

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

UFFS

Campus de Chapecó

Curso de Graduação em Medicina

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TREINAMENTO DE FORÇA EM
MULHERES HIPERTENSAS: O PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES**

Mônica Dayane Lammers

Nyasmin Mendes Anéli

Chapecó-SC, 2019

MÔNICA DAYANE LAMMERS

NYASMIN MENDES ANÉLI

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TREINAMENTO DE FORÇA EM
MULHERES HIPERTENSAS: O PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES**

Artigo resultante do Trabalho de Curso apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul como parte
dos requisitos para obtenção do grau de Médico(a).
Professora Orientadora: Dra. Andréia Machado Cardoso.
Professor Co-orientador: Dr. Leandro Henrique Manfredi

Chapecó-SC, novembro, 2019.

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TREINAMENTO DE FORÇA EM
MULHERES HIPERTENSAS: O PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES**

Mônica Dayane Lammers

Nyasmin Mendes Anéli

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Andréia Machado Cardoso UFFS – Orientadora

Prof. Dr. Leandro Henrique Manfredi UFFS – Co-orientador

Prof^a. Dr^a. Aline Mânica – Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica UFSM

Prof^a. Dr^a. Daniela Zanini – Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica UFSM

Chapecó, 2019

TÍTULO: O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TREINAMENTO DE FORÇA EM MULHERES HIPERTENSAS: O PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES

TÍTULO BREVE: Exercício atenua inflamação na hipertensão

AUTORES: Mônica D. LAMMERS (a); Nyasmin M. ANÉLI (a); Leandro H.

MANFREDI (b); Gabriela G. de OLIVEIRA (b); Margarete D. BAGATINI (b); Clodoaldo A. de. SÁ (c); Andréia M. CARDOSO (b).

(a) Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Medicina, Chapecó, SC.

(b) Universidade Federal da Fronteira Sul, Coordenação Acadêmica, Curso de Medicina, Chapecó, SC.

(c) Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Chapecó, SC.

Correspondências para: Andréia Machado Cardoso, Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Medicina, Campus Chapecó, Chapecó SC, CEP 89802-112, Brasil. Tel: +55 49 999611000; e-mail: andreia.cardoso@uffs.edu.br

Contagem de Palavras do Manuscrito: 5990

Número de Tabelas: 1

Número de Figuras: 3

Mônica Dayane Lammers

Nyasmin Mendes Anéli

acadêmicos(as)

**O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TREINAMENTO DE FORÇA EM
MULHERES HIPERTENSAS: O PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES**

Título do trabalho

Trabalho de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de aprovação no respectivo componente da grade do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul - *campus* Chapecó.

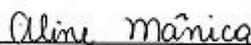
Orientador(a): Prof(*). Dr(*). **Andréia Machado Cardoso**

Este trabalho de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 21 / 11 / 2019

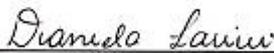
BANCA EXAMINADORA



Prof(*). Dr(*). Andréia Machado Cardoso



Prof(*). Dr(*). Aline Mânica



Prof(*). Dr(*). Daniela Zanini

SUMÁRIO

RESUMO	7
RESUMO CONDENSADO:.	8
PALAVRAS-CHAVE:	8
LISTA DE ABREVIACÕES:	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	13
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	24
AGRADECIMENTOS	27
CONFLITOS DE INTERESSE	27
REFERÊNCIAS	28
TABELAS E FIGURAS	33

RESUMO

Antecedentes e método: A hipertensão arterial sistêmica desencadeia um processo inflamatório crônico no organismo e o sistema purinérgico apresenta papel importante na ativação das funções imunológicas nessa doença, podendo modular a inflamação. O exercício físico contribui para a melhora da saúde cardiovascular, além de ter um papel importante na regulação do sistema purinérgico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do treinamento de força na atividade das ectonucleotidases em linfócitos de pacientes hipertensas, no perfil lipídico, variáveis antropométricas e marcadores inflamatórios (PCR, IL-6 e IL 10). Fizeram parte deste estudo 77 mulheres de meia idade divididas em dois grupos; grupo hipertenso (n=41) composto por mulheres hipertensas sedentárias que fazem uso de medicamento anti-hipertensivo, e grupo controle (n=36) composto por sedentárias e normotensas, submetidas ao protocolo de 6 meses de treinamento de força. Os linfócitos e o soro foram separados para análise.

Resultados: Após o protocolo de 6 meses de exercício o grupo hipertenso exibiu uma diminuição dos níveis pressóricos sistólicos, dos níveis de PCR e ATP, da atividade das ectonucleotidases e da ADA e um aumento nos níveis de IL-10. Estes achados corroboram para a prevenção das alterações enzimáticas provocadas pela hipertensão, induzindo um ambiente anti-inflamatório, além da manutenção da pressão arterial.

Conclusão: Esses achados destacam a importante relação entre a sinalização purinérgica e o processo inflamatório, além de sugerirem que o treinamento de força é uma importante ferramenta terapêutica a ser explorada para o manejo hipertensão e para outras doenças que causam inflamação crônica no organismo.

RESUMO CONDENSADO: A hipertensão está associada a um processo inflamatório crônico e o sistema purinérgico pode modular a inflamação. Destaca-se que o exercício físico possui um papel importante na modulação do sistema purinérgico. Após seis meses do protocolo de treinamento de força, o exercício promoveu a redução dos níveis pressóricos, além de atenuar o perfil inflamatório e modular a atividade das ectonucleotidases, promovendo um ambiente anti-inflamatório. Esses achados destacam a relação entre sistema purinérgico e inflamação, sugerindo que o treinamento de força é uma importante ferramenta terapêutica a ser explorada para o manejo da hipertensão e outras doenças que causam inflamação crônica.

PALAVRAS-CHAVE: Hipertensão; Sistema Purinérgico; Ecto-NTPDases; Inflamação; Treinamento de força;

LISTA DE ABREVIACÕES: ADA, adenosina deaminase; ADP, difosfato de adenosina; AMP, monofosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; FC, frequência cardíaca; HAS, hipertensão arterial sistêmica; IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; IMC, índice de massa corpórea; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PCR, proteína C reativa; TF, treinamento de força; UFFS, Universidade Federal da Fronteira Sul.

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial [1]. Segundo a Organização Mundial da Saúde, um em cada quatro homens e uma em cada cinco mulheres, ou seja, 22% da população mundial com mais de 18 anos, é acometida por essa doença, que representa um importante fator de risco para outras comorbidades cardiovasculares como acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, aneurismas e doença renal crônica [1,2]. Além disso, as doenças associadas à hipertensão apresentam altos custos sociais e sanitários e estão associadas a uma diminuição da expectativa de vida, tornando sua prevenção essencial [1,3].

Estudos recentes apontam para uma estreita relação entre a HAS e inflamação [4,5,6,7]. Os altos níveis pressóricos, provocam lesão tecidual e, por consequência, um quadro inflamatório crônico no organismo, desencadeado pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e pelo aumento do recrutamento e ativação dos linfócitos através do remodelamento vascular. Essas alterações provocadas pelo processo inflamatório implicam diretamente na elevação dos níveis pressóricos e na manutenção da HAS [8,9]. Além disso, esse processo inflamatório pode ser agravado na presença de excesso de gordura corporal e um estilo de vida sedentário [10].

Neste contexto, sistema purinérgico, que é um sistema de sinalização celular, possui um importante papel na regulação da inflamação. Esse sistema é composto principalmente por nucleotídeos de adenina: trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP), adenosina e inosina, os receptores (P1 e P2), e as enzimas denominadas ectonucleotidases (ecto-NTPDase, ecto-5' nucleotidase e adenosina deaminase (ADA)) [4, 11].

Já se sabe que o ATP liberado pela degradação das células do organismo é reconhecido por receptores purinérgicos específicos como um sinal de perigo, provocando, assim, uma variedade de respostas inflamatórias [11]. Após ser liberado no meio extracelular, o ATP pode ser rapidamente hidrolisado em ADP e AMP pela ecto-NTPDase, também conhecida como CD39. O AMP formado pode ser convertido em adenosina pela ação da ecto-5'nucleotidase (CD73) e a adenosina é hidrolisada em inosina pela ADA [12]. Estas enzimas são encontradas na membrana celular de células do sistema imunológico, especialmente em linfócitos [11,12].

A ação promovida pelo sistema purinérgico ocorre através da concentração e interação dos nucleotídeos de adenina e seu nucleotídeo correspondente adenosina com os seus receptores [13]. Estes receptores são expressos nas células inflamatórias como neutrófilos, monócitos e macrófagos, células dendríticas e também em linfócitos, células protagonistas da resposta inflamatória [14,15]. O ATP ligado a seus receptores purinérgicos em linfócitos desencadeia respostas pró-inflamatórias, como liberação de interleucina 6 (IL-6), além de ativar e recrutar os linfócitos para a área de interesse, enquanto que a adenosina desencadeia respostas supressoras a essa inflamação, como, por exemplo, estimular liberação de interleucina 10 (IL-10) pelos linfócitos [8,13]. Esses fatores podem estar intimamente relacionados ao quadro hipertensivo, pois observa-se que pacientes hipertensos apresentam níveis elevados de marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa (PCR) e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, quando comparado com níveis de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 [4,16].

Com relação a concentração dos nucleotídeos, em um meio onde a concentração de ATP é maior, haverá maior interação ligante-receptor, promovendo, assim, uma resposta pró-inflamatória; em contrapartida a adenosina em maiores concentrações suprime essa resposta favorecendo uma resposta anti-inflamatória [8,13]. Então, a complexa rede de enzimas que

regula e concentração dos nucleotídeos e sua interação com os receptores P1 e P2 tem um papel central na definição das respostas imunes em diferentes tecidos [8,11,17] e a atividade da ecto-NTPDases e ADA são particularmente importantes para o equilíbrio entre os efeitos pró e anti-inflamatórios do ATP extracelular liberado [13]. As purinas estão emergindo como moléculas de sinalização extracelular poderosas, que podem restringir o início, a duração da magnitude e a resolução da resposta inflamatória. Alterações na maquinaria purinérgica são um fator contribuinte para os processos fisiopatológicos subjacente ao início e desenvolvimento de doenças que envolvam inflamação [8].

A eficácia da terapia anti-hipertensiva é relatada abaixo de 55%, mesmo em países desenvolvidos, chegando a 15% em países menos desenvolvidos [18]. Uma das razões à baixa eficácia das terapias anti-hipertensivas é especulada devido a uma prescrição inadequada de medicamentos [19]. O exercício físico já é bem descrito como primeira e principal linha de tratamento para muitas doenças, inclusive a HAS, pois está associado a melhora da saúde cardiovascular [17]. A principal alteração da prática contínua do exercício físico está relacionada a sua ação anti-inflamatória [17,20].

Outros estudos já demonstraram a eficácia do exercício físico sobre o sistema purinérgico em linfócitos de modelos animais hipertensos, na indução de um ambiente anti-inflamatório [4]. No entanto, pouco se sabe ainda sobre esse mecanismo associado à HAS, principalmente em humanos. Neste contexto, a novidade deste estudo é a proposta de investigar a relação entre HAS e SP em linfócitos de pacientes hipertensas, bem como a contribuição do treinamento de força (TF).

Considerando a importância do sistema purinérgico modulando funções imunológicas e que o exercício está sendo considerado uma das principais mudanças no estilo de vida que contribui para a melhora da saúde cardiovascular, e que as medicações para essa doença não estão sendo bem utilizadas, este estudo é pioneiro na investigação do efeito

crônico do TF na atividade e na expressão das ectonucleotidases em linfócitos, nos níveis de ATP e sua associação com marcadores inflamatórios clássicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos da Pesquisa:

Fizeram parte deste estudo 77 mulheres de meia idade (faixa etária entre 45 e 59 anos de idade) de etnias variadas, sendo a caucasiana predominante, oriundas de diferentes bairros do município de Chapecó/SC. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: grupo hipertenso (n=41) composto por mulheres hipertensas, sedentárias e que fazem uso de medicamento anti-hipertensivo, submetidas ao treinamento de força; e grupo normotenso (n=36) composto por mulheres sedentárias e normotensas. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), protocolo 1.916.904.

No grupo de hipertensas foram incluídas mulheres com diagnóstico de HAS e em tratamento clínico, com níveis de pressão arterial inferiores aos níveis considerados graves para essa doença, sendo a pressão arterial sistólica (PAS) menor que 160 mmHg e a pressão arterial diastólica (PAD) inferior a 120 mmHg [3]. No grupo normotenso foram incluídas mulheres sem diagnóstico de HAS, cujos valores de PAS e PAD, medidos em dois dias não consecutivos e em horários diferentes, eram iguais ou inferiores a 120 e 80 mmHg, respectivamente [3].

Foram excluídas do estudo as mulheres que apresentaram comorbidades que representavam contraindicação clínica para participarem da pesquisa, que fizeram uso de qualquer medicamento que possa ter influenciado nos resultados do estudo e mulheres fumantes. Também foram excluídos da análise os dados das mulheres que faltaram em três sessões consecutivas ou a mais de cinco sessões ao longo dos seis meses de duração do protocolo de intervenção.

Além disso, foram realizadas coletas de sangue para análises em 3 momentos diferentes: antes do início do protocolo de TF, após 3 meses, e após 6 meses de realização do TF. Os linfócitos e o soro foram separados e analisados.

Protocolo experimental:

Tanto o grupo normotenso quanto o grupo hipertenso foram submetidos a intervenção do seguinte protocolo, dividido em três fases:

- a) Fase de adaptação: foram 3 semanas antes do início do protocolo de 6 meses de treinamento de força, envolvendo 6 sessões nas quais foi dada ênfase no aprendizado da técnica, autoconsciência de intensidade de força corporal de cada uma das participantes e na coordenação de movimento;
- b) Fase básica: fase inicial do protocolo de 6 meses de treinamento de força, foram 17 semanas envolvendo 34 sessões, cujo objetivo foi o aumento da força muscular. Essa fase caracterizou-se pela manutenção do volume de treinamento e aumento da intensidade ao longo da fase;
- c) Fase específica: fase final do protocolo de treinamento de força, foram 10 semanas com 20 sessões, com o objetivo de intensificar o processo de ganho de força e hipertrofia muscular. As sessões de treinamento, nessa fase foram caracterizadas por reduções no volume e aumentos na intensidade do treinamento, com a inclusão do método de cargas progressivas nas sessões.

Durante o protocolo de intervenção foram utilizados os seguintes exercícios: peitoral voador, adutor, puxada alta, abductor, rosca alternada, leg press 45, tríceps polia, elevação lateral, extensão de joelho, flexão de joelho e abdominal. Quando necessário, foram realizadas adaptações no decorrer dos meses de intervenção. Se o sujeito apresentava alguma restrição ou dificuldade em realizar o exercício proposto, era realizada uma adaptação ao movimento, procurando sempre manter o mesmo grupo muscular, assim evitando sair do

protocolo proposto. Exemplo de substituição: exercício na puxada alta, substituído pela remada baixa, ambos exercícios para o músculo dorsal

Avaliação antropométrica

Todos os parâmetros antropométricos foram avaliados de acordo com as recomendações da *International Society for the Advancement of Kinanthropometry* (ISAK) [21].

- a) **Estatura:** a altura total dos sujeitos foi determinada por meio da distância entre a planta dos pés e o vértex da cabeça utilizando estadiômetro portátil (Gofeka®, Criciúma-SC, Brasil) com precisão de 0,1 cm.

- b) **Massa corporal:** o peso corporal foi determinado pela massa corporal total do indivíduo utilizando uma balança digital (Urbano® OS-100, Canoas-RS, Brasil) com precisão de 50 g.

- c) **Avaliação do Índice de Massa Corporal (IMC):** o IMC foi calculado dividindo-se a massa corporal de cada participante pelo quadrado da sua estatura expressa em metros, conforme recomendações da Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (2010) [22].

Percentual de gordura corporal:

Para avaliar o percentual de gordura foi utilizado o bioimpedanciômetro (modelo de composição corporal Tanita® BC-601). As pacientes permaneceram em repouso por 10

minutos e, então, foram acoplados eletrodos nos pés e nas mãos, dos quais foram disparados uma corrente elétrica de baixa frequência para obtenção dos resultados.

Avaliação da pressão arterial:

Para as medidas da pressão arterial foi utilizado um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio (Erkamater® -E300, Alemanha). Os procedimentos foram realizados de acordo com o preconizado na “7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial” [3], sendo realizadas medidas em repouso. Como rotina de monitoramento, realizou-se uma medida de pressão arterial antes de uma sessão de treinamento, pelo menos uma vez por semana, para todos os sujeitos da pesquisa, com monitor de pressão arterial automático (Omron® HEM-742INT, China).

Avaliação da frequência cardíaca:

Cada sujeito permaneceu em repouso antes de iniciar o protocolo de exercícios, sentado por um período de cinco minutos e, após esse tempo, sua frequência cardíaca (FC) foi verificada utilizando-se o mesmo monitor de pressão arterial automático (Omron® HEM-742INT, China).

Coletas sanguíneas:

Foram coletados três tubos de 4 ml de sangue, sendo dois tubos com EDTA como anticoagulante e um sem anticoagulante, por punção venosa da veia antecubital utilizando-se o sistema a vácuo. Todo o procedimento de coleta sanguínea foi realizado por profissionais treinados e habilitados e respeitando todos os procedimentos de biossegurança recomendados para essa finalidade. Após as coletas, todas as amostras foram preparadas, armazenadas

adequadamente e encaminhadas para o laboratório de Bioquímica, Microbiologia e Imunologia da UFFS, campus de Chapecó, para as análises.

Isolamento de células mononucleares:

Os leucócitos mononucleares foram isolados do sangue coletado com EDTA e separados em Ficoll-Histopaque, gradientes de densidade como descrito por Boyum [23].

Determinação dos níveis de marcadores inflamatórios:

A PCR foi avaliada pelo método de imunoturbidimetria, a partir do soro das pacientes do grupo hipertenso e do grupo controle. A análise da IL-6 e da IL-10 foi realizada através do método de eletroquimioluminescência a partir do soro congelado das pacientes de ambos os grupos. Essas dosagens foram realizadas pelo laboratório “Diagnósticos do Brasil” na cidade de Chapecó/SC.

Determinação de proteínas:

A proteína foi determinada pelo método do azul de Coomassie de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina sérica como padrão [24].

Determinação dos níveis de ATP:

A determinação quantitativa do ATP em soro foi desenvolvida utilizando o kit comercial de ensaio de bioluminescência com luciferase de pirilampo recombinante e seu substrato D-luciferin no soro do grupo hipertenso e no grupo controle. O ensaio baseia-se na luciferase do ATP, com emissão máxima ~ 560 nm em pH 7,8 [25]. Foram combinados os componentes da reação, como segue abaixo, para fazer um padrão de solução de reação e ajustar os volumes de acordo com cada requisitos. Cada reação continha 1,25 µg/mL de

luciferase de pirilampo, 50 μ M de D-luciferina e 1mM DTT em tampão de reação 1X. Após 15 minutos de incubação a luminescência foi medida.

Determinação da atividade da adenosina deaminase:

A atividade da ADA dos linfócitos foi determinada de acordo com o protocolo já descrito por Guisti e Galanti [26]. Simplificadamente, 50 μ L de amostra será incubado com adenosina 21 mM (pH 6.5) a 37°C por 60 minutos. Este método é baseado na liberação direta de amônia pela ADA em excesso de substrato. Os resultados serão expressos em unidades por miligrama de proteína (U/ mg de proteína). Uma unidade (1 U) de ADA é definido como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mM de amônia por minuto a partir da adenosina nestas condições de reação.

Determinação da atividade ecto-NTPDase:

Após o isolamento dos linfócitos, a atividade da ecto-NTPDase foi determinada como descrito por Leal et al. [27] onde a atividade da enzima é medida pelo conteúdo de fosfato inorgânico (Pi) liberado, usando-se um ensaio colorimétrico. Simplificadamente, 20 μ L de amostra serão adicionadas ao meio de reação e pré-incubadas por 10 minutos a 37°C. A reação será iniciada pela adição de substrato (ATP ou ADP) a uma concentração final de 2 mM e parada com ácido tricloroacético (TCA) 10%. A reação será resfriada em gelo por 10 minutos para posterior quantificação do conteúdo de Pi liberado Chan et al. [28], utilizando o verde de malaquita como reagente colorimétrico e o KH₂PO₄ como padrão. A atividade enzimática específica será expressa em nanomol de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína (nmol de Pi/min/ mg de proteína).

Western blot da proteína ecto-NTPDase1 e ecto-NTPDase2:

A eletroforese foi realizada com poliacrilamida a 12% num aparelho “Bio-Rad Mini-Protean III”. Os linfócitos do sangue periférico foram lisados em microtubos internos contendo um buffer de extração (50 mmol/L de Tris HCl, 1 mmol/L de EDTA, 1 mmol/L de PMSF, pH 7,5), com pérolas de vidro e em um vortex por um minuto, duas vezes, no gelo. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. As proteínas presentes no sobrenadante, determinadas por ensaio colorimétrico [24], foram diluídas (1:1, v:v) no tampão de amostra Bio-Rad Laemmli (62,5 mmol/L Tris HCl, pH 6,8; Glicerol a 25%, SDS a 2%, azul de bromofenol a 0,01%) e depois carregadas (10 mg) e separadas por tamanho em 15% SDS-PAGE (100 V). O tampão de corrida utilizado continha 25 mmol/L de Tris, 192 mmol/L de glicina e 0,5% de SDS. As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF por 1 h (Bio-Rad) em tampão contendo 25 mmol/L de Tris, 192 mmol/L de glicina e 20% de metanol. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo policlonal antirat ecto-NTPDase1 e antirat ecto-NTPDase2 (anticorpos primários utilizados a uma diluição de 1:400) à temperatura ambiente durante a noite. A quantidade de proteína foi corrigida para carregar uma concentração fixa de proteína (1 mg) em SDS-PAGE a 12%, e foi determinada com base em experimentos usando diferentes concentrações de proteínas. As membranas foram desenvolvidas utilizando o substrato de fosfatase, nitro azul tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3- fosfato de indolilo [29].

Análise estatística:

Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar sua normalidade. Como os dados seguem uma distribuição normal, a diferença entre as médias foi analisada estatisticamente pela análise de variância bidirecional (ANOVA) de duas vias usando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 8.0. As diferenças foram

consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. As variáveis são apresentadas como média e desvio padrão.

RESULTADOS

A média de idade das participantes do grupo normotenso foi de $54,6 \pm 3,6$ anos, enquanto a média da altura foi de $1,65 \pm 0,08$ m. Já no grupo hipertenso, a média de idade das participantes foi de $55,17 \pm 4,3$ anos e a média da altura de $1,64 \pm 0,08$ m. Após os seis meses de TF, observou-se a mudança do IMC do grupo normotenso da faixa de sobrepeso para a faixa de peso normal ($25,2 \pm 4,5$ vs. $24,5 \pm 4,4$). O exercício também foi capaz de promover uma redução significativa nos níveis da PAS no grupo das pacientes hipertensas ($124,1 \pm 0,7$ mmHg no pré-teste vs. $121,1 \pm 0,7$ mmHg após 6 meses, $p < 0,05$) (Tabela 1). Não foram observadas alterações significativas na massa corporal, no percentual de gordura corporal, na FC e na PAD de ambos os grupos, bem como na PAS do grupo normotenso e no IMC do grupo hipertenso, que se encontra na faixa do sobrepeso (Tabela 1).

Na análise do perfil inflamatório (Figura 1), pode-se observar que os níveis plasmáticos de IL-6 (Figura 1A) apresentavam-se significativamente elevados no grupo hipertenso quando comparado ao grupo normotenso no pré-teste ($6,5 \pm 0,7$ pg/mL vs $4,3 \pm 0,3$ pg/mL, $p < 0,05$), os quais permaneceram elevados no grupo hipertenso, porém apresentaram uma tendência a redução após os seis meses de TF ($6,5 \pm 0,7$ pg/mL vs $5,5 \pm 0,5$ pg/mL). Já os níveis plasmáticos de IL-10 (Figura 1B) apresentaram um aumento significativo após os seis meses de TF no grupo normotenso quando comparado ao pré-teste ($7,3 \pm 0,4$ pg/mL vs $6,1 \pm 0,3$ pg/mL, $p < 0,05$) e no grupo hipertenso quando comparado ao pré-teste ($7,1 \pm 0,3$ pg/mL vs $5,5 \pm 0,4$ pg/mL, $p < 0,05$), no mesmo período. Referente a análise da PCR (Figura 1C), pode-se observar que as pacientes hipertensas apresentavam níveis séricos elevados de PCR em comparação com o grupo normotenso no pré-teste ($1,22 \pm 0,1$ mg/L vs $0,63 \pm 0,2$ mg/L, $p < 0,05$). Após a realização do TF, pode-se observar no grupo hipertenso uma redução dos níveis de PCR quando comparado ao período do pré-teste ($0,95 \pm 0,1$ mg/L vs $1,22 \pm 0,1$ mg/L, $p < 0,05$). No grupo normotenso não foram observadas outras alterações.

Com a análise dos níveis séricos de ATP (Figura 1D), pode-se observar que no pré-teste o grupo hipertenso apresenta níveis elevados de ATP em comparação com o grupo normotenso ($0,34 \pm 0,0$ umol/ATP vs. $0,3 \pm 0,0$ umol/ATP, $p < 0,05$). No grupo hipertenso, após os seis meses de TF pode-se observar a redução dos níveis séricos do ATP quando comparado ao pré-teste ($0,29 \pm 0,0$ umol/ATP vs $0,34 \pm 0,0$ umol/ATP, $p < 0,05$). Não foram observadas alterações no grupo normotenso.

Quanto a hidrólise do ATP (Figura 2A), percebe-se que no pré-teste o grupo hipertenso apresenta um aumento da hidrólise quando comparado ao grupo normotenso ($8,48 \pm 0,7$ nmol Pi/min/mg ptn vs. $6,28 \pm 0,3$ nmol Pi/min/mg ptn, $p < 0,05$). Após os seis meses de TF pode-se observar no grupo hipertenso a redução da hidrólise do ATP quando comparada ao pré-teste ($6,76 \pm 0,5$ nmol Pi/min/mg ptn vs $8,48 \pm 0,7$ nmol Pi/min/mg ptn, $p < 0,05$). Não foram observadas alterações significativas no grupo normotenso.

Conforme a hidrólise do ADP (Figura 2B), pode-se observar que o grupo hipertenso apresenta no pré-teste aumento dos níveis de hidrólise do ADP em comparação ao grupo normotenso no mesmo período ($4,35 \pm 0,3$ nmol Pi/min/mg ptn vs. $3,24 \pm 0,4$ nmol Pi/min/mg ptn, $p < 0,05$). No entanto, no grupo hipertenso, após seis meses de TF observou-se a redução da hidrólise do ADP quando comparado ao pré-teste ($3,26 \pm 0,3$ nmol Pi/min/mg ptn vs. $4,35 \pm 0,3$ nmol Pi/min/mg ptn, $p < 0,05$). Não foram observadas alterações significativas no grupo normotenso.

Referente a atividade da ADA (Figura 2C), observa-se que o grupo hipertenso apresenta atividade aumentada da enzima em relação ao grupo normotenso no pré-teste ($4,69 \pm 0,3$ U/L vs $2,68 \pm 0,3$ U/L, $p < 0,05$). No entanto, após seis meses de TF observou-se no grupo hipertenso a redução da atividade da ADA quando comparado ao pré-teste ($4,69 \pm 0,3$ U/L vs $3,65 \pm 0,3$ U/L, $p < 0,05$). A expressão das enzimas NTPDase1 (Figura 3A) e NTPDase2

(Figura 3B) analisadas por meio de *Western blot* não apresentou alterações significativas no período estudado.

DISCUSSÃO

A HAS é uma doença crônica acompanhada de um quadro inflamatório, com infiltração vascular de células imunes. Este cenário provoca alterações vasculares, que participam ativamente dos mecanismos de elevação da pressão arterial [7]. Em contrapartida, a atividade física apresenta resultados positivos tanto no controle dos níveis pressóricos, quanto na redução do risco cardiovascular, devido, principalmente, ao seu efeito anti-inflamatório [4, 7].

Muitos estudos já analisaram os efeitos da atividade física aeróbica sobre o SP e a HAS em modelos animais [4,30,31,32,33]. Este estudo, entretanto, é o primeiro realizado em humanos a estudar a relação do TF sobre a sinalização purinérgica e parâmetros inflamatório em mulheres hipertensas.

Já é bem estabelecido que o exercício físico atua como coadjuvante no tratamento da HAS [4] e nossos resultados demonstraram uma redução nos níveis pressóricos sistólicos após 6 meses de TF, corroborando com a literatura atual sobre o efeito hipotensor do exercício de força [4,30]. Observou-se, também, uma tendência a redução no percentual de gordura, na massa corporal e no IMC das pacientes hipertensas após o TF, fato importante, pois a adiposidade é um grande fator de risco para o desenvolvimento de complicações relacionadas a HAS [10, 34].

Quanto aos parâmetros inflamatórios, antes do TF, observou-se que o grupo de hipertensas apresentou níveis aumentados de IL-6, PCR e ATP extracelular. Essas alterações são bastante características do quadro pró-inflamatório observado na HAS e essas variáveis estão interrelacionadas, pois respondendo à liberação de IL-6, o fígado inicia a produção da PCR [10]. Nos vasos sanguíneos, a PCR promove ativação de células imunológicas, além de promover a expressão de moléculas de adesão e liberar sinais para a redução da produção de vasodilatadores, sendo peça importante no processo de remodelamento vascular [35,36].

Além disso, o aumento da IL-6 pode ter ocorrido em consequência dos níveis aumentados de ATP extracelular, pois o ATP, ao se ligar em receptores purinérgicos nos linfócitos desencadeia sinalização para maior produção de citocinas pró-inflamatórias [4, 8].

Corroborando com o processo inflamatório verificado nas hipertensas, nosso estudo demonstrou níveis reduzidos de IL-10 no pré-teste. Um estudo de Mattson (2019) em modelos animais hipertensos, publicado na Revista Nature, demonstrou a redução de linfócitos T reguladores, responsáveis por modular a resposta inflamatória, no grupo, diminuindo a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, fato também observado em nosso estudo. Esse desequilíbrio estabelece um feedback inflamatório que estimula um ciclo de inflamação crônica e agravamento da doença [10,37].

Além das diferenças nos parâmetros inflamatórios, nosso estudo também evidenciou alterações na atividade das ecto-NTPDases. No pré-teste do grupo hipertenso, a atividade das ecto-NTPDases hidrolisando ATP a ADP estava elevada assim como a atividade da ADA, resultando em pouca adenosina disponível no meio. Este fato explica os níveis baixos de IL-10, pois a adenosina estimula a liberação de IL-10 pelos linfócitos T, atuando como uma molécula anti-inflamatória [8,12].

Após a realização do protocolo de TF, foram observadas alterações significativas no perfil inflamatório e no comportamento das ecto-NTPDases. O grupo hipertenso apresentou aumento da concentração plasmática de IL-10, além de uma tendência a diminuição dos níveis de IL-6 e a redução nas concentrações plasmáticas da PCR e do ATP. Com essas alterações, o exercício foi capaz de reduzir a inflamação observada na HAS. A redução dos estímulos inflamatórios da IL-6, contribui para a diminuição da produção hepática da PCR [10] e com a redução da liberação do ATP para o meio extracelular pelas células endoteliais, reduz-se a ativação dos receptores purinérgicos ativados pelo ATP e suas respostas inflamatórias durante a HAS [10,30].

As ecto-NTPDases também responderam ao TF. Respondendo à diminuição dos níveis séricos de ATP, houve a redução da atividade da ecto-NTPDase1 e da ADA, no grupo hipertenso após o TF. Como consequência, observa-se a redução da hidrólise do ATP, do ADP e da adenosina [4,38], atenuando as respostas mediadas pelo receptor P2 e amplificando as respostas anti-inflamatórias mediadas por adenosina nos receptores P1 [38,39]. A adenosina liga-se a receptores presentes na membrana celular dos linfócitos inibindo sua ativação e proliferação, além de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e estimular a produção de IL-10 pelos linfócitos T reguladores [37,39]. As ecto-NTPDases têm a capacidade de atenuar a inflamação, aumentando a concentração de adenosina no compartimento extracelular e consequentemente diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 [38].

Em conclusão, o efeito do TF sobre as enzimas ectonucleotidases do sistema purinérgico pode ser um dos mecanismos mais importantes revelados neste estudo em relação aos benefícios do exercício para o tratamento da HAS. Essa modulação enzimática promovida pelo TF regula os níveis de nucleotídeos e nucleosídeo no ambiente extracelular também regulando a função das células imunológicas. Dessa forma, o TF promove um ambiente anti-inflamatório ao aumentar a disponibilidade de adenosina e diminuir a inflamação, além de reduzir os níveis pressóricos e melhorar o perfil antropométrico. Este mecanismo demonstra ser uma importante ferramenta terapêutica a ser explorada para o manejo da HAS e para outras doenças que causam inflamação crônica no organismo.

AGRADECIMENTOS

O apoio para este estudo foi fornecido pela CAPES e pelo CNPq.

CONFLITOS DE INTERESSE

Este é um trabalho acadêmico e não possui conflito de interesses

REFERÊNCIAS

- [1] Sunggip C, Nishimura A, Shimoda K, Numaga -Tomita T, Tsuda M, Nishida M. Purinergic P2Y6 receptors: A new therapeutic target of age-dependent hypertension, *Pharmacological Research* 2017; 120: 51-59.
- [2] World Health Organization. Noncommunicable diseases country profiles 2018. Geneva: 2018. Disponível em: <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>. Acesso em: 28/07/2019.
- [3] Malachias MVB, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107:1-83.
- [4] Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, Zanini D, Schmatz R et al. Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from Nomega-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats. *J Hypertens* 2015; 33:763–772.
- [5] Chen Z, He L, Li L, Chen L. The P2X7 purinergic receptor: an emerging therapeutic target in cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta* 2018; 479: 196-207.
- [6] Bagatini MD, Cardoso AM, Reschke CR, Carvalho FV. Immune system and chronic diseases. *J Immunol Res* 2018.
- [7] Elkhatab SK, Case AJ. Autonomic Regulation of T-lymphocytes: Implications in Cardiovascular Disease. *Pharmacological Research* 2019; 104293.
- [8] Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó, G. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Pharmacological reviews* 2019; 71: 345-382.
- [9] Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, et al. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Hypertension* 2010; 57:132–140.

- [10] Antunes BMM, Cayres SU, Lira FS, Fernandes RA. Arterial thickness and Immunometabolism: the mediating role of chronic exercise. *Curr Cardiol Rev* 2016; 12: 47-51.
- [11] Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. *Keio J Med* 2013; 62; 63-73.
- [12] Miron VV, Baldissarelli J, Pranke G, Mânica A, Bonadiman BSR, Manfredi LH, et al. High-intensity intermittent exercise increases adenosine hydrolysis in platelets and lymphocytes and promotes platelet aggregation in futsal athletes. *Platelets* 2018; 30: 878-885.
- [13] Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nature Rev Immunol* 2011; 11:201–212.
- [14] Di Virgilio F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signal* 2005; 1:205–209.
- [15] Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med* 2010; 207:1807–1817.
- [16] De Faria APC, Ritter AMV, Gasparetti CS, Corrêa NB, Brunelli V, Almeida A et al. Proposta de um Escore Inflamatório de Citocinas e Adipocinas Plasmáticas Associado à Hipertensão Resistente, mas Dependente de Parâmetros de Obesidade. *Arq Bras Cardiol* 2019; 112: 383-389.
- [17] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783:673–694.
- [18] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365:217–223

- [19] Weber MA, Schiffrin EL, White WB, Mann S, Lindholm LH, Kenerson JG, et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community. *J. Clin. Hypertens* 2014; 16:14–26.
- [20] Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Rev Immunol* 2011; 11:607–615.
- [21] Marfell-Jones M, Olds T. Kinanthropometry X: Proceedings of the 10th International Society for the Advancement of Kinanthropometry Conference, Held in Conjunction with the 13th Commonwealth International Sport Conference. *Routledge* 2007.
- [22] Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. AC Farmacêutica: 2010. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes_brasileiras_obesidade_2009_2010_1.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2017.
- [23] 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.
- [24] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
- [25] Karamoahmed S, Guidotti G. Bioluminometric method for real-time detection of ATPase activity. *Biotechniques* 2001; 31:420-5.
- [26] Giusti G, Galanti B. Methods of enzymatic analysis. *Weinheim: VerlagChemie* 1984; 3:314–323.
- [27] Leal DB, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CA, Da Silva JE, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C 3. 6. 1. 5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721:9–11.

- [28] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375–378.
- [29] Souza Vdo C, Schlemmer KB, Noal CB, Jaques JA, Zimmermann CE, Leal CA, et al. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. *Parasitol Int* 2012; 61:690–696.
- [30] 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. *Molecular and cellular biochemistry* 2012; 371:147-156.
- [31] Cardoso AM, Martins CC, Fiorin Fda S, Schmatz R, Abdalla FH, Gutierrez J, et al. Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. *Cell Biochem Funct* 2013; 31:136–151.
- [32] Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, Fiorin Fda S, Baldissarelli J, et al. Swimming training prevents alterations in acetyl-cholinesterase and butyrylcholinesterase activities in hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2014; 27:522–529.
- [33] Fürstenau CR, Trentin Dda S, Gossenheimer AN, Ramos DB, Casali EA, Barreto-Chaves ML, et al. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:223–229.
- [34] Miazgowski T, Taszarek A, Miazgowski B. Visceral fat, cardiometabolic risk factors, and nocturnal blood pressure fall in young adults with primary hypertension. *J Clin Hyperten* 2019; 21:1406-1414.
- [35] Van Gaal LF; Mertens IL, Chistophe E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444: 875.
- [36] HAGE, F. G. C-reactive protein and hypertension. *J Hum Hypertens* 2014; 28: 410.
- [37] Mattson DL. Immune mechanisms of salt-sensitive hypertension and renal end-organ damage. *Nat Rev Nephro* 2019; 5:290-300.

[38] Ferrari D, McNamee EN, Idzko M, Gambari R, Eltzschig HK. Purinergic signaling during immune cell trafficking. *Trends immunol* 2016; 37:399-411.

[39] Burnstock G, Boeynaems JM. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal* 2014; 10:529-564.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Idade, parâmetros antropométricos e hemodinâmicos do grupo normotenso e hipertenso durante o pré-teste e após seis meses de treinamento de força.

	NOR (pré-teste)	HIP (pré-teste)	NOR (seis meses)	HIP (seis meses)
Idade (anos)	54.64±3.6	55.17±4.3		
Altura (m)	1.65±0.0	1.64±0.0		
Massa corporal (kg)	60.61±0.6	60.21±0.5	60.45±0.5	59.76±0.4
IMC	25.22±4,5	29.85±4.9	24.59±4,4	27.97±4.7
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	118.9±0.7	124.1±0.7*#	115.4±0.6	121.1±0.7*#
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	78.6±0.6	82.7±0.6	76.9±0.8	82.2±0.6
Porcentagem de gordura corporal	32.3± 9.7	36.2± 10.1	31.6± 8.2	34.8± 7.7
Frequência cardíaca	75.67 ± 9.7	79.50 ± 10.5	69.13 ± 5.1	74.56 ± 7.8

Tabela 1: valores de idade, altura, massa corporal, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, percentual de gordura e frequência cardíaca avaliados no grupo normotenso e no grupo hipertenso em dois momentos: pré-teste e após 6 meses de treinamento de força. Dados apresentados como média e desvio padrão. ANOVA de duas vias, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística entre os dois grupos no mesmo momento. # indica diferença estatística no mesmo grupo nos momento pré-teste e 6 meses.

Parâmetros Inflamatórios

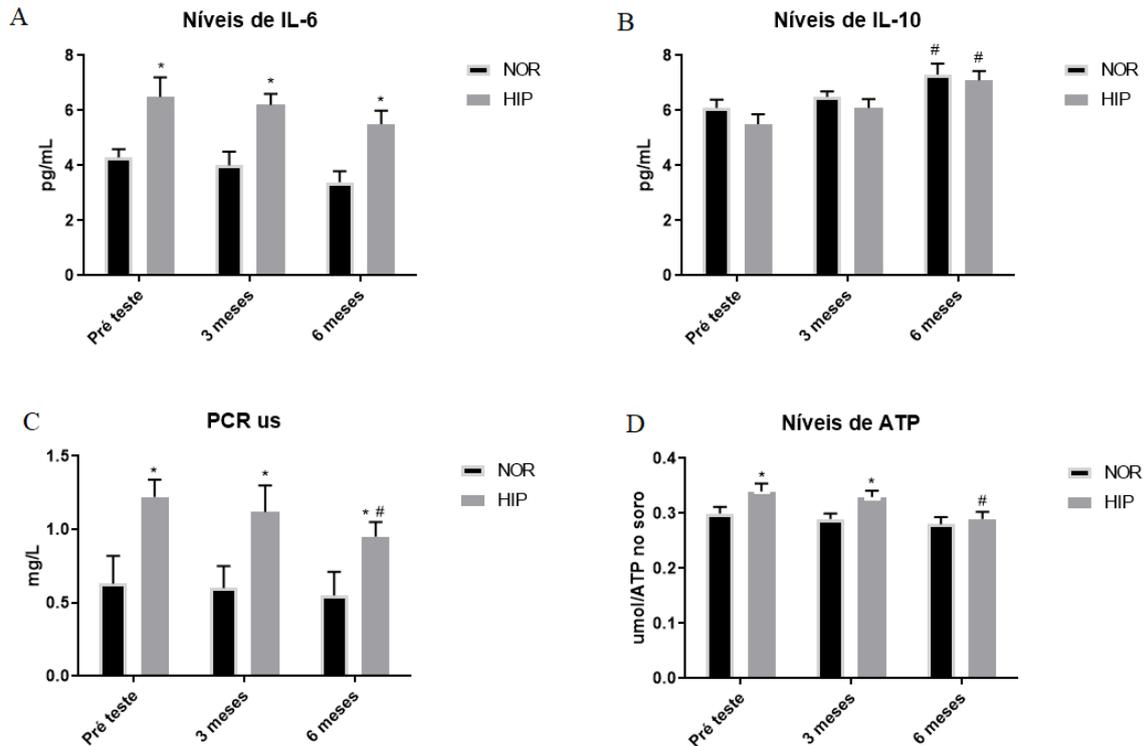


Figura 1: Parâmetros Inflamatórios. **A:** níveis plasmáticos de IL-6 avaliados no pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força no grupo normotenso e no grupo hipertenso. **B:** níveis plasmáticos de IL-10 avaliados no pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força no grupo normotenso e no grupo hipertenso. **C:** níveis plasmáticos da proteína C reativa avaliados no pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força no grupo normotenso e no grupo hipertenso. **D:** níveis plasmáticos de ATP avaliados no pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força nos grupos hipertenso e normotenso. Dados apresentados como média e desvio padrão. ANOVA de duas vias, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística entre os dois grupos no mesmo momento. # indica diferença estatística no mesmo grupo nos momento pré-teste e 6 meses.

Atividade das Ectonucleotidasas

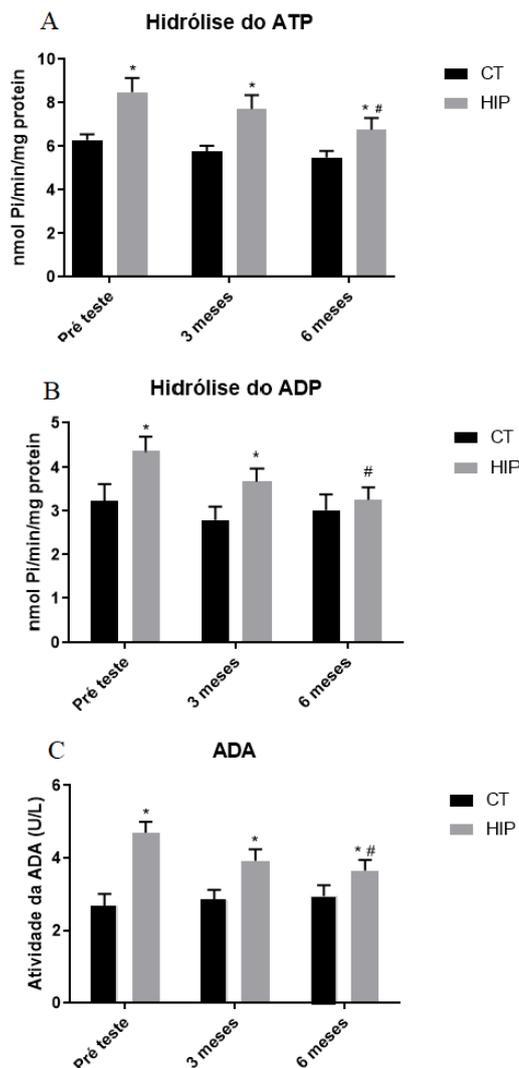


Figura 2: Atividade das ectonucleotidasas. **A:** hidrólise do ATP avaliada no pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força no grupo normotenso e no grupo hipertenso. **B:** hidrólise do ADP avaliada no pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força no grupo normotenso e no grupo hipertenso. **C:** atividade da ADA avaliada no pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força nos grupos normotenso hipertenso. Dados apresentados como média e desvio padrão. ANOVA de duas vias, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística entre os dois grupos no mesmo momento. # indica diferença estatística no mesmo grupo nos momento pré-teste e 6 meses.

Expressão das ecto-NTPDases

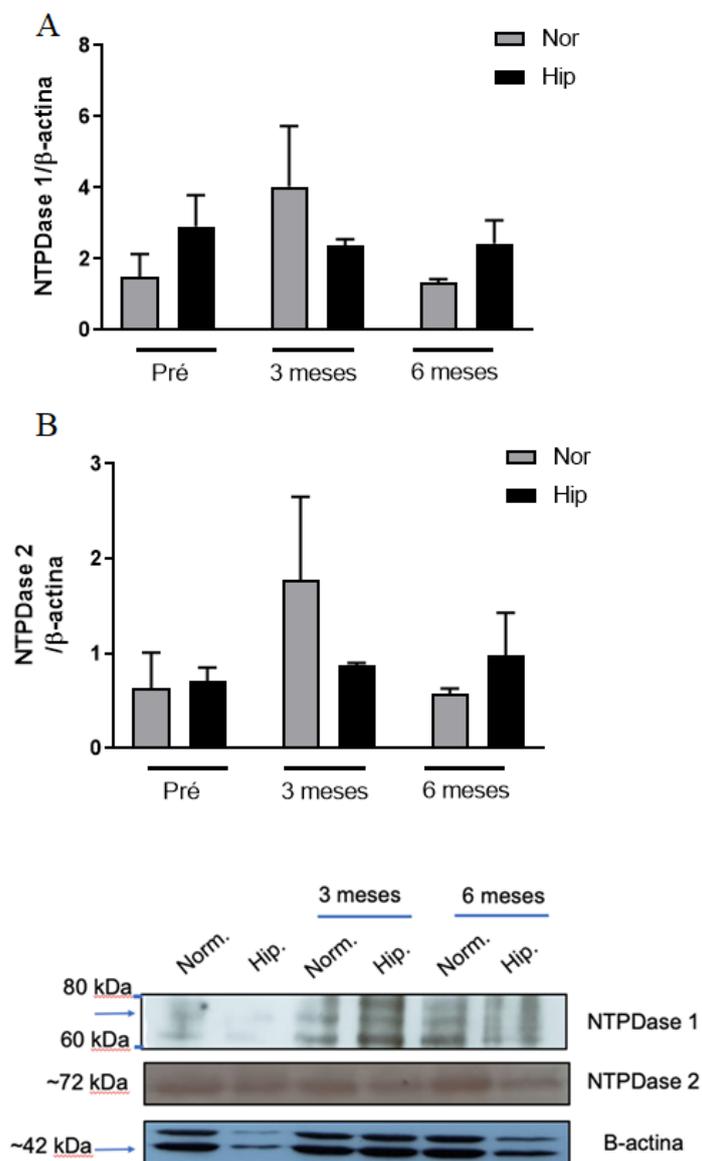


Figura 3: Expressão das enzimas ecto-NTPDase 1 (3A) e ecto-NTPDase 2 (3B) avaliada: pré-teste, após 3 meses e após 6 meses de treinamento de força nos grupos normotenso e hipertenso. Dados apresentados como média e desvio padrão. ANOVA de duas vias, considerando $p < 0,05$.