently lower involvement of these ecto-enzymes after exercise intervention.

In addition, during exercise training high ATP rates are hydrolyzed by ATPases present in endothelial cells and in plasma [44], which leads to larger AMP plasma concentrations. Consequently, a higher adenosine level can be produced through the action of E-5'-nucleotidase enzyme. Notably, the activity of the E-5'-nucleotidase enzyme in platelet of MetS patients remained slightly increased after the exercise intervention when compared to the healthy subjects. In fact, the cardiovascular benefits of exercise have been associated to its ability to increase adenosine levels and the density of A<sub>2A</sub> receptors in the tissues and cells [45,46]. As a result, exercise training could stimulate E-5'-nucleotidase enzyme as a strategy to produce adenosine and cardiovascular protection, which induces an inhibitory aggregator effect on platelets via A<sub>2A</sub> receptors, as also observed for other CVD, such as hypertension and heart failure [16, 21] .

Thereafter, we could infer that MetS patients have a propensity to pro-thrombotic state, characterized by changes in the activity of ectonucleotidase enzymes and an increase in platelet aggregation, whereas regular exercise training plays an important role in reversions of ectonucleotidase activities and in reduction of platelet hyperaggregation in MetS patients. The exercise training may restore the metabolic balance, ensuring regulation of lipid profile, maintenance of platelet cellular integrity and then triggering anti-thrombotic effects and cardiovascular protection. Overall, we may highlight the exercise as an important tool against MetS complications, both for its multiple benefits, including the reduction of pro-thrombotic state, as the easy accessibility for the general population.

#### ***5 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT***

All authors report no conflicts of interest.

#### ***6 ACKNOWLEDGMENTS***

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the FINEP research

grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” and “*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia*” (INCT) for their financial support of this work.

## 7 REFERENCES

- [1] Buscemi S, Sprini D, Grosso G, Galvano F, Nicolucci A, Lucisano G, et al. Impact of lifestyle on metabolic syndrome in apparently healthy people. *Eat Weight Disord-ST* 2014;19: 225-32.
- [2] Grundy SM. Does the metabolic syndrome exist? *Diab Care* 2006;29:1689–92.
- [3] Vidigal FC, Bressan J, Babio N, Salas-Salvado J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. *BMC Public Health* 2013;13:1198.
- [4] Russo I. The Prothrombotic Tendency in Metabolic Syndrome: Focus on the Potential Mechanisms Involved in Impaired Haemostasis and Fibrinolytic Balance. *Scientifica (Cairo)* 2012; 2012: ID 525374, 1-17.
- [5] Bagatini MD, Martins CC, Spanevello RM, Rosa CS, Gonçalves JF, Schetinger MRC, et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2008;41: 1181–5.
- [6] Bagatin MD, Martins CC, Gasparetto D, Spanevello RM, Becker LV, Rosa CS, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chimica Acta* 2011;412: 159–64.
- [7] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzantti CM, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2003;109;189– 94.
- [8] Lunkes DS, Lunkes GI, Ahmed M, Morsch AL, Zanin RF, Maldonado PA, et al. Effect of different vasodilators on NTPDase activity in healthy and hypertensive patients. *Thromb Res* 2009;124:268–74.
- [9] Fürstenau CR, Trentin DS, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JJF. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006;17:84–91.
- [10] Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ecto-nucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006;2:409–30.

- [11] Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 2005;30:542–50.
- [12] Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006;2:351–60.
- [13] Blackburn MR, Kellems RE. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol* 2005;86:1–41.
- [14] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:673–94.
- [15] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JFH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, et al. Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 2003;1:2497–509.
- [16] Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D, Schmatz R, et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2012; 371:147–56.
- [17] Siqueira IR, Elsner VR, Rilho LS, Bahlis MG, Bertoldi K, Rozisky JR, et al. A neuroprotective exercise protocol reduces the adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes and serum of rats. *Brain Res* 2010;1316:173-80.
- [18] Wareham NJ, Hennings SJ, Byrne CD. A quantitative analysis of the relationship between habitual energy expenditure, fitness and the metabolic cardiovascular syndrome. *Br J Nutr* 1998;80:235-41.
- [19] Colato A, Abreu F, Medeiros N, Lemos L, Dorneles G, Ramis T, et al. Effects of concurrent training on inflammatory markers and expression of CD4, CD8, and HLA-DR in overweight and obese adults. *J Exerc Sci Fit* 2014;12: 55-61.
- [20] Malin SK, Niemi N, Solomon TPJ, Haus JM, Kelly KR, Filion J, et al. Exercise training with weight loss and either a high or low glycemic diet reduces metabolic syndrome severity in older adults. *Ann Nutr Metab* 2012;61:135–41.
- [21] de Meirelles LR, Matsuura C, Resende Ade C, Salgado AA, Pereira NR, Coscarelli PG, et al. Chronic exercise leads to antiaggregant, antioxidant and anti-inflammatory effects in heart failure patients. *Eur J Prev Cardiol* 2014;21:1225-32.
- [22] Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.

- [23] Brzycki M. Strength Testing—Predicting a One-Rep Max from Reps-to-Fatigue. *JOPERD* 1993;64:88-90.
- [24] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225–30.
- [25] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375–80.
- [26] Guisti G, Galanti B. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie 1984; 315–23.
- [27] Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927–9.
- [28] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:218–54.
- [29] Sadikot S, Hermans M. Here we go again... The metabolic syndrome revisited! *Diab & Met Synd: Clin Res & Rev* 2010;4:111–20.
- [30] Hutcheson R, Rocic P. The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012, ID 271028:1-13.
- [31] Kim DY, Jung SY. Effect of Aerobic Exercise on Risk Factors of Cardiovascular Disease and the Apolipoprotein B / Apolipoprotein A-1 Ratio in Obese Woman. *J. Phys. Ther. Sci* 2014; 26:1825–29.
- [32] Schetinger MR, Morsch VM, Bonan C, Wyse A. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2007;31:77–98.
- [33] Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davi G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev* 2012; 13:27-42.
- [34] Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Scien* 2009; 84:705-12.
- [35] Olufadi R, Byrne CD. Effects of VLDL and remnant particles on platelets. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35(3-4):281-91.
- [36] Van der Stoep M, Korporaal SJA, Van Eck M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. *Cardiovasc res* 2014; 103:362-71.

- [37] Kannan S. E-NTPase/E-NTPDase: a potential regulatory role in E-kinase/PKA-mediated CD36 activation. *Cell Biol Int* 2003; 27:153-63.
- [38] Campos JC, Gomes KMS, Ferreira JCB. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food Chem Toxicol* 2013; 62:107-19.
- [39] Shephard RJ, Balady GJ. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 1999; 99:963-72.
- [40] Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R, Bagatini M, Stefanello N, Correa M, et al. Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. *Brain Res Bull* 2009; 80:45-51.
- [41] Anwar J, Spanevello RM, Pimentel VC, Gutierrez J, Thomé G, Cardoso A, et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenosine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 56:459-66.
- [42] Schmatz R, Mann TR, Spanevello R, Machado MM, Zanini D, Pimentel VC, et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenosine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Biophys* 2013; 65:129-43.
- [43] Shah B, Sha D, Xie D, Mohler ER, Berger JS. The relationship between diabetes, metabolic syndrome, and platelet activity as measured by mean platelet volume: the National Health And Nutrition Examination Survey, 1999-2004. *Diabetes Care* 2012; 35(5):1074-8.
- [44] Li J, King NC, Sinoway LI. Interstitial ATP and Norepinephrine Concentrations in Active Muscle. *Circulation* 2005;111:2748-51.
- [45] Mizuno M, Kimura Y, Tokizawa K, Ishii K, Oda K, Sasaki T, et al. Greater adenosine A2A receptor densities in cardiac and skeletal muscle in endurance-trained men: a [<sup>11</sup>C]TMSX PET study. *Nucl Med Biol* 2005;32:831-6.
- [46] Le GY, Essackjee HC, Ballard HJ. Intracellular adenosine formation and release by freshly-isolated vascular endothelial cells from rat skeletal muscle: effects of hypoxia and/or acidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 450:93-8.

## 8 TABLES

**Table 1** - Baseline characteristics of the study population (Control n=30; MetS n=38).

	CT	MetS Pre-Ex	MetS Post-Ex
<i>Cardiovascular risk factors included in metabolic syndrome</i>			
Glycemia (mg/dl)	79.6 ± 11.5	115.5 ± 23.2**	86.7 ± 14.9#
SBP (mmHg)	109 ± 10	138.6 ± 13.2**	119.4 ± 12.1*,#
DBP (mmHg)	72 ± 6	87 ± 13**	79.12 ± 5.8*,#
Triglyceridemia (mg/dl)	78.68 ± 26	183.1 ± 60**	103 ± 38.2#
HDL cholesterol (mg/dl)	59.2 ± 12.4	41.9 ± 6.2**	50.3 ± 13.9*,#
Waist circumference (cm)	84.2 ± 11.8	112.2 ± 14.8**	96.7 ± 10.2*,#
<i>Cardiovascular risk factors not included in metabolic syndrome</i>			
Age (yr)	58.3 ± 2.8	59.4 ± 3.0	59.4 ± 3.0
Men/Woman	13/17	15/23	15/23
Total cholesterol (mg/dl)	120.7 ± 15.9	175.1 ± 26.8**	130.9 ± 20.1#
LDL cholesterol (mg/dl)	74.3 ± 32.2	99.1 ± 24.5**	78.2 ± 35.9#
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	23.2 ± 3.3	35.13 ± 5.13**	34.9 ± 5.6**
Platelet count (total cells/μl)	208.5 ± 54.9	213.4 ± 64.9	197.1 ± 44.4
MPV (fl)	7.0 ± 0.55	7.82 ± 1.15**	7.1 ± 0.41**

Data are reported as means ± SD. CT = Control subjects; MetS Pre-Ex = Metabolic syndrome pre-exercise intervention; MetS Post-Ex = Metabolic syndrome post-exercise intervention. \* indicates statistically significant differences with P<0.05 and \*\* indicate significant differences with P<0.001 when compared to control group (unpaired Student's *t* or Mann-Whitney U test). # indicate a statistically significant difference compared to MetS Pre-Ex (P<0.05, paired *t* test or Wilcoxon test).

**Table 2** - Activities of ectonucleotidase enzymes and aggregation profile in platelets of the control subjects (n=30) and MetS group (n=38) before and after the exercise intervention.

ENZYME/TEST	CT	MetS Pre-Ex	MetS Post-Ex
E-NTPDase to ATP (nmol Pi/min/mg protein)	10.48 ± 1.66	25.27 ± 9.74**	13.55 ± 2.00 <sup>#</sup>
E-NTPDase to ADP (nmol Pi/min/mg protein)	7.25 ± 1.31	11.54 ± 3.61**	7.97 ± 2.53 <sup>#</sup>
E-5'-nucleotidase to AMP (nmol Pi/min/mg protein)	2.72 ± 0.59	5.97 ± 1.00**	3.75 ± 1.42 <sup>*,#</sup>
E-NPP to 5'-TMP (nmol p-nitrophenol released/min/mg protein)	0.89 ± 0.61	6.07 ± 3.55**	1.30 ± 0.40 <sup>#</sup>
ADA to Adenosine - (U/L)	4.75 ± 0.88	2.27 ± 1.08**	4.37 ± 1.24 <sup>#</sup>
Agregation Profile with ADP 2.5µmol/l - (%)	49.46 ± 5.59	78.00 ± 7.77**	55.78 ± 5.31 <sup>#</sup>
Agregation Profile with ADP 5.0µmol/l - (%)	68.00 ± 4.33	88.89 ± 6.17**	68.89 ± 3.48 <sup>#</sup>

Data are reported as means ± SD. CT = Control subjects; MetS Pre-Ex = Metabolic syndrome pre-exercise intervention; MetS Post-Ex = Metabolic syndrome post-exercise intervention. \* indicates statistically significant differences with P<0.05 and \*\* indicate significant differences with P<0.001 when compared to control group (unpaired Student's *t* or Mann-Whitney U test). # indicate a statistically significant difference compared to MetS Pre-Ex (P<0.001, paired t test or Wilcoxon test).



**Table 3** – Pearson’s correlation between activities of ecto-nucleotidase enzymes in platelet and pro-thrombotic risk factors ( $n=14$  to each group).

	E-NTPDase activity to ADP hydrolysis		E-NTPDase activity to ATP hydrolysis		E-5'-nucleotidase activity		E-NPP activity		ADA activity	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
HDL-cholesterol level (mg/dl)	-0.336	<0.05	-0.443	<0.01	-0.514	<0.001	-0.347	<0.05	0.479	<0.01
Plasma triglycerides level (mg/dl)	0.452	<0.01	0.671	<0.001	0.579	<0.001	0.663	<0.001	-0.485	<0.001
Mean platelet volume - MPV (fl)	0.518	<0.001	0.414	<0.01	0.218	>0.05	0.129	>0.05	-0.357	<0.05
Platelet aggregation (% to ADP 2.5 $\mu$ mol/l)	0.634	<0.001	0.771	<0.001	0.541	<0.01	0.743	<0.001	-0.635	<0.001
Platelet aggregation (% to ADP 5.0 $\mu$ mol/l)	0.698	<0.001	0.774	<0.001	0.512	<0.01	0.749	<0.001	-0.647	<0.001

### **3.2 Artigo Aceito para Publicação**

**Exercício físico regular modula positivamente as enzimas ectonucleotidasas em linfócitos de pacientes com síndrome metabólica**

**EXERCISE TRAINING POSITIVELY MODULATES THE  
ECTONUCLEOTIDASE ENZYMES IN LYMPHOCYTES OF  
METABOLIC SYNDROME PATIENTS**

**Caroline Curry Martins, Margarete Dulce Bagatini, Andréia Machado Cardoso, Daniela Zanini, Fátima Husein Abdalla, Jucimara Baldissarelli, Diéssica Padilha Dalenogare, Daniela Lopes dos Santos, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch.**

**Aceito para publicação pela revista “INTERNATIONAL JOURNAL OF SPORTS  
MEDICINE”.**

----- Mensagem encaminhada -----

**De:** International Journal of Sports Medicine

<[onbehalfof+jarduarte+fade.up.pt@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+jarduarte+fade.up.pt@manuscriptcentral.com)>

**Para:** [margaretebagatini@yahoo.com.br](mailto:margaretebagatini@yahoo.com.br)

**Enviadas:** Terça-feira, 19 de Julho de 2016 19:25

**Assunto:** International Journal of Sports Medicine - Decision on Manuscript ID IJSM-05-2016-5653-pb.R2

19-Jul-2016

Dear Prof. Bagatini:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EXERCISE TRAINING MODULATES THE ECTONUCLEOTIDASE ENZYMES IN METABOLIC SYNDROME PATIENTS" in its current form for publication in the International Journal of Sports Medicine.

The galley proofs will be sent to you within a few weeks. After receipt of your printing approval, your article will be published online ahead of print (eFirst) at [www.thieme-connect.com](http://www.thieme-connect.com). Please note that the date of the online publication is the definite publication date of your article.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the International Journal of Sports Medicine, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Jose Duarte

Editor, International Journal of Sports Medicine

[jarduarte@fade.up.pt](mailto:jarduarte@fade.up.pt)

# Exercise Training positively modulates the Ectonucleotidase Enzymes in Lymphocytes of Metabolic Syndrome Patients

## Authors

C. C. Martins<sup>1</sup>, M. D. Bagatini<sup>2</sup>, A. M. Cardoso<sup>1</sup>, D. Zanini<sup>1</sup>, F. Abdalla<sup>1</sup>, J. Baldissaroli<sup>1</sup>, D. P. Dalenogara<sup>1</sup>, D. L. dos Santos<sup>1</sup>, M. R. C. Schetinger<sup>1</sup>, V. M. M. Morsch<sup>1</sup>

## Affiliations

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil  
<sup>2</sup> Coordenação Acadêmica, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapeco, Brazil

## Key words

- metabolic syndrome
- E-NTPDase
- ADA
- exercise training
- inflammation

## Abstract

In this study, we investigated the cardiovascular risk factors as well as ectonucleotidase activities in lymphocytes of metabolic syndrome (MetS) patients before and after an exercise intervention. 20 MetS patients, who performed regular concurrent exercise training for 30 weeks, 3 times/week, were studied. Anthropometric, biochemical, inflammatory and hepatic parameters and hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside in lymphocytes were collected from patients before and after 15 and 30 weeks of the exercise intervention as well as from participants of the control group. An increase in the hydrolysis of

ATP and ADP, and a decrease in adenosine deamination in lymphocytes of MetS patients before the exercise intervention were observed ( $P < 0.001$ ). However, these alterations were reversed by exercise training after 30 weeks of intervention. Additionally, exercise training reduced the inflammatory and hepatic markers to baseline levels after 30 weeks of exercise. Our results clearly indicated alteration in ectonucleotidase enzymes in lymphocytes in the MetS, whereas regular exercise training had a protective effect on the enzymatic alterations and on inflammatory and hepatic parameters, especially if it is performed regularly and for a long period.

## Introduction

Metabolic syndrome (MetS) clusters several metabolic abnormalities that increase the risk for cardiovascular diseases (CVD) and diabetes, including hyperglycemia, hypertension, dyslipidemia and central obesity [11]. Each of the individual components of MetS *per se* is a risk to CVD, however the abdominal fat is the major risk factor responsible for the development of inflammation that appears to be a central mechanism in the pathophysiology of MetS [35].

Normally, patients with MetS demonstrate a diet containing excess calories and physical inactivity, favoring an excess of triglycerides level and its storage in the adipocytes, liver and skeletal muscles at the same time that the adipose tissue becomes highly active [35]. Numerous pro-inflammatory adipocytokines are secreted by activated adipocytes stimulating the inflammation, which favors the emergence of other disorders associated with MetS, such as insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis [35, 36].

In this context, immune cells are recruited to adipose tissue and the lymphocytes appears to be

fundamental to support inflammation locally as well as systematically [13]. On its cell surface, the lymphocyte shows purinergic enzymes, termed ectonucleotidases, as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and adenosine deaminase (ADA), which are responsible to modulate extracellular adenine nucleotides and nucleoside (ATP, ADP and adenosine) levels [27].

ATP and adenosine are important messengers of immune and inflammatory process and alterations in their levels represent changes in metabolic and immuno-inflammatory homeostasis. ATP is a pro-inflammatory molecule that stimulates the lymphocytes, inflammasome and the release of pro-inflammatory cytokine whereas adenosine exhibits anti-inflammatory and immunosuppressive actions by inhibiting both proliferation of T cells and secretion of pro-inflammatory cytokines [20, 31]. Consequently, by controlling the ATP and adenosine levels, E-NTPDase and ADA enzymes play an important role in the modulation of purinergic actions in the inflammatory process. On the other hand, little is known about these enzymes in the conditions of MetS.

accepted after revision  
July 19, 2016

## Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-114218>  
Int J Sports Med 2016; 37: 1–7 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York  
ISSN 0172-4622

## Correspondence

**Prof. Margarete Dulce Bagatini**  
Coordenação Acadêmica  
Universidade Federal da  
Fronteira Sul  
SC 484, km 02  
89812-000 Chapeco  
Brazil  
Tel.: +55/49/2049 2600  
Fax: +55/49/2049 2600  
margaretebagatini@yahoo.com.br

■ Proof copy for correction only. All forms of publication, duplication or distribution prohibited under copyright law. ■

***ABSTRACT***

In this study, we investigated the cardiovascular risk factors as well as ectonucleotidase activities in lymphocytes of metabolic syndrome (MetS) patients before and after an exercise intervention. Twenty MetS patients, who performed regular concurrent exercise training for 30 weeks, three times /week, were studied. Anthropometric, biochemical, inflammatory and hepatic parameters and hydrolysis of adenine nucleotides and nucleoside in lymphocytes were collected from patients before and after 15 and 30 weeks of the exercise intervention as well as from participants of the control group. An increase in the hydrolysis of ATP and ADP, and a decrease in adenosine deamination in lymphocytes of MetS patients before the exercise intervention were observed ( $P < 0.001$ ). However, these alterations were reversed by exercise training after 30 weeks of intervention. Additionally, exercise training reduced the inflammatory and hepatic markers to baseline levels after 30 weeks of exercises. Our results clearly indicated alteration in ectonucleotidase enzymes in lymphocytes in the MetS, whereas regular exercise training had a protective effect on the enzymatic alterations and on inflammatory and hepatic parameters, especially if it is performed regularly and for a long period.

**Keywords:** Metabolic Syndrome; E-NTPDase; ADA; Exercise training; Inflammation

## ***1 INTRODUCTION***

Metabolic syndrome (MetS) clusters several metabolic abnormalities that increase the risk to cardiovascular diseases (CVD) and diabetes, including hyperglycemia, hypertension, dyslipidemia and central obesity [11]. Each of the individual components of MetS *per se* is a risk to CVD, however the abdominal fat is the major risk factor responsible for the development of inflammation that appears to be a central mechanism in the pathophysiology of MetS [35].

Normally, patients with MetS demonstrate a diet containing excess calories and physical inactivity, favoring an excess of triglycerides level and its storage in the adipocytes, liver and skeletal muscles at the same time that the adipose tissue becomes highly active [35]. Numerous pro-inflammatory adipocytokines are secreted by activated adipocytes stimulating the inflammation, which favors the emergence of other disorders associated with MetS, such as insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis [35, 36].

In this context, immune cells are recruited to adipose tissue and the lymphocytes appears to be fundamental to support inflammation locally as well as systematically [13]. On its cell surface, the lymphocyte shows purinergic enzymes, termed ectonucleotidases, as ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and adenosine deaminase (ADA), which are responsible to modulate extracellular adenine nucleotides and nucleoside (ATP, ADP and adenosine) levels [27].

ATP and adenosine are important messengers of immune and inflammatory process and alterations in their levels represent changes in metabolic and immuno-inflammatory homeostasis. ATP is a pro-inflammatory molecule that stimulates the lymphocytes, inflammasome and the release of pro-inflammatory cytokine whereas adenosine exhibits anti-inflammatory and immunosuppressive actions by inhibiting both proliferation of T cells and secretion of pro-inflammatory cytokines [20, 31]. Consequently, by controlling the ATP and adenosine levels, E-NTPDase and ADA enzymes play an important role in the modulation of purnergic actions in the inflammatory process. On the other hand, little is known about these enzymes in the conditions of MetS.

Comparatively, the regular and moderate exercise training has been reported to be able to reduce the cardiovascular risks, abdominal fat and inflammation, demonstrating to be a great therapeutic to MetS patients [16, 34]. However, the amount of exercise necessary to reduce the inflammatory process has not been described and few studies have investigated all the beneficial effects of the exercise training on the MetS condition. Moreover, studies have shown that exercise training may influence the activity of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides

and nucleosides in different conditions [8, 29]; however, on the MetS situation this effect of the exercise is poorly explored.

Then, based in the all these circumstances, the aims of our study were to evaluate E-NTPDase and ADA activities in lymphocytes of MetS patients and their possible correlations with MetS pathology, and observed the effect of the exercise training on these enzymes as well as on the cardiovascular risks of the MetS in 15 and 30 weeks of the intervention.

## **2 PATIENTS**

### **2.1 Metabolic syndrome patients**

Twenty volunteer MetS patients from the study group at the Center of Physical Education at the Federal University of Santa Maria were selected for this study. The MetS patients were recruited through a single-stage, using a random sampling with ages between 55 to 65 years old and from both sexes. MetS was characterized according to the classification of the National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP - ATP III, 2001) [14]. Selected participants were free of liver diseases, of infection of human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B or C virus, alcoholism, cigarette smoking as well as autoimmune disorders, according to a questionnaire applied.

All participants have signed the consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center at the Federal University of Santa Maria, protocol number 19435813.8.0000.5346, Brazil.

The participants diagnosed with MetS were observed in three different times: before starting an exercise intervention, after 15 weeks of exercise intervention and at the end of 30 weeks of exercise intervention. In each time, anthropometric and biochemical measurements were performed in all MetS patients. To biochemical tests, ten milliliters of peripheral blood were collected by venipuncture to isolate lymphocytes and obtaining serum and plasma.

### **2.2 Control participants**

Twenty healthy participants were recruited from the study group at the Center of Physical Education at the Federal University of Santa Maria through a single-stage, using a random sampling. They were aged between 55 and 65 years old, from both sexes, with normal blood pressure and were free of diabetes mellitus, obesity, dyslipidemia, alcoholism, cigarette smoking, liver diseases, infection of HIV, hepatitis B or C virus, autoimmune disorders or chronic diseases. Moreover, they had received no pharmacological therapy during the month

before the study and had no cardiovascular disease. These information were obtained through a questionnaire applied to people and were based on the results of the biochemical and anthropometric parameters of the same.

No exercise intervention was assigned to the control participants, and all of them signed the consent to take part in the study. Ten milliliters of peripheral blood were collected by venipuncture from each patient and used for the isolation of lymphocytes and obtaining serum and plasma.

### **3. MATERIALS AND METHODS**

All the methods used in the study meet the ethical standards of the International Journal of Sports Medicine [12].

#### **3.1 Exercise intervention**

The exercise training plan proposed for the MetS patients was concurrent and moderate with aerobic and resistance exercises. The supervised training took place in the Physical Education and Sports Center gym of the Federal University of Santa Maria. MetS patients initially received a training adaptation for the exercises with a low intensity indoor walking for 10 min and resistance training with few exercises and low volume and intensity for familiarization of movement performance technique. After one week of adaptation, the volunteers performed the exercise training during 30 weeks, and the activities were performed three times a week totalizing 90 sessions. Volume and intensity of training were progressive to avoid adaptation to stimuli caused by exercise and a good technique practice was emphasized, reducing the potential for excessive muscle soreness and injury. The moderate intensity of the exercises was measured by rating of perceived exertion, in which the patients showed the panting breath, but they could still speak [4]

For aerobic training, the volunteers were instructed to walk on a moderate rate for about 30 min during the first weeks. After, they increased the walk intensity over the months to about 45 min with relatively fast speed.

In resistance training, the practice initially was performed with only 4 different types of exercises. Every two weeks, a different exercise was added to the plan totalizing 11 types of exercises: chest press, rower machine, lat pulldown, triceps pulley extension, biceps curl, leg press, leg curl, ankle plantar flexion, hip abduction, hip adduction and abdominals. The MetS patients performed all exercises in three sets of ten repetitions with an interval of 1' to 1'30''



between sets and 2' to 3' between exercises, alternating upper and lower resistance machines. The intensity of the work was set at 70% of the maximum force, which was calculated for each patient using the repetition maximum test [5]. This test is used to determine the approximate percentage of the workload resistance. In the end of the sessions, the stretching was performed individually, with emphasis in the upper and lower back, shoulders, arms, chest, abdomen, thighs and calves.

### ***3.2 Chemicals***

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

### ***3.3 Anthropometric characteristics and blood tests***

We measured the height, body weight, and waist circumference in all participants studied. The body mass index (BMI) was calculated as the subject's weight divided by their height squared ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). The morning blood pressure was recorded between 7 and 9 a.m. after participants had been in a relaxed state for at least 10 min. The blood was collected after 10 h of overnight fasting in tubes with and without an anticoagulant system and centrifuged at  $1800 \times g$  for 10 min. The precipitate was discarded, and the serum was used to determine the level of HDL, total cholesterol, triglycerides, glucose, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) using standard enzymatic methods with Ortho-Clinical Diagnostics® reagents on a fully automated analyzer (Vitros® 950 dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). The level of LDL-cholesterol (mg/dl) was calculated by using the Friedewald formula:  $[\text{total cholesterol (mg/dl)} - [\text{HDL-cholesterol (mg/dl)} + (\text{triglyceride (mg/dl)}/5)]]$ . The level of C-reactive protein (CRP) was determined in serum by nephelometry (Dade Behring, Newark, DE, USA), and uric acid was determined by dry chemistry method standardized by the Cobas MIRA ®. Total blood with EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) was used to determine the total white blood cell and lymphocyte counts with a Coulter-STKS analyzer (USA) as well as to isolation of the lymphocytes.

### ***3.4 Isolation of mononuclear cells from human blood***

Mononuclear leukocytes were isolated from human blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [2]. Despite the

methodology described above used to separate mononuclear cells, the work done by Jaques et al. [15] demonstrated that there is a high incidence of lymphocytes in separate samples and the amount of monocytes is almost insignificant. For this reason, we have treated the samples as containing only lymphocytes.

### ***3.5 E-NTPDase enzyme assays***

After lymphocyte isolation, E-NTPDase activity was determined as described by Leal et al [18]. The reaction medium contained 0.5 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 6 mmol/l glucose and 50 mmol/l Tris-HCl buffer at pH 8.0, with a final volume of 200  $\mu\text{l}$ . Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2-4  $\mu\text{g}$  of protein) and pre-incubated for 10 min at 37 °C and incubation proceeded for 70 min. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mmol/l and stopped with 200  $\mu\text{l}$  of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed using malachite green as colorimetric reagent and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

### ***3.6 ADA enzyme assay***

Adenosine deaminase activity was measured spectrophotometrically in lymphocytes by the method of Giusti et al [10]. Briefly, 25  $\mu\text{L}$  of lymphocytes reacted with 21 mmol/L of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The protein content for lymphocytes experiment was adjusted between 0.1- 0.2 mg/mL. Results were expressed in U/L. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

### ***3.7 Myeloperoxidase enzyme assays***

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured in plasma from human blood collected with EDTA, according to Metcalf et al [23]. The MPO activity was analyzed spectrophotometrically by a modified peroxidase-coupled assay system involving phenol, 4-aminoantipyrine (AAP) and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Briefly, 390  $\mu\text{l}$  of 2.5 mmol/l AAP and 20 mmol/l phenol were placed in each tube, followed by 450  $\mu\text{l}$  of 1.7 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  as

oxidizing agent, MPO catalyzed the oxidative coupling of phenol and AAP yielding a colored product, quinoneimine, with a maximum absorbance at 500 nm. The mmol/l absorbance coefficient for the quinoneimine was determined to be  $\Sigma = 14 \pm 0.1/\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , close to the previously reported values [17]. Results were expressed in  $\mu\text{mol/l}$  of quinoneimine produced at 30 min.

### **3.8 Protein determination**

Protein amounts were determined with the Coomassie blue method using bovine serum albumin as a standard [3].

### **3.9 Statistical analysis**

Data were analyzed statistically using Graphpad Prism 5.0 software. First, a Shapiro-Wilk test was conducted to verify the normality of the data, which showed that our data did not follow a normal distribution. Thus, the Wilcoxon test was used for comparison of the three different times (before exercise-intervention, 15 weeks of exercise-intervention and 30 weeks of exercise-intervention) in the same MetS group and the Mann-Whitney test was used for comparison between different groups (control group and MetS groups). To indicate how closely two variables changed in relation to each other, Spearman correlation coefficient was used. Continuous variables are presented as the mean  $\pm$  SD and the level of significance was set at 0.05 in all analyses.

## **4 RESULTS**

Biochemical characteristics and anthropometric parameters were significantly different between control group and MetS group before and after the exercise intervention, as demonstrated in Table 1. However, it is interesting to note that these differences to control group were higher when compared with the MetS group before the exercise intervention (all tests with  $P < 0.001$ ). After 15 and 30 weeks of the exercise intervention, these differences decreased (HDL with  $P < 0.05$  after 15 weeks and only glycemia, weight and BMI with  $P < 0.001$  after 30 weeks). In addition, at the end of the exercise training plan the MetS group had no difference of the control group to DBP, HDL and LDL parameters and the others parameters had a tendency to match the control group levels.

When the MetS group was compared in three different times, we observed significant increase in HDL level and decrease in all others biochemical characteristics and anthropometric

parameters over the exercise training period, since the tests in pre-exercise intervention, 15 weeks and 30 weeks post-exercise intervention were statistically different from each other ( $P < 0.05$ ). Besides, the most positive results in order to reduce the cardiovascular risk factors were observed in MetS group after 30 weeks of the exercise, since the mean of the HDL level increased 54.150% and means of the triglyceridemia, glycemia, DBP, SBP and waist circumference reduced 49.144%, 31.543%, 22.439%, 17.741% and 8.670%, respectively, when compared with the MetS group before the exercise training.

Similar results were observed to inflammatory and hepatic parameters, as showed in Table 2 and 3, respectively. The MetS group before the exercise intervention showed CRP level and ALT/AST ratio above the normal levels and all inflammatory and hepatic parameters were significantly higher than the control group ( $P < 0.001$ ). However, after 30 weeks of the exercise training these parameters restored to the same or similar values observed in the control group. In highlighted, we observed that the uric acid levels and AST activity of the MetS group reached the same values of the control group even in 15 weeks of the exercise training. Indeed, inflammatory and hepatic parameters decreased significantly in the MetS group over the exercise training period ( $P < 0.05$ ), while the ALT/AST ratio demonstrated to be affected by the exercise only after 30 weeks of the intervention.

Results obtained for E-NTPDase and ADA activities in lymphocytes are shown in Fig. 1. As can be observed, ATP and ADP hydrolysis were significantly increased in the MetS pre – exercise intervention group when compared with the control group (approximately 66% higher for ATP and 110% for ADP;  $P < 0.001$ ; Fig. 1 A and B). However, ADA activity showed approximately 35% lower in MetS group before the exercise intervention than the control group ( $P < 0.001$ ; Fig. 1 C). On the other hand, the exercise showed to have *per se* an ability to decrease ATP and ADP hydrolysis and increase ADA activity in the MetS group after 15 and 30 weeks of the intervention ( $P < 0.05$ ) and at the end of the exercise training plan the MetS group demonstrated similar E-NTPDase and ADA activities to the control group.

Correlation analysis was performed between E-NTPDase or ADA activities in lymphocytes and ALT/AST ratio, CRP and waist circumference to observe possible connections of the purinergic system with the MetS. According to the data shown in Table 4, a significant positive correlation was observed between E-NTPDase activity to ATP and ADP hydrolysis and ALT/AST ratio (ATP:  $r = 0.603$ ,  $P < 0.001$ / ADP:  $r = 0.732$ ,  $P < 0.001$ ), CRP (ATP:  $r = 0.663$ ,  $P < 0.001$ / ADP:  $r = 0.732$ ,  $P < 0.001$ ) and waist circumference (ATP:  $r = 0.416$ ,  $P < 0.001$ / ADP:  $r = 0.421$ ,  $P < 0.001$ ). However, opposite results were observed in the

correlations between ADA activity and ALT/AST ratio ( $r = -0.645$ ,  $P < 0.001$ ), CRP ( $r = -0.667$ ,  $P < 0.001$ ) and waist circumference ( $r = -0.439$ ,  $P < 0.001$ ).

## 5 DISCUSSION

The purinergic system controls a large number of the metabolic ways [27, 31], so it could be an important connecting route between the unclear processes involved in the pathophysiology of the MetS. Equally, remain poorly explored all the positive effects of the physical exercise on the MetS. In this way, we explore these features and we observed that the enzymes of the purinergic system are altered in lymphocytes from MetS patients and the regular exercise training plays modulatory role on these enzymes as well as other beneficial effects.

ATP and adenosine act as immune signals and control the inflammatory process, since the ATP can promote pro-inflammatory responses, whereas the adenosine may signal anti-inflammatory effects on diverse immune cells [1]. Then, by controlling the extracellular adenine nucleotide and nucleoside levels, ectonucleotidase enzymes, as E-NTPDase and ADA, are able to regulate the immune homeostasis and, for this reason, alteration in their activities has been associated with inflammatory diseases [1].

Indeed, studies of our research group have demonstrated alteration in the ectonucleotidase enzymes of lymphocytes in diseases that have inflammatory process involved in their pathology, as hypertension [7], multiple sclerosis [26, 30], HIV [19] and smoking [33]. Similarly, the inflammatory process appears to be a central mechanism in the pathophysiology of the MetS, since in central obesity the adipose tissue becomes metabolically active and releases different adipocytokines, which regulate immune-inflammatory function and may contribute to the development of chronic inflammation, insulin resistance and NAFLD [22, 35].

In accordance with these ideas, our results showed an increase in E-NTPDase activity to ATP and ADP hydrolysis and a decrease in ADA activity of lymphocytes from MetS patients, which may favor an immunosuppressive condition by increasing adenosine level. Indeed, some reports have demonstrated that these enzymatic behaviors in lymphocytes represent an important compensatory mechanism to reduce inflammation and immune response in diverse pathologies [7, 19, 26, 30, 33].

The compensatory mechanism via ectonucleotidases in MetS could be triggered from high ATP level secreted by lymphocytes and others immune cells that were stimulated and recruited to adipose tissue through adipocytokines [1, 13]. However, it is interesting to note that the alteration in E-NTPDase and ADA activities were not enough to contain the inflammatory

process in MetS, as observed by the increase in CRP and MPO levels in the patients. In this way, it could lead us to think that these enzymatic alterations may be a warning sign that slows the progression of inflammation but does not prevent its occurrence in MetS.

In contrast, the regular exercise training has been associated with a significant protection against immuno-inflammatory process and its protective effect is due to the ability to enhance mitochondrial performance and to prevent the ATP release and then the inflammasome activation [7, 25]. Corroborating with these findings, we observed that the regular exercise training was able to restore the metabolic and inflammatory homeostasis as well as to reverse the alterations observed in E-NTPDase and ADA activities of lymphocytes in MetS patients.

To our knowledge, this is the first investigation to examine the effect of the exercise training on these enzymes of lymphocytes in MetS. Thus, it is difficult to compare our findings to other studies. A previous study of our group, however, demonstrated that the ectonucleotidase enzymes were altered in platelets of the MetS patients and the regular exercise training was able to reverse these enzymatic alterations, besides to decrease the platelet aggregation [21]. Consequently, we may infer that these enzymes play significant roles in the pathology of the MetS and the exercise has the ability to modulate the activity of these enzymes through its protective effects.

Concomitantly to changes in the purinergic enzymatic activities, MetS patients of our study also showed an increase in CRP, MPO activity, uric acid, ALT, AST and ALT/AST ratio, while the exercise training was able to reduce all these parameters after both 15 weeks and 30 weeks of the intervention. Additionally, ALT/AST ratio has shown to be a more powerful predictor of early-stage MetS and visceral fat accumulation than ALT level [24] and it must be noted that the ALT / AST ratio decreased only after 30 weeks of the exercises, which coincides with the return of the E-NTPDase and ADA activities to baseline levels. Thus, our results clearly express that the purinergic enzymes may be an indicator of inflammatory processes and hepatic abnormalities present in MetS.

Based on everything that has been exposed so far, we propose that abdominal fat and its consequent metabolic disorders stimulate the release of signals, such as adipocytokines/cytokines and ATP, from the cells to indicate the loss of homeostasis. In response to these signals, the E-NTPDase and ADA enzymes could alter their activity to try increase adenosine level and avoid a possible “failure” from inflammation if these signals are not contained. The exercise, however, decreases abdominal fat and restores metabolic and inflammatory homeostasis, inhibiting the release of disorder signals and then the enzymatic activity of E-

NTPDase and ADA return to baseline level. This hypothesis may be reinforced through the significant correlations of the E-NTPDase and ADA activities with ALT/AST ratio, CRP and waist circumference, according showed in our results.

Moreover, there is still no consensus about the optimal intensity of exercise training to treatment of MetS. Some studies have suggested that exercise training of low intensity is the best to the old adults, while others have shown that it has no effect on cardiovascular risks [28, 32]. Similarly, the exercise training of high intensity could potentially reduce the cardiovascular risks; however, it can cause discomfort, injury, or lack of success, especially to the old adults [9, 28]. Then, in this study, we investigated the effect of the training with moderate intensity and it was observed that this intensity may promote significant cardioprotective effects in MetS patients, with low risk of injury, which is widely recommended for the MetS treatment [6, 21].

In conclusion, MetS appears to a constellation of disorders associated with inflammatory, hepatic and purinergic alterations. The E-NTPDase and ADA enzymes in lymphocytes play important positive modulatory effects in the pathophysiology of the MetS and they may represent a basis of pharmacological tests to development of new treatment not only MetS, but also to other cardiovascular disorders. Moreover, we emphasized that the regular exercise training is an effective intervention to treat MetS patients, since its effects are positively observed in various perspectives, including in the modulation of the purinergic enzymes. Finally, the results of our study suggested that the 30 weeks of the exercise intervention were more effective than 15 weeks of training to reduce significantly the cardiovascular risks of the MetS, which highlight that the most positive results of the exercise are obtained in long-term and therefore the regularity is a crucial factor to achieve its benefits.

## ***6 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT***

All authors report no conflicts of interest.

## ***7 ACKNOWLEDGMENTS***

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) under Grant number [304641/2013-8](#), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) under Grant number [1279-2551/13-7](#), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” and “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia” (INCT) for their financial support of this work.

## 8 REFERENCES

- [1] *Bono MR, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Roseblatt M, Sauma D.* CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters* 2015; 589: 3454-3460.
- [2] *Böyum A.* Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97: 77–89.
- [3] *Bradford MM.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 218–254.
- [4] *Brazilian Cardiology Society.* I Brazilian guidelines of diagnosis and treatment of metabolic syndrome. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84: 1-28.
- [5] *Brzycki M.* Strength testing—predicting a one-rep max from reps-to-fatigue. *JOPERD* 1993; 64: 88–90.
- [6] *Cardinot TM, Lima TM, Moretti AIS, Koike MK, Nunes VS, Cazita PM, Krieger MH, Brum PC, Souza HP.* Preventive and therapeutic moderate aerobic exercise programs convert atherosclerotic plaques into a more stable phenotype. *Life Sciences* 2016; 153: 163–170.
- [7] *Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, Zanini D, Schmatz R, Jaques JA, Leal DB, Morsch VM, Schetinger MR.* Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats. *J Hypertens* 2015; 33, 4: 763-772.
- [8] *Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D, Schmatz R, Gutierrez J, Pimentel VC, Thome G, Leal CAM, Vieira JM, Stefanello N, Fiorin FS, Baldissareli J, Royes LFF, Klein AB, Morsch VM, Schetinger MRC.* Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2012; 371: 147-156.
- [9] *Dorneles GP, da Silva IRV, Korb A, Bertoldi K, Siqueira IR, Elsner VR, Romão PRT, Peres A.* High intensity interval exercise enhances the global HDAC activity in PBMC and anti-inflammatory cytokines of overweight-obese subjects. *Obesity Medicine* 2016; 2: 25–30.
- [10] *Giusti G, Gakis C.* Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 1971; 12: 417–425.
- [11] *Han TS, Lean MEJ.* Metabolic syndrome. *Med* 2015; 43, 2: 80-87.
- [12] *Harriss DJ, Atkinson G.* Ethical Standards in Sport and Exercise Science Research: 2016 Update. *Int J Sports Med* 2015; 36: 1121-1124.



- [13] *Ip BC, Hogan AE, Nikolajczyk BS*. Lymphocyte roles in metabolic dysfunction: of men and mice. *Trends Endocrin Met* 2015; 26, 2: 91-100.
- [14] *JAMA*. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, Evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III), 2001; 285: 2486–2497.
- [15] *Jaques JAS, Rezer JFP, Ruchel JB, Gutierrez J, Bairros AV, Farias ILG, da Luz SCA, Bertoncheli CM, Schetinger MRC, Morsch VM, Leal DBR*. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. *Anal Biochem* 2009; 410: 34-39.
- [16] *Kay SJ, Fiatarone Singh MA*. The influence of physical activity on abdominal fat: a systematic review of the literature. *Obes Rev* 2006; 7: 183-200.
- [17] *Kayyalı US, Moore TB, Randall JC, Richardson RJ*. Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions based on detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophore spectrum. *J Anal Toxicol* 1991; 15: 86–89.
- [18] *Leal DBR, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CAM, da Silva JEP, Morsch VM, Schetinger MRC*. Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721: 9–11.
- [19] *Leal DRB, Streher CA, Bertoncheli CM, Carli LFD, Leal CAM, da Silva JEP, Morsch VM, Schetinger MR*. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. *BBA - Mol Cell Res* 2005; 1746, 2: 129-134.
- [20] *Li HB, Jin C, Chen Y, Flavell RA*. Inflammasome activation and metabolic disease progression. *Cytokine Growth F R* 2014; 25: 699-706.
- [21] *Martins CC, Bagatini MD, Cardoso AM, Zanini D, Abdalla FH, Baldissarelli J, Dalenogare DP, Farinha JB, Schetinger MR, Morsch VM*. Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. *Clin Chim Acta* 2016; 454: 66–71.
- [22] *Maury E, Brichard SM*. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 314: 1–16.
- [23] *Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK*. Laboratory manual of neutrophil function. Raven Press 1986, New York.

- [24] *Ohgo H, Yokoyama H, Hirose H, Kawabe H, Saito I, Tomita K, Toshifumi H.* Significance of ALT/AST ratio for specifying subjects with metabolic syndrome in its silent stage. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Ver* 2009; 3: 3-6.
- [25] *Peeri M, Amiri S.* Protective effects of exercise in metabolic disorders are mediated by inhibition of mitochondrial-derived sterile inflammation. *Med Hypothesis* 2015; 85: 707–709.
- [26] *Polachini CRN, Spanevello RM, Casali EA, Zanini D, Pereira LB, Martins CC, Baldissareli J, Cardoso AM, Duarte MF, da Costa P, Prado AL, Schetinger MR, Morsch VM.* Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience* 2014; 266: 266-274.
- [27] *Schetinger MR, Morsch VM, Bonan C, Wyse A.* NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2007; 31: 77-98.
- [28] *Shephard RJ, Balady GJ.* Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 1999; 99: 963-972.
- [29] *Siqueira IR, Elsner VR, Rilho LS, Bahlis MG, Bertoldi K, Rozisky JR, Batastini AMO, Torresia ILS.* A neuroprotective exercise protocol reduces the adenine nucleotide hydrolysis in hippocampal synaptosomes and serum of rats. *Brain Res* 2010; 1316: 173-180.
- [30] *Spanevello RM, Mazzanti CM, Schmatz R, Thomé G, Bagatini M, Correa M, Rosa C, Stefanello N, Bellé LP, Moretto MB, Oliveira L, Morsch VM, Schetinger MR.* The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Chim Acta* 2010; 411, 3–4: 210-214.
- [31] *Sparks DL, Chatterjee C.* Purinergic Signaling, Dyslipidemia and Inflammatory Disease. *Cell Physiol Biochem* 2012; 30: 1333-1339.
- [32] *Takahashi M, Kinugawa S, Takada S, Hirabayashi K, Yokota T, Matsushima S, Saito A, Okita K, Tsutsui H.* Low-intensity exercise under ischemic conditions enhances metabolic stress in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2015; 201: 142-144.
- [33] *Thomé GR, Oliveira LS, Schetinger MR, Morsch VM, Spanevello RM, Fiorenza AM, Seres J, Baldissarelli J, Stefanello N, Pereira ME, Calgaroto NS, Pimentel VC, Leal DB, Souza Vdo C, Jaques JA, Leal CA, Cruz RC, Thiesen FV, Melazzo Mazzanti C.* Nicotine alters the ectonucleotidases activities in lymphocytes: In vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother* 2012; 66, 3: 206-212.

- [34] Wang CH, Chung MH, Chan P, Tsai JC, Chen FC. Effects of endurance exercise training on risk components for metabolic syndrome, interleukin-6, and the exercise capacity of postmenopausal women. *Geriatr Nurs* 2014; 35: 212-218.
- [35] Welty FK, Alfaddagh A, Elajami TK. Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Trans Res* 2016; 167, 1: 257-280.
- [36] Yamada J, Tomiyama H, Yambe M, Koji Y, Motobe K, Shiina K, Yamamoto Y, Yamashina A. Elevated serum levels of alanine aminotransferase and gamma glutamyltransferase are markers of inflammation and oxidative stress independent of the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2006; 189: 198-205.

## 9 TABLES

**Table 1** - General and biochemical characteristics of the study population.

	Control	Metabolic Syndrome		
		Pre-Ex	15w Post-Ex	30w Post-Ex
<i>n</i>	20	20	-	-
♂/♀	06/14	05/15	-	-
Age (yr)	59.40 ± 3.95	57.95 ± 3.30	-	-
Glycemia (mg/dl)	86.45 ± 7.11	147.10 ± 51.81 <sup>***, a</sup>	116.10 ± 32.74 <sup>***, b</sup>	100.70 ± 19.0 <sup>***, c</sup>
SBP (mmHg)	117.40 ± 7.94	150.50 ± 15.38 <sup>***, a</sup>	137.50 ± 11.53 <sup>***, b</sup>	123.80 ± 8.09 <sup>*, c</sup>
DBP (mmHg)	78.25 ± 7.30	102.50 ± 11.18 <sup>***, a</sup>	90.50 ± 7.76 <sup>***, b</sup>	79.50 ± 5.59 <sup>c</sup>
Triglyceridemia (mg/dl)	86.90 ± 22.61	222.0 ± 58.93 <sup>***, a</sup>	165.20 ± 36.63 <sup>***, b</sup>	112.90 ± 25.88 <sup>***, c</sup>
HDL cholesterol (mg/dl)	53.65 ± 7.89	37.95 ± 6.28 <sup>***, a</sup>	48.95 ± 5.26 <sup>*, b</sup>	58.50 ± 6.83 <sup>c</sup>
Waist circumference (cm)	86.20 ± 8.73	103.80 ± 9.99 <sup>***, a</sup>	99.65 ± 10.18 <sup>***, b</sup>	94.80 ± 9.12 <sup>*, c</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	152.90 ± 26.62	235.0 ± 54.03 <sup>***, a</sup>	201.20 ± 22.37 <sup>***, b</sup>	175.60 ± 26.11 <sup>*, c</sup>
LDL cholesterol (mg/dl)	81.82 ± 24.04	152.60 ± 46.89 <sup>***, a</sup>	119.20 ± 22.31 <sup>***, b</sup>	94.48 ± 27.79 <sup>c</sup>
Weight (Kg)	74.30 ± 11.41	95.25 ± 9.91 <sup>***, a</sup>	92.30 ± 9.83 <sup>***, b</sup>	89.85 ± 9.24 <sup>***, c</sup>
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	23.93 ± 2.88	38.24 ± 8.69 <sup>***, a</sup>	36.63 ± 5.55 <sup>***, a</sup>	30.74 ± 3.80 <sup>***, b</sup>

Data are reported as means ± SD. Pre-Ex = Metabolic syndrome pre-exercise intervention; 15w Post-Ex = Metabolic syndrome 15 weeks post-exercise intervention; 30w Post-Ex = Metabolic syndrome 30 weeks post-exercise intervention; SBP and DBP = systolic and diastolic blood pressures, respectively; BMI = body mass index. \* indicates statistically significant differences with P < 0.05, \*\* with P < 0.01 and \*\*\* with P < 0.001 when compared to control group (Mann-Whitney test). Different superscript letters indicate statistically significant differences between different times (pre-, 15w post- and 30w post- exercise) in the same MetS group (P < 0.05, Wilcoxon test).

**Table 2** – Inflammatory parameters of the study population.

	Control	Metabolic Syndrome		
		Pre-Ex	15w Post-Ex	30w Post-Ex
CRP (mg/l)	0.54 ± 0.32	2.99 ± 1.49 <sup>***, a</sup>	1.98 ± 0.91 <sup>***, b</sup>	1.04 ± 0.56 <sup>**, c</sup>
MPO activity (µmol/l Quinoneimine)	1.22 ± 0.20	2.01 ± 0.41 <sup>***, a</sup>	1.52 ± 0.30 <sup>**, b</sup>	1.16 ± 0.29 <sup>c</sup>
Uric acid (mg/dl)	4.36 ± 1.32	7.47 ± 0.96 <sup>***, a</sup>	4.85 ± 0.85 <sup>b</sup>	4.02 ± 0.73 <sup>c</sup>
White blood cell (/mm <sup>3</sup> )	5730 ± 1430	7590 ± 1840 <sup>***, a</sup>	6695 ± 1413 <sup>*, b</sup>	6505 ± 1165 <sup>b</sup>
Lymphocyte count (/mm <sup>3</sup> )	1845 ± 487.20	3521 ± 715.2 <sup>***, a</sup>	2510 ± 524.10 <sup>***, b</sup>	2150 ± 345.60 <sup>*, c</sup>

Data are reported as means ± SD. *n* = 20/group. Pre-Ex = Metabolic syndrome pre-exercise intervention; 15w Post-Ex = Metabolic syndrome 15 weeks post-exercise intervention; 30w Post-Ex = Metabolic syndrome 30 weeks post-exercise intervention; CRP = C-reactive protein; MPO = myeloperoxidase enzyme. \* indicates statistically significant differences with P < 0.05, \*\* with P < 0.01 and \*\*\* with P < 0.001 when compared to control group (Mann-Whitney test). Different superscript letters indicate statistically significant differences between different times (pre-, 15w post- and 30w post- exercise) in the same MetS group (P < 0.05, Wilcoxon test).

**Table 3** – Activities of the hepatic enzymes of the study population.

	Control	Metabolic Syndrome		
		Pre-Ex	15w Post-Ex	30w Post-Ex
ALT (U/l)	16.80 ± 4.38	43.0 ± 6.84***, a	31.25 ± 3.98***, b	20.05 ± 3.63*, c
AST (U/l)	19.20 ± 3.08	28.70 ± 3.97***, a	20.20 ± 3.72 <sup>b</sup>	18.40 ± 2.85 <sup>c</sup>
ALT/AST ratio	0.89 ± 0.25	1.50 ± 0.20***, a	1.57 ± 0.22***, a	1.09 ± 0.15**, b

Data are reported as means ± SD. *n* = 20/group. Pre-Ex = Metabolic syndrome pre-exercise intervention; 15w Post-Ex = Metabolic syndrome 15 weeks post-exercise intervention; 30w Post-Ex = Metabolic syndrome 30 weeks post-exercise intervention; ALT = serum alanine aminotransferase; AST = serum aspartate aminotransferase. \* indicates statistically significant differences with *P* < 0.05, \*\* with *P* < 0.01 and \*\*\* with *P* < 0.001 when compared to control group (Mann–Whitney test). Different superscript letters indicate statistically significant differences between different times (pre-, 15w post- and 30w post- exercise) in the same MetS group (*P* < 0.05, Wilcoxon test).

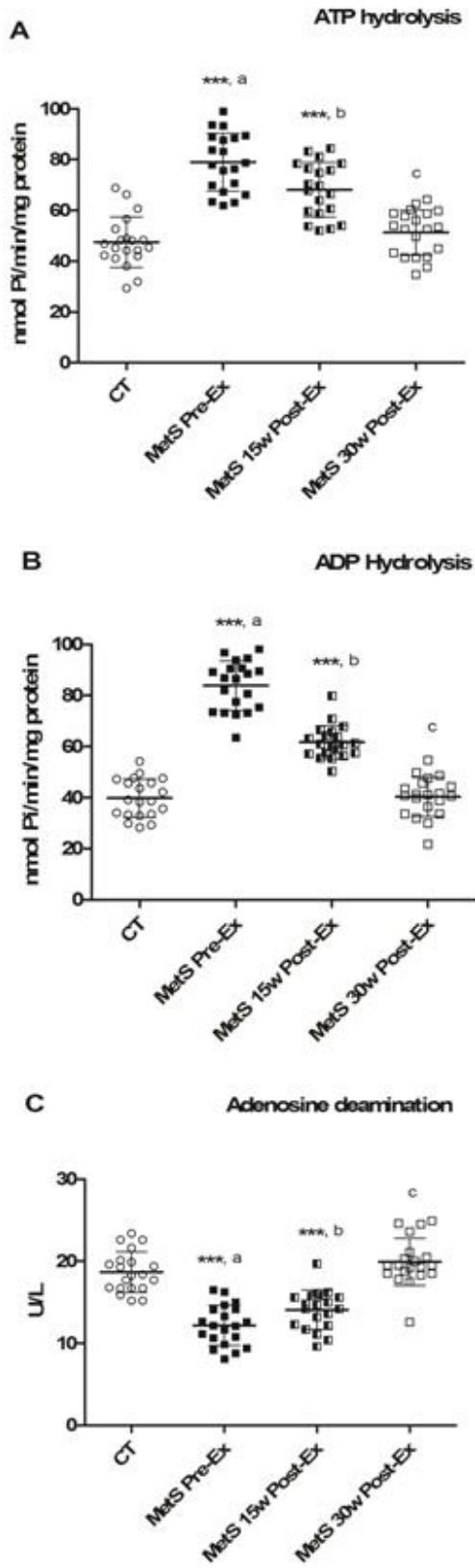
**Table 4** - Spearman coefficient between activities of E-NTPDase and ADA enzymes in lymphocytes and cardiovascular risk factors (*n*=20 to each group).

	E-NTPDase to ATP hydrolysis		E-NTPDase to ADP hydrolysis		ADA activity	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
ALT/AST ratio	0.603	< 0.001	0.732	< 0.001	-0.645	< 0.001
CRP (mg/l)	0.663	< 0.001	0.732	< 0.001	-0.667	< 0.001
Waist circumference (cm)	0.416	< 0.001	0.421	< 0.001	-0.439	< 0.001

**10 FIGURES**

**Fig. 1.** E-NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrates and ADA activity (C) using adenosine as substrate in lymphocytes of control and MetS before and after exercise interventions. Data are reported as means  $\pm$  SD.  $n = 20$ /group. CT = control group; MetS Pre-Ex = Metabolic syndrome pre-exercise intervention; MetS 15w Post-Ex = Metabolic syndrome 15 weeks post-exercise intervention; MetS 30w Post-Ex = Metabolic syndrome 30 weeks post-exercise intervention. \*\*\* indicates statistically significant differences with  $P < 0.001$  when compared to control group (Mann–Whitney test). Different superscript letters indicate statistically significant differences between different times (pre-, 15w post- and 30w post-exercise) in the same MetS group ( $P < 0.05$ , Wilcoxon test).

Fig. 1



## 4. DICUSSÃO

Entre o período da década de 90 e os dias atuais, houve um significativo aumento na prevalência da SMet devido à rápida e descontrolada industrialização, aumento no número de empregados em escritórios e, principalmente, devido à inatividade física associada à dieta irregular. O aumento na prevalência da SMet foi de quase 30% nos países ocidentais, associado ao aumento de duas vezes na prevalência das DCV e de quatro vezes na prevalência de DMT2 (SOYSAL et al., 2016).

Dessa forma, a SMet se configura um grave problema de saúde pública mundial e, por isso, estudos que buscam desvendar os seus mecanismos patológicos têm sido incentivados a fim de fornecer informações que facilitem o diagnóstico precoce, bem como o desenvolvimento de possíveis novos fármacos para o seu tratamento (BASSI et al., 2014). Embora muitos estudos estejam voltados para desvendar os mecanismos responsáveis pelas complicações associadas à SMet, ainda existem muitos questionamentos que necessitam ser elucidados a fim de melhor compreender o que ocorre em nível celular em pacientes com SMet e, assim, propiciar subsídios teóricos que auxiliam a prática clínica na redução da sua prevalência.

Estudos mais recentes sobre a SMet têm seu foco principal nos mecanismos trombóticos e inflamatórios que, sabidamente, acompanham a patologia em maior ou menor grau (ASTERHOLM et al., 2014; RUSSO, 2012; SANTILLI, 2012; WELTY, ALFADDAGH & ELAJAMI, 2016). Isso porque as condições pró-trombóticas e pró-inflamatórias são favorecidas pela associação dos fatores de risco cardiovasculares e estão diretamente relacionadas ao processo aterosclerótico e suas conseqüentes complicações (BADIMÓN, VILAHUR & PADRÓ, 2009). Por conseguinte, o diagnóstico e tratamento precoces da SMet podem evitar danos irreversíveis ou fatais aos pacientes.

Entretanto, os mecanismos envolvidos nas vias trombóticas e inflamatórias ainda precisam ser melhor esclarecidos. Sabe-se que existe um envolvimento importante do sistema purinérgico, em nível vascular, nestes processos. A regulação dos níveis dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP e do nucleosídeo adenosina parecem ser cruciais na indução das respostas pró ou antitrombóticas, bem como pró ou anti-inflamatórias (KANTHI, SUTTON & PINSKY, 2014). Sendo assim, fica claro que as



enzimas responsáveis pela hidrólise dessas moléculas e, conseqüentemente, responsáveis pela regulação dos seus níveis, exercem um significativo papel no funcionamento do organismo e na manutenção da homeostase em condições fisiológicas e patológicas.

De fato, os resultados observados neste estudo indicam alterações nas atividades das enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5'-nucleotidase e ADA em plaquetas, bem como das enzimas E-NTPDase e ADA em linfócitos de pacientes com SMet, o que pode ser relatado como uma resposta orgânica compensatória do organismo a fim de evitar o processo trombótico e inflamatório e manter a homeostasia metabólica através da depleção de ATP e de ADP e da produção de adenosina. Cabe ressaltar que o ADP é conhecido por induzir a agregação plaquetária, enquanto que o ATP possui efeitos pró-inflamatórios; ao contrário da adenosina, a qual é conhecida por seus efeitos cardioprotetores como: anti-inflamatório, vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária (FERRARI et al., 2015; KAHNER et al., 2006).

Contudo, é importante destacar que a resposta orgânica via ectonucleotidases, apesar de seu intuito cardioprotetor, não é capaz de inibir o desenvolvimento da SMet e dos riscos associados a suas complicações, já que os fatores de risco cardiovasculares, incluindo hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia, obesidade abdominal, inflamação e agregação plaquetária, permaneceram elevados nos pacientes do estudo. Entretanto, as atividades das enzimas do sistema purinérgico apresentam o relevante papel de compensar os danos causados pela SMet e, assim, evitam a perda total da homeostasia e maiores prejuízos à integridade celular.

Nesse contexto, como a SMet é uma condição reversível, o tratamento dos pacientes com a síndrome constitui uma considerável maneira de se evitar custos maiores com as DVC, as quais estão entre os gastos orçamentários mais elevados tanto no Brasil, quanto mundialmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; SCHMIDT et al., 2011). Entre as diversas formas de tratamento da SMet, a via medicamentosa tem sido a mais utilizada, porém sua eficácia é reduzida quando analisados os seus efeitos sobre os fatores de riscos ocultos, não diminuindo o risco cardiovascular até um significativo nível de segurança (SADIKOT & HERMANS, 2010).

Comparativamente, a prática regular de exercícios físicos, ao longo dos anos, tem sido descrita como um dos principais co-adjuvantes no tratamento da SMet devido

aos seus inúmeros efeitos cardioprotetores. Além de ser capaz de atuar na redução dos fatores de risco que estão associados ao desequilíbrio metabólico, o exercício também tem demonstrado importantes efeitos antitrombóticos e anti-inflamatórios (CHURCH, 2011; DRIGNY et al., 2011; MONTESI et al., 2013; PEERI & AMIRI, 2015).

De forma geral, o desequilíbrio metabólico presente na síndrome resulta em alterações na atividade mitocondrial celular, com elevação na produção de EROs, perda da integridade celular, extravasamento de ATP para o espaço extracelular, aumento nas taxas de necrose celular e na produção de proteínas pró-trombóticas (LI et al., 2014; RUSSO, 2012; SAMSON & GARBER, 2014). Esses efeitos contribuem para a disfunção endotelial e aumento da agregação plaquetária (SANTILLI et al., 2012). Além disso, as EROs e o ATP têm sido postulados como os principais ativadores dos inflamassomas nas células do sistema imune, sendo, assim, responsáveis por estimular a liberação de moléculas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e FNT- $\alpha$  (LI et al., 2014).

O exercício físico, por outro lado, tem se demonstrado eficaz em promover a renovação das mitocôndrias e, assim, tem uma participação direta na manutenção da homeostasia energética através da melhoria da função mitocondrial. Conseqüentemente, o treinamento físico inibe a ativação dos inflamassomas, a produção de FNT- $\alpha$  e de proteínas pró-agregantes, promovendo ações anti-agregantes e anti-inflamatórias (PEDERSEN & SALTIN, 2015). No entanto, os mecanismos que contribuem para essas respostas ainda requerem esclarecimentos.

Cabe destacar que durante uma sessão de exercício moderado ocorre a mobilização de moléculas de ATP e o aumento na produção de adenosina, indicando importante participação do sistema purinérgico nas respostas induzidas pelo exercício (CARDOSO et al., 2012, 2015). Contudo, a relação entre o exercício e o sistema purinérgico, até o presente momento, ainda não havia sido investigado na condição da SMet.

Sendo assim, este é um trabalho pioneiro no qual foi investigado o efeito de 30 semanas de exercício físico concorrente sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas e linfócitos, bem como na agregação plaquetária e nos marcadores inflamatórios de pacientes com SMet.

Os resultados obtidos indicam que o exercício físico é um potente protetor e modulador das enzimas do sistema purinérgico, além de, como já esperado, um

regulador da homeostase metabólica capaz de controlar os fatores de risco cardiovasculares associados à SMet.

No presente estudo, trinta semanas de exercício físico concorrente, de intensidade moderada e realizado três vezes por semana, foram capazes de reverter tanto o aumento na atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP e E-5'-nucleotidase, quanto a redução na atividade da enzima ADA em plaquetas de pacientes com SMet. O fato de manter a atividade enzimática nos mesmos níveis dos indivíduos saudáveis indica que os níveis circulantes de ATP e ADP, que são moléculas que induzem a agregação plaquetária, se mantiveram em níveis fisiológicos, o que provavelmente contribuiu para a prevenção da agregação plaquetária, também observada ao final das 30 semanas de treinamento.

A capacidade que o exercício físico tem de promover adaptações positivas no metabolismo energético, bem como na funcionalidade mitocondrial, permite manter a integridade celular (RUSSO, 2012; SAMSON & GARBER, 2014), induzindo à inativação dos mecanismos compensatórios observados através das atividades das ectonucleotidases. A correlação positiva entre as atividades das enzimas E-NTPDase, E-NPP e E-5'-nucleotidase e os níveis dos marcadores pró-trombóticos observados no estudo ressaltam a relação direta da alteração metabólica e as alterações enzimáticas, enquanto que o exercício se destaca por ter a capacidade de regular o metabolismo e, assim, modular as ectonucleotidases.

Da mesma forma, o plano de treinamento físico foi capaz de reverter tanto o aumento na atividade da enzima E-NTPDase, quanto a redução na atividade da enzima ADA em linfócitos de pacientes com SMet após 30 semanas de exercício físico. Após 15 semanas de treinamento, também ocorreu redução na atividade da E-NTPDase e aumento na atividade da ADA, mas as atividades enzimáticas apenas atingiram os mesmos níveis dos indivíduos saudáveis após as 30 semanas de treinamento, o que claramente expressa a necessidade de praticar exercícios com regularidade para a obtenção de melhores efeitos protetores.

Além disso, após as trinta semanas de exercício, a restauração metabólica, observada pela diminuição dos fatores de risco cardiovasculares, novamente coincidiu com as atividades enzimáticas atingindo os níveis basais. Para a célula linfocitária, isso pode representar a restauração da sua integridade celular a partir do equilíbrio metabólico, assim como a diminuição do processo inflamatório através da regulação

dos níveis de ATP extracelular, o qual é sabidamente uma molécula pró-inflamatória (ESSER et al., 2014), induzindo, assim, a inativação do mecanismo compensatório via enzimas purinérgicas.

Cabe destacar também que o tecido adiposo visceral, determinado pela circunferência abdominal na SMet, é considerado a principal via secretora de moléculas pró-inflamatórias, denominadas adipocinas, sendo responsável por grande parte da inflamação crônica de baixo grau observada nos pacientes com a síndrome. Esse processo inflamatório também pode se estender ao fígado, resultando na esteatose ou ativação de vias hepáticas do estresse, perpetuando a inflamação (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010; OHGO et al., 2009).

O exercício físico regular, por sua vez, aumenta a metabolização lipídica e reduz a taxa corporal de gordura. Com isso, o tecido adiposo subcutâneo diminui a sobrecarga de armazenamento, melhora o fluxo sanguíneo e restaura a integridade dos adipócidos, reduzindo, assim, a produção de adipocinas pró-inflamatórias. Esses mesmos efeitos benéficos do exercício se estendem ao fígado, reduzindo a esteatose e promovendo a manutenção de integridade hepática (GIACAGLIA, DA SILVA & DOS SANTOS, 2010).

Corroborado com esses dados, este estudo também observou a redução dos marcadores inflamatórios e hepáticos após as 30 semanas de treinamento, o que destaca o exercício físico como uma importante via anti-inflamatória. Observou-se também que a circunferência abdominal, a PC-R e o ALT/AST *ratio* se correlacionam de forma positiva com a atividade da E-NTPDase e de forma negativa com a atividade da ADA em linfócitos de pacientes com SMet. Esses dados reafirmam a atuação dessas enzimas como uma resposta orgânica compensatória do organismo frente ao desbalanço metabólico e ao processo inflamatório.

Entretanto, para que todas as suposições feitas até aqui se confirmem, é importante que se meça a expressão das enzimas purinérgicas em plaquetas e em linfócitos, assim como a dosagem do conteúdo circulante de ATP e de ADP nos pacientes com SMet, antes e após a intervenção física.

Ainda assim, este estudo permitiu desvendar em parte os mecanismos relacionados aos processos protetores advindos da prática regular de exercícios físicos na SMet relativos aos processos inflamatórios e à agregação plaquetária. Os resultados observados apontam para o fato de que o exercício atua como modulador

da atividade das enzimas do sistema purinérgico na condição da SMet e, dessa forma, pode exercer controle sobre os níveis dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina. Sugere-se que essas respostas tenham sido provenientes das adaptações ocorridas no organismo decorrentes dos estímulos causados pelo exercício. Contudo, incentiva-se que mais estudos sejam realizados a fim de melhor elucidar os mecanismos moleculares que estão atuando nesta modulação.

## 5. CONCLUSÕES

- De forma geral, os pacientes com SMet apresentaram significativo aumento de peso, de IMC, de circunferência abdominal, de pressão arterial, de glicemia e dislipidemia. Porém, essas alterações foram modificadas pelo exercício físico, especialmente quando praticado de forma regular e por longo prazo, o que reforça os seus efeitos benéficos no tratamento da SMet.
- Os parâmetros inflamatórios, como PC-R, MPO e ácido úrico, assim como a contagem total de leucócitos e de linfócitos estavam aumentados nos pacientes com SMet. Contudo a prática regular de exercícios físicos, especialmente ao final de 30 semanas, foi capaz de reduzir esses marcadores. Isso enfatiza o efeito anti-inflamatório do treinamento físico regular na condição da SMet.
- A prática regular de exercícios físicos diminuiu a agregação plaquetária, que se mostrou elevada previamente ao plano de exercícios, nos pacientes com SMet, sugerindo importante papel do treinamento físico na prevenção de processos trombóticos.
- A atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP e E-5'-nucleotidase estava aumentada, enquanto que a atividade da enzima ADA estava diminuída em plaquetas de pacientes com SMet. Isso indica um efeito compensatório dessas enzimas frente a condição da SMet, induzindo a depleção de ATP e ADP e à produção de adenosina, uma molécula anti-agregante. A prática regular de exercícios físicos demonstrou ser capaz de reverter essas alterações enzimáticas.
- Em linfócitos, a atividade da enzima E-NTPDase se mostrou aumentada e a atividade da enzima ADA diminuída nos pacientes com SMet. Contudo, o exercício físico foi eficaz em reverter essas alterações enzimáticas, sugerindo que a possível redução dos níveis de ATP circulantes pelo treinamento esteja relacionada com os mecanismos anti-inflamatórios advindos da prática regular de exercícios físicos.

## 6. PERSPECTIVAS

Este trabalho forneceu subsídios importantes para o esclarecimento da relação entre as enzimas do sistema purinérgico na condição da SMet, bem como o papel da prática do exercício físico regular sobre as mesmas nesta patologia. Entretanto, muitos aspectos da inter-relação SMet, exercícios e sistema purinérgico precisam ser esclarecidos.

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

- Avaliação dos níveis de outros marcadores inflamatórios, como as interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) na SMet antes e após o plano de exercício físico.
- Verificação da expressão das enzimas E-NTPDase, E-5'-Nucleotidase e ADA em plaquetas e em linfócitos dos pacientes com SMet, pré e pós-exercício físico.
- Quantificação, pré e pós-exercício físico, do nível sorológico dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e do nucleosídeo adenosina.
- Verificação da densidade dos receptores purinérgicos em plaquetas e em linfócitos na condição da SMet, pré e pós-exercício físico.

## 7. REFERÊNCIAS

ACCILI, D. The struggle for mastery in insulin action: from triumvirate to republic. **Diabetes**, v. 53, p. 1633-1642, 2004.

AHIRWAR, A. K. et al. Imbalance between protective (adiponectin) and prothrombotic (Plasminogen Activator Inhibitor-1) adipokines in metabolic syndrome. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 8, p. 152–155, 2014.

ALESSI, M. C.; JUHAN-VAGUE, I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, p. 995-1000, 2008.

ASTERHOLM, I. W. et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell Metabolism**, v. 20, p. 103–118, 2014.

BADIMÓN, L.; VILAHUR, G.; PADRÓ, T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. **Revista Española de Cardiología**, v. 62, n. 10, p. 1161-1178, 2009.

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

BAGATINI, M. D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1181–1185, 2008.

BALDISSARELLI, J. et al. Hypothyroidism Enhanced ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in rat synaptosomes can be prevented by the naturally occurring polyphenol quercetin. **Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 1-11, 2016.

BASSI, N. et al. Lifestyle Modification for Metabolic Syndrome: A Systematic Review. **The American Journal of Medicine**, v. 127, n. 12, p. 1242e1-1242e10, 2014.

BIOGONESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, v.43, p. 5511-5519, 2004.

BIRK, A. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.140, p.166-175, 2002.

BONO, M. R. et al. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. **FEBS Letters**, v. 589, p. 3454-3460, 2015.

BOUCHARD, C. Genetics and the metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 19, p. 52-59, 1995.

BRAUN, N. et al. functional expression and characterization of rat NTPDase 6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **The Biochemical Journal**, v. 351, p. 639-647, 2000.



CAMPOS, J. C.; GOMES, K. M. S.; FERREIRA, J. C. B. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p.107-119, 2013.

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

CARDOSO, A. M. et al. Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats. **Journal of Hypertension**, v. 33, n. 4, p. 763-772, 2015.

CHURCH, T. Exercise in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 53, p. 412–418, 2011.

COLATO, A. et al. Effects of concurrent training on inflammatory markers and expression of CD4, CD8, and HLA-DR in overweight and obese adults. **Journal of Exercise Science & Fitness**, v. 12, p. 55-61, 2014.

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

COOKE, A. A. et al. Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. **European Journal of Pharmacology**, In Press, Corrected Proof, Available online 12 Apr. 2016.

CRECELIUS, A. R.; KIRBY, B. S.; DINENNO, F. A. Intravascular ATP and the regulation of blood flow and oxygen delivery in humans. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 43, n. 1, p. 5-13, 2015.

da SILVA, C. A. et al. High-intensity aerobic training improves endothelium-dependent vasodilation in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 95, n. 2, p. 237–245, 2012.

de AGUIAR, L. G. K.; VILLELA, N. R.; BOUSKELA E. A. Microcirculação no Diabetes: Implicações nas Complicações Crônicas e Tratamento da Doença. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 204-211, 2007.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, p. 117-123, 2015.

DRIGNY, J. et al. Long-term lifestyle intervention and optimized high intensity interval training program improve body composition, cardiovascular risk and exercise capacity in obese patients with or without metabolic syndrome. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 54, n. 1, p. 155, 2011.

DUARTE, M. C. et al. Prevalence of metabolic syndrome and prediabetes in a urban population of Guayaquil, Ecuador. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, In Press, Corrected Proof, Available online 12 Mar., 2016.

DUDLEY, G.A.; FLECK, S.J. Strength and Endurance Training: are they mutually exclusive? **Sports Medicine**, v. 4, n. 2, p. 79-85, 1987.

DUFFAUT, C. et al. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 384, n. 24, p. 482–485, 2009.

DUTRA, E. S. et al. Metabolic syndrome in central Brazil: prevalence and correlates in the adult population. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2012.

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

EGAN, B. M. Insulin resistance and the sympathetic nervous system. **Current Hypertension Reports**, v. 5, p. 247-254, 2003.

ELIZONDO-MONTEMAYOR, L. et al. Association of ALT and the metabolic syndrome among Mexican children. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 8, p. 79-89, 2014.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic Signaling during Inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 24, p. 2322–2333, 2012.

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

ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, p. 141-150, 2014.

FERRARI, D. et al. Purinergic signaling in atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 3, p. 184-192, 2015.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 4, p. 282-294, 1997.

GAYLE III, R. B. et al. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.9, p.1851-1859, 1998.

GIACAGLIA, L. R.; DA SILVA, M. E. R.; DOS SANTOS, R. F. **Tratato de Síndrome Metabólica**. 1. ed. São Paulo: Rocca Ltda, 2010.

GREENWOOD, E. A. et al. Vigorous exercise is associated with superior metabolic profiles in polycystic ovary syndrome independent of total exercise expenditure. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 2, p. 486-493, 2016.

GRONNER, M. F. et al. Prevalence of metabolic syndrome and its association with educational inequalities among Brazilian adults: a population-based study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 7, p. 713-719, 2011.

GRUNDY, A. M. Metabolic syndrome update. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, p. 364-373, 2016.

HAKKINEN, K. et al. Neuromuscular adaptations during concurrent strength and endurance training versus strength training. **European Journal of Applied Physiology**, v. 8, n. 91, p. 42, 2003.

HAN, T. S. et al. Separate associations of waist and hip circumference with lifestyle factors. **International Journal of Epidemiology**, v. 27, p. 422-430, 1998.

HAN, T. S.; LEAN, M. E. J. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Journal of the Royal Society of Medicine Cardiovascular Disease**, v. 5, p. 1–13, 2016.

HAN, T. S.; LEAN, M. E. J. Metabolic syndrome. **Medicine**, v. 43, n. 2, p. 80-87, 2015.

HEVENER, A.; CLEGG, D. J.; MAUVAIS-JARVIS, F. Impaired estrogen receptor action in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 306-321, 2015.

HYOGO, H.; YAMAGASHI, S. Advanced glycation and products (AGEs) and their involvement in liver disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 10, p. 969-972, 2008.

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

IP, B. C.; HOGAN, A. E.; NIKOLAJCZYK, B. S. Lymphocyte roles in metabolic dysfunction: of men and mice. **Trends in Endocrinology and Metabolism February**, v. 26, n. 2, p. 91-100, 2015.

JACQUIN, L. et al. Search for adenosine A2A spare receptors on peripheral human lymphocytes. **FEBS Open Bio**, v. 3, p. 1–5, 2013.

JOHNSTON-COX, H. A.; RAVID, K. Adenosine and blood platelets. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 357–365, 2011.

KAHNER, B. N. et al. Nucleotide receptor signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 11, p. 2317-2326, 2006.

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

KASTORINI, C. M. et al. Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease incidence: The ATTICA study. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 26, p. 223-231, 2016.

KERN, P. A. et al. The expression of tumor necrosis factor-alpha in human adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2111-2121, 1995.

KIM, J.; CHOI, Y. H. Physical activity, dietary vitamin C, and metabolic syndrome in the Korean adults: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008 to 2012. **Public Health**, v. 135, p. 30-37, 2016.

KOWLURU, R. A.; ZHONG, Q.; KANWAR, M. Metabolic memory and diabetic retinopathy: Role of inflammatory mediators in retinal pericytes. **Experimental Eye Research**, v. 90, n. 5, p. 617-623, 2010.

KRANENDONK, M. E. G et al. Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: Distinct fat depots and vascular risk factors. **Atherosclerosis**, v. 239, p. 419-427, 2015.

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

LE, G. Y.; ESSACKJEE, H. C.; BALLARD, H. J. Intracellular adenosine formation and release by freshly-isolated vascular endothelial cells from rat skeletal muscle: effects of hypoxia and/or acidosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 93-98, 2014.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1721, n. 1–3, p. 9-15, 2005.

LI, H. B. et al. Inflammasome activation and metabolic disease progression. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, p. 699–706, 2014.

LUNKES G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, p. 189–194, 2003.

MATHIEU, P. Pharmacology of ectonucleotidases: Relevance for the treatment of cardiovascular disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 696, p. 1–4, 2012.

MATSUO, T. et al. Effect of aerobic exercise training followed by a low-calorie diet on metabolic syndrome risk factors in men. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 25, p. 832-838, 2015.

MCALLISTER, R. M.; HIRAI, T.; MUSCH, T. I. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 27, p. 1145–1151, 1995.

MEHTA, N. et al. Purinergic receptor P2X7: A novel target for anti-inflammatory therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 54–88, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças ligadas à obesidade custam R\$ 488 milhões.** 19 mar. 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/3414-doencas-ligadas-a-obesidade-custam-r-488-milhoes>> Acesso em: 28 mar. 2016.

MONTESI, L. et al. Physical activity for the prevention and treatment of metabolic disorders. **Internal and Emergency Medicine**, v. 8, p. 655-666, 2013.

MURUCI, G. R.; FRANCISCO, I.; ALVES, M. A. R. Prevalence of associated metabolic syndrome components in Brazil and critical review of dietary factors in prevention and treatment. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 9, n. 1, 2015.

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

NISHIMURA, S. et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**, v. 15, p. 914–920, 2009.

OH, D.Y. et al. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. **Diabetes**, v. 61, p. 346–354, 2012.

OHGO, H. et al. Significance of ALT/AST ratio for specifying subjects with metabolic syndrome in its silent stage. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 3, p. 3-6, 2009.

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

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian Journal of Medicine & Science**, v. 3, p. 1-72, 2015.

PEERI, M.; AMIRI, S. Protective effects of exercise in metabolic disorders are mediated by inhibition of mitochondrial-derived sterile inflammation. **Medical Hypotheses**, v. 85, p. 707–709, 2015.

POLACHINI, C. R. N. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, p. 266-274, 2014.

RALEVIC, V.; DUNN, W. R. Purinergic transmission in blood vessels. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 191, p. 48–66, 2015.

RAO, A.; PANDYA, V.; WHALEY-CONNELL, A. Obesity and Insulin Resistance in Resistant Hypertension: Implications for the Kidney. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 22, n. 3, p. 211-217, 2015.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

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

RUSSO I. The Prothrombotic Tendency in Metabolic Syndrome: Focus on the Potential Mechanisms Involved in Impaired Haemostasis and Fibrinolytic Balance. **Scientifica (Cairo)**, v. 2012, p.1-17, 2012.

RYAN, J. G. et al. Metabolic syndrome and prevalence in an urban, medically underserved, community-based population. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 4, p. 137–142, 2010.

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

SALAH, A. et al. Genetic polymorphism of S447X lipoprotein lipase (LPL) and the susceptibility to hypertension. **Journal of Critical Care**, v. 24, p. 11-14, 2009.

SAMSON, S. L.; GARBER, A. J. Metabolic Syndrome. **Endocrinology and Metabolic Clinics of North America**, v. 43, p. 1-23, 2014.

SANTILLI, F. et al. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. **Obesity Reviews**, v. 13, p. 27-42, 2012.

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

SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5-Nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **BioFactors**, v. 30, p. 1–22, 2007.

SCHMATZ, R. 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. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 65, p. 129–43, 2013.

SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.

SHEPHARD, R. J.; BALADY, G. J. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation**, v. 99, p. 963-972, 1999.

SHI, J. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.17471-17478, 2001.

SINGH, M.; MENSAH, G. A.; BAKRIS, G. Pathogenesis and Clinical Physiology of Hypertension. **Cardiology Clinics**, v. 28, p. 545-559, 2010.

SMOYER-TOMIC, K. E. et al. The association between neighborhood socioeconomic status and exposure to supermarkets and fast food outlets. **Health Place**, v. 14, p. 740-754, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 1-28, abr., 2005.

SORESI, M. et al. Effects of steatosis on hepatic hemodynamics in patients with metabolic syndrome. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 41, n. 6, p. 1545-1552, 2015.

SOYSAL, A. et al. Prevalence of Metabolic Syndrome and Affecting Factors among Individuals Aged 30 and over in Balçova District of İzmir. **Balkan Medical Journal**, v. 33, p. 331-338, 2016.

SPANVELLO, R. M. et al. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 411; p. 210-214, 2010.

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

STOREY, R. F. et al. The central role of the P (2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. **British Journal of Haematology**, v. 110, p. 925–934, 2000.

THOMÉ, G. R. et al. Nicotine alters the ectonucleotidases activities in lymphocytes: In vitro and in vivo studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 3, p. 206-212, 2012.

TZIOMALOS, K. et al. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: Prevalence, pathogenesis and management. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 140-146, 2010.

UNWIN, N. et al. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. **Diabetic Medicine**, v. 19, n. 9, p. 708-723, 2002.

VAN DER STOEP, M.; KORPORAAL, S. J. A; VAN ECK, M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. **Cardiovascular Research**, v. 103, p. 362-371, 2014.

VERGES, B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. **Diabetes & Metabolism**, v. 31, p. 429-439, 2005.

VIDIGAL, F. C. et al. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1198, 2013.

VON HUNDELSHAUSEN, P.; WEBER, C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 100, p. 27–40, 2007.

WAJCHENBERG, B. L. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 5, p. 514-519, 2002.

WANG, C. H. et al. Effects of endurance exercise training on risk components for metabolic syndrome, interleukin-6, and the exercise capacity of postmenopausal women. **Geriatric Nursing**, v. 35, p. 212-218, 2014.

WELTY, F. K.; ALFADDAGH, A.; ELAJAMI, T. K. Targeting inflammation in metabolic syndrome. **Translational Research**, v. 167, n. 1, p. 257-280, 2016.

WINER, S. et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nature Medicine**, v. 15, n. 23, p. 921–929, 2009.

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

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 1, p. 40-45, 2012.

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

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

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.20, p.231-236, 1999.



## ANEXOS

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O SISTEMA PURINÉRGICO E SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

**Pesquisador:** Vera Maria Melchiors Morsch

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19435813.8.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 417.003

**Data da Relatoria:** 01/10/2013

##### Apresentação do Projeto:

A avaliação do exercício físico sobre a atividade das enzimas que degradam os nucleotídeos de adenina em pacientes com Síndrome Metabólica (Smet) pode ser de fundamental importância no entendimento do mecanismo de ação dessa patologia e no desenvolvimento de novas terapias. Para tanto, serão dosadas as atividades e expressão de Ecto-enzimas em plaquetas e linfócitos de pacientes controles e de pacientes com Smet antes e após um período de exercícios físicos, assim como o nível de nucleotídeos sorológicos dos respectivos grupos. Também serão avaliados marcadores inflamatórios, como mieloperoxidase e proteína C-reativa

##### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal da pesquisa é avaliar o efeito do exercício físico no sistema purinérgico em plaquetas e linfócitos de pacientes com Síndrome Metabólica (Smet).

Objetivos secundário são: Avaliar o nível de marcadores inflamatórios, como a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE); a proteína C-reativa (PC-R), as interleucinas e o ácido úrico, na Smet antes e após o plano de exercícios físicos e no grupo controle. Analisar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-NPP, E-5-Nucleotidase e ADA em plaquetas e linfócitos de pacientes com Smet pré e pós-

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi

**CEP:** 97.105-900

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 417.003

exercício físico e em pacientes controles. Verificar a expressão das enzimas E-NTPDase e E-5-Nucleotidase em plaquetas e linfócitos da população estudada. Quantificar o nível sorológico dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e do nucleosídeo adenosina em ambos os grupos. Avaliar a agregação plaquetária no plasma rico em plaquetas desses pacientes. Verificar in vitro a influência dos medicamentos utilizados no tratamento de pacientes com SMet pré e pós- exercício na agregação plaquetária e na atividade das enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em plaquetas e linfócitos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

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

Benefícios: Justifica-se este estudo tendo em vista que pacientes com SMet apresentam maiores chances de desenvolver doenças cardiovasculares, coronarianas e cerebrovasculares. O benefício do estudo para os participantes é a possibilidade de verificar fatores predisponentes e envolvidos na SMet, assim como atitudes preventivas que poderão tomar.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é um ensaio clínico com amostra não randomizada que visa avaliar o efeito do exercício físico no sistema purinérgico em plaquetas e linfócitos de pacientes com Síndrome Metabólica (SMet). Os pacientes voluntários diagnosticados com Síndrome Metabólica serão acompanhados em torno de seis meses, sendo que no momento do diagnóstico será realizada a primeira coleta de dados. Posteriormente, esses pacientes serão submetidos a exercícios físicos aeróbicos e de hipertrofia muscular, três vezes por semana, durante 30 semanas. Então, 24h após o término do plano de exercícios, será realizada a segunda coleta de sangue do grupo SMet. Os exercícios físicos que serão abordados incluem caminhada como exercício aeróbio e musculação como exercício de resistência e hipertrofia muscular. Para o grupo controle constituído por indivíduos saudáveis, será realizada apenas uma coleta de sangue, sem a interferência do exercício físico. Esse delineamento será realizado até que o grupo de estudo contemple o número de participantes estipulado. Os sujeitos serão avaliados em número de 50 para cada grupo. Apresenta e materiais utilizados serão obtidos através de recursos de projetos vinculados ao CNPq/CAPES e FAPERGS. O cronograma prevê início da pesquisa em maio

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900

UF: RS Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 417.003

de 2013 e encerramento em abril de 2016.

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

Apresenta os documentos obrigatórios (folha de rosto, projeto de pesquisa, cronograma adequado e orçamento da pesquisa, folha de registro no GAP, termo de confiabilidade e TCLE assinados pela pesquisadora responsável, autorização dos locais onde ocorrerão as atividades e as análises laboratoriais).

**Recomendações:**

Não há recomendações.

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

O projeto pode ser aprovado sem restrições.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

SANTA MARIA, 07 de Outubro de 2013

---

Assinador por:

Félix Alexandre Antunes Soares  
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900

UF: RS Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado: **EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O SISTEMA PURINÉRGICO E SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA**, através da acadêmica Caroline Curry Martins, orientada pela Dra. Vera Maria Morsch, que tem como objetivo avaliar a atividade de componentes sangüíneos, que se alteram durante a SMet, a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na SMet. Justifica-se este estudo tendo em vista que pacientes com SMet apresentam maiores chances de desenvolver doenças cardiovasculares, coronarianas e cerebrovasculares. Os benefícios do estudo para os participantes é a possibilidade de verificar fatores predisponentes e envolvidos na SMet sendo esses informados e esclarecidos de atitudes preventivas que poderão tomar.

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

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

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

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

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

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

Santa Maria, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 201\_\_.

\_\_\_\_\_

Assinatura

Caroline Curry Martins/ Pesquisadora/ (55)99045111

Vera Maria Morsch/ Orientadora/ (55)91422611

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria

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

Cidade Universitária - Bairro Camobi

97105-900 - Santa Maria - RS

## APÊNDICE B – Questionário para anamnese.



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



#### ANAMNESE

NOME: \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ SEXO: ( ) Masculino ( ) Feminino

IDADE: \_\_\_\_\_ TELEFONE: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

HISTÓRIA DE PATOLOGIAS: \_\_\_\_\_

SINTOMAS DIFERENTES: \_\_\_\_\_

HISTÓRIA DE CIRURGIAS: \_\_\_\_\_

PATOLOGIAS NOS FAMILIARES PRÓXIMOS: \_\_\_\_\_

PROBLEMAS ORTOPÉDICOS: \_\_\_\_\_

MEDICAMENTOS EM USO: \_\_\_\_\_

FUMA: ( ) SIM ( ) NÃO QUANTOS CIGARROS POR DIA: \_\_\_\_\_

POSSUI CONVÊNIO MÉDICO: ( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

PRÁTICA ATIVIDADE FÍSICA: ( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

PRATICAVA NA ADOLESCÊNCIA: ( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

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