

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
CURSO DE MEDICINA**

**MATHEUS RIBEIRO BIZUTI
EDUARDO DE CAMARGO SCHWEDE**

**EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO ESTRESSE
OXIDATIVO E NO SISTEMA PURINÉRGICO**

**CHAPECÓ
2021**

MATHEUS RIBEIRO BIZUTI
EDUARDO DE CAMARGO SCHWEDE

**EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO ESTRESSE
OXIDATIVO E NO SISTEMA PURINÉRGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do grau de Médico.

Orientadora: Prof. Dra. Débora Tavares de Resende e Silva

CHAPECÓ

2021

MATHEUS RIBEIRO BIZUTI
EDUARDO DE CAMARGO SCHWEDE

**EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO ESTRESSE
OXIDATIVO E NO SISTEMA PURINÉRGICO**

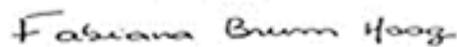
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do grau de Médico.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 04/09/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Débora Tavares de Resende e Silva – UFFS
Orientadora



Prof.^a Dr.^a Fabiana Brum Haag – UFFS
Avaliadora



Prof.^a Dr.^a Renata Calciolari Rossi – UNOESTE
Avaliadora

Efeito agudo e crônico do exercício físico no estresse oxidativo e no sistema purinérgico

Matheus Ribeiro Bizuti¹. Eduardo de Camargo Schwede². Fabiana Brum Haag³. Filomena Marafon⁴. Beatriz da Silva Rosa Bonadiman⁵. Margarete Dulce Bagatini⁶. Débora Tavares de Resende e Silva⁷

1. Departamento de Medicina. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: matheus_ribeiro.bizuti@hotmail.com. ID ORCID: 0000-0001-6679-0875.

2. Departamento de Medicina. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: eduardoschwede1@gmail.com. ID ORCID: 0000-0003-2276-416X.

3. Departamento de Enfermagem. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: fabiana.haag@uffs.edu.br. ID ORCID: 0000-0002-1358-766X.

4. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: filomena.marafon@uffs.edu.br. ID ORCID: 0000-0001-9167-0146.

5. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: beadasilvarosa@gmail.com. ID ORCID: 0000-0002-1968-0320.

6. Departamento de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: margarete.bagatini@uffs.edu.br. ID ORCID: 0000-0001-9263-4980.

7. Departamento de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: debora.silva@uffs.edu.br. ID ORCID: 0000-0002-3813-7139.

Autor Correspondente:

Débora Tavares de Resende e Silva. Departamento de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, Santa Catarina-SC, Brasil. E-mail: debora.silva@uffs.edu.br. ID ORCID: 0000-0002-3813-7139.

Resumo

Hábitos de vida sedentários estão diretamente relacionados ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, de modo a proporcionar um estado crônico de estresse oxidativo. Além disso, o sistema purinérgico está envolvido na sinalização extracelular e, desse modo, influencia processos patológicos e fisiológicos. Desse modo, o exercício físico é responsável por desencadear alterações moleculares e teciduais, de forma a condicionar processos fisiopatológicos do organismo, sendo sugerido, muitas vezes, como forma de tratamento não farmacológico em distintos acometimentos de saúde. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do exercício físico sobre os marcadores do estresse oxidativo e do sistema purinérgico em adultos jovens. Nossos achados mostraram que o exercício físico foi responsável por aumentar a hidrólise de ADP e ADA em plaquetas, indicando um aumento na ecto-NTPDase após oito semanas de exercício físico. Ademais, houve um aumento na concentração de TBARS e PSH após uma semana de exercícios. Dessa forma, pode-se considerar que o exercício físico resistido pode estimular os mecanismos de defesa antioxidantes bem como promover um estado anti-inflamatório e antiagregante plaquetário. Em conclusão, o exercício físico altera tanto os mecanismos do estresse oxidativo quanto do sistema purinérgico, de forma a apresentar um potencial de atenuar os mecanismos inflamatórios.

Palavras-chave Exercício Físico; Purinérgicos; Estresse Oxidativo; Inflamação.

Introdução

A vida hodierna proporcionou a população hábitos como o sedentarismo, a ingestão de alimentos industrializados e a exposição ao estresse de forma constante. A vida sedentária carrega em sua bagagem a maior possibilidade de aquisição de doenças crônicas, dentre as quais: hipertensão, obesidade, diabetes tipo 2, cardiopatias, síndrome metabólica e uma maior taxa de mortalidade precoce [1]. Desse modo, a prática regular de exercício físico está associada a melhorias nessas condições crônicas adquiridas mediante o sedentarismo, auxiliando, assim, na prevenção e no tratamento dessas comorbidades [2].

A prática de exercício físico possibilita alterações bioquímicas e fisiológicas benéficas ao organismo humano. Estas atividades podem ser subdivididas em aeróbicas e anaeróbicas. Os exercícios físicos aeróbicos são caracterizados por atividades de longa duração e baixa intensidade. Já os anaeróbicos, caracterizam-se por atividades de curta duração e alta intensidade [3].

Durante a prática do exercício físico, ocorrem contrações musculares que alteram o funcionamento do organismo, a saber: mudanças na contratilidade e na tensão muscular, maior produção de adenosina trifosfato (ATP), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e maior influxo de cálcio intracelular. Essas mudanças ativam cascatas de sinalização celular de modo a regular alterações sistêmicas produzidas pelo exercício [3].

Além das alterações já citadas, a prática regular de exercício físico auxilia na regulação do sistema imunitário, uma vez que promove aumento de citocinas anti-inflamatórias [4]. A atividade regular por oito semanas melhora a razão interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), de forma a aumentar os níveis de IL-10 e diminuir os níveis de TNF- α [5].

O sistema purinérgico, assim como demais sistemas bioquímicos, também sofre alterações provenientes do exercício. Durante o processo de contração muscular, ocorre a liberação de ATP devido a deformação mecânica dos músculos. Do mesmo modo, ocorre a liberação de ATP como cotransmissor em conjunto com a norepinefrina de terminações nervosas do sistema nervoso simpático para o ambiente extracelular, os quais atuam mediante receptores purinérgicos P2 [6].

O ATP liberado para o meio extracelular durante o exercício físico pode ser gradualmente hidrolisado a adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) mediante ação das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (ecto-NTPDases). O AMP formado pode ser convertido por ação da ecto-5'nucleotidase em adenosina (ADO), a qual pode ser hidrolisada pela adenosina desaminase (ADA) e formar inosina. Todas essas enzimas encontram-se na membrana celular das células do sistema imunitário. Dessa forma, a ação das ecto-NTPDases e da ADA é essencial para o restabelecimento do equilíbrio pró e anti-inflamatório proporcionado pelo ATP celular liberado. Em linfócitos, o ATP é responsável por promover a ativação de um estado pró-inflamatório, ao passo que a ADO promove um ambiente anti-inflamatório. Já em plaquetas, o ADP é o agente pró-agregante e a ADO, anti-agregante [7].

O ATP é uma molécula responsável por fornecer energia para os mais variados processos do metabolismo celular. Além disso, o ATP, existente em todas as células, é uma

molécula sinalizadora do sistema purinérgico, o qual atua como regulador dos mecanismos fisiopatológicos no ambiente extracelular [8]. O sistema purinérgico está envolvido em diversos processos no organismo humano, a saber: secreção endócrina e exócrina, processo inflamatório, mecanismo de dor, agregação plaquetária, resposta imune e diferenciação celular [9]. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito do exercício físico de moderada intensidade nos marcadores do estresse oxidativo e do sistema purinérgico em adultos jovens.

Materiais e métodos

Delineamento e população do estudo

O modelo de estudo utilizado é não randomizado, do tipo antes e depois, o que possibilitou a comparação de dados antes e após uma intervenção ser instituída. A amostra incluiu universitários matriculados nos cursos da área da saúde da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) Campus Chapecó/SC, Brasil. Incluindo 16 participantes para um α de 0,05 e β 0,20, com amostragem por conveniência e idades entre 20 e 40 anos, no período de maio de 2018 a março de 2020, que aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e que se encaixaram nos critérios de elegibilidade.

Crítérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram tempo mínimo de doze meses matriculados em cursos da área da saúde e idade entre 20 e 40 anos (adulto jovem). Os critérios de exclusão foram: classificação de estresse psicológico conforme o inventário de sintomas de estresse de Lipp (em que, de acordo com a escala, foram excluídos os estudantes que não atingiram pontuação suficiente para o limiar de estresse), classificação abaixo da média de acordo com a escala de estresse percebido e estudantes que praticam atividade física regularmente.

Intervenções

As intervenções ocorreram depois de identificados na população alvo do estudo, os universitários estressados por meio da Escala de Estresse percebido e pelo Inventário de Sintomas de Estresse de Lipp. Posteriormente, estes estudantes foram organizados em um

único grupo, tendo como intervenção, o plano de exercício físico. O controle foi o próprio grupo. A intervenção foi composta por exercícios aeróbicos (caminhada de 20 minutos) e exercícios resistidos (20 minutos), aquecimento inicial (5 minutos) e alongamento (5 minutos), distribuídos ao longo de oito semanas (três vezes por semana) de prática de exercício físico de 50 minutos cada aula, perfazendo 21 sessões de treinamento (totalizando 20 horas), sendo as três primeiras para anamnese e adaptação ao ambiente e ao gesto motor dos exercícios propostos. O programa de treinamento seguiu recomendações do American College of Sports Medicine, que indica pelo menos 150 minutos por semana de exercícios de moderada intensidade. Os exercícios do programa de treinamento físico foram escolhidos de forma a englobar os principais grupos musculares, sendo realizados de forma alternada, três séries para cada exercício, de 12 a 15 repetições em cada série, sendo a intensidade controlada pela escala Borg. A sequência do programa foi composta pelos seguintes exercícios: caminhada de 20 minutos, exercício resistido para membros inferiores: extensão de joelho, flexão de quadril, panturrilha e agachamento, e, para membros superiores: bíceps, tríceps e peitoral. Este protocolo de exercício físico foi realizado por um profissional fisioterapeuta colaborador deste estudo. As atividades foram realizadas em forma de circuito.

Coleta de amostras de sangue

Foram coletadas amostras de 10 ml de sangue, de jejum, às oito horas da manhã através de punção venosa periférica, dentro do laboratório de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da UFFS Campus Chapecó/SC, realizada pelos pesquisadores devidamente capacitados para este fim.

Para análise do sistema purinérgico e do estresse oxidativo, fez-se a coleta de quatro amostras de sangue. Duas coletas de tubos contendo EDTA (plasma e linfócitos-PBMC); uma coleta em tubo com citrato de sódio (plaquetas); e uma coleta em tubo contendo soro (para análises complementares).

Protocolo de separação de soro, plasma e sangue total com citrato

O tubo contendo gel separador passou por processo de centrifugação através de uma centrífuga modelo Sigma 3-16L mediante 3.500 rpm durante 15 minutos. Logo após, o soro obtido foi separado em dois frascos: um quantitativo foi colocado em tubo de ensaio para

realização das análises bioquímicas e o restante do soro obtido foi armazenado em um criotubo no Ultrafreezer Indrel IULT 335D-486 à -80°C para efetuar as análises do perfil oxidativo.

A partir do conteúdo de um dos tubos contendo EDTA, foi realizada a centrifugação da amostra mediante 3.500 rpm durante 15 minutos, e o conteúdo sobrenadante compondo o plasma foi armazenado em um criotubo no ultrafreezer à -80°C para posterior realização das análises. Um dos tubos contendo amostra e anticoagulante citrato de sódio foi homogeneizado por inversão e, a partir do sangue total deste frasco, separou-se um volume de 500 µL em um criotubo e armazenou-se nas condições acima descritas.

Protocolo de separação dos linfócitos

Para a separação da camada de linfócitos, aplicou-se a metodologia de Böyum [10]. Efetuou-se a colocação de 4 mL de sangue total com EDTA em um tubo falcon, onde também se acrescentou 4 mL de solução fisiológica 0,9% (salina); o tubo foi fechado e então homogeneizado levemente. Em outro tubo, colocou-se 3 mL do reagente Ficoll® e, a este, acrescentou-se levemente pelas bordas a amostra diluída em solução fisiológica, então, o tubo foi centrifugado mediante 1.800 rpm durante 30 minutos. Após a centrifugação, verificou-se a formação de um gradiente contendo uma camada de células mononucleares (“nuvem”) entre as camadas do reagente e do plasma. Realizou-se a transferência desta “nuvem” de células para um tubo falcon vazio, onde em seguida foi acrescentado 10 mL de solução fisiológica; o tubo foi tampado e centrifugado a 1.500 rpm durante 15 minutos. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado por inversão e, ao precipitado, foi acrescentado 5 mL de salina e então efetuou-se centrifugação a 1.200 rpm durante 10 minutos. Novamente, descartou-se o sobrenadante por inversão e acrescentou-se 1 mL de solução fisiológica ao precipitado, seguindo com a realização de centrifugação a 1.000 rpm durante 05 minutos. Após a última centrifugação, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 175 µL de salina, armazenando a amostra no ultrafreezer à -80°C para efetuar os protocolos analíticos.

Protocolo de separação das plaquetas

Para separação de plaquetas, empregou-se a metodologia de Pilla et al. [11] modificada por Lunkes et al. [12]. Com o restante da amostra contendo sangue total em anticoagulante citrato de sódio, efetuou-se centrifugação dos tubos mediante 1.200 rpm durante 10 minutos. Após remover da centrífuga, transferiu-se o sobrenadante em um tubo de ensaio, o qual foi

centrifugado a 5.000 rpm por 30 minutos. Retirou-se os tubos da centrífuga e descartou-se o sobrenadante; ao precipitado foi acrescentado 2 ml do tampão HEPES 3,5 mM a pH 7,2, homogeneizando até a completa dissolução. Esse homogeneizado foi centrifugado por mais 10 minutos a 5.000 rpm. Após o último procedimento de centrifugação, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 µl do tampão HEPES às plaquetas, armazenando a amostra no ultrafreezer à -80°C.

Avaliação do perfil oxidativo

O perfil oxidativo dos indivíduos em estudo foi avaliado pela determinação de indicadores de estresse oxidativo, sendo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a mieloperoxidase (MPO). As leituras espectrofotométricas foram efetuadas em espectrofotômetro de microplacas Multiskan™ GO, da Thermo Fischer Scientific.

A metodologia adotada para avaliação de TBARS seguiu o protocolo de Jentzsch et al. [13], com leitura a 532 nm. Essa técnica tem como objetivo medir a formação de malondialdeído (MDA), que compreende uma substância gerada pela reação das EROS com os lipídios de membrana, fenômeno este denominado lipoperoxidação (LPO). A LPO ocasiona alterações na membrana que compreendem desde transtornos de permeabilidade a até perda de seletividade e comprometimento dos componentes da matriz extracelular. O MDA, quando aquecido em presença do TBA, origina um composto de coloração rosa, o qual foi medido espectrofotometricamente [13, 14]. As amostras de plasma foram avaliadas em quadruplicata; pipetou-se nos tubos, sequencialmente, 50 µL de água destilada, 5 µL de diterc-butil metil fenol (BHT) 10 mM, 295 µL de ácido ortofosfórico 1%, 25 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 50 µL da amostra e 50 µL de TBA. A curva padrão foi efetuada com solução de MDA 0,03 mM. Após preparo das amostras, estas foram colocadas em banho-maria a 95°C durante 60 minutos e então foi procedida a leitura das absorbâncias. Os resultados foram calculados pela multiplicação das médias das absorbâncias com o fator de correção, divididas pelo volume de amostra e expressos em nmol MDA/mL.

Para determinação dos tióis proteicos (PSH) e não protéicos (NPSH), empregou-se a metodologia de Ellman [15]. Os tióis reagem com o 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) gerando um composto de coloração amarela, com leitura a 412 nm. Esses compostos são componentes do sistema de defesa não enzimático. As amostras de plasma foram analisadas em duplicata. Para a determinação do PSH, pipetou-se 30 µL da amostra, 260 µL de solução tampão de fosfato de potássio monobásico e dibásico (TKF) 10% e 15 µL de DTNB. Para

dosagem do NPSH, a amostra foi desproteïnizada com 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugada a 2.000 rpm durante 10 minutos e, a partir do sobrenadante, efetuou-se as análises com 40 µL da amostra, 200 µL de TKF 10% e 20 µL de DTNB. Procedeu-se o cálculo do fator de correção (FC) de cisteína, o qual foi multiplicado pela média das absorvâncias, dividido pelo volume da amostra, tendo os resultados expressos em µmol/mL de plasma.

A análise da MPO foi efetuada através do método descrito por Suzuki et al. [16], com leitura a 492 nm. A MPO é uma heme enzima sintetizada por mediadores inflamatórios e liberada dos leucócitos (linfócitos e neutrófilos) em locais lesionados. A MPO gera quantidades substanciais de ácido hipocloroso (HOCl) a partir da reação de catálise de íons de cloreto com peróxido de hidrogênio. O HOCl consiste em uma ERO com elevada capacidade reativa para formação de oxigênio singlete e do radical hidroxil. Esta técnica analítica foi efetuada na presença de H₂O₂ como agente oxidante, sendo que a MPO catalisou o acoplamento oxidativo de fenol e da aminoantipirina (AAP), dando origem a um produto colorido, a quinoneimina, com uma absorvância lida em espectrofotômetro. As amostras de plasma foram analisadas em duplicata. Pipetou-se 12 µL da amostra, 148 µL de AAP 2,5 mM e 170 µL de H₂O₂ 1,7 mM, e incubou-se as placas à 37°C por 30 minutos, procedendo a leitura logo após a incubação. Efetuou-se o cálculo, multiplicando a média das absorvâncias pelo FC, e os resultados foram expressos em mM de quinoneimina produzido em 30 minutos.

Avaliação do sistema purinérgico

Para avaliação do sistema de sinalização purinérgico foram utilizadas amostras de linfócitos e plaquetas dos indivíduos em estudo. Para mensuração da hidrólise do ATP em ADP e AMP e avaliação da atividade das ectoenzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, foi mensurada a quantidade de fosfato inorgânico liberado por meio de ensaio colorimétrico, com leitura em espectrofotômetro a 630 nm, utilizando o método de Pilla et al.[11] adaptado por Lunkes et al. [12]; e a atividade da ADA foi estabelecida através da quantidade de amônia liberada pela ação da enzima sob leitura em espectrofotômetro a 620 nm, segundo o método descrito por Giusti e Galanti [17], conforme procedimentos analíticos padronizados no laboratório. Os reagentes utilizados incluem os substratos do sal dissódico de adenosina 5'-trifosfato, sal de sódio de adenosina 5'-difosfato, sal de sódio 5'-monofosfato, adenosina, Ficoll-Histopaque (Lymphoprep) e Coomassie Brilliant Blue G, os quais foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes utilizados no experimento foram de grau analítico e alta pureza.

A amostra de plaquetas mantida em tampão HEPES, empregada para avaliação da enzima ecto-5'-nucleotidase e NTPDase em plaquetas, foi descongelada para realização dos ensaios. Primeiramente efetuou-se a dosagem de proteínas conforme o método de Bradford [18]. Para determinação das proteínas, empregou-se o reagente Azul de Coomassie, a partir do qual realizou-se curva padrão em triplicata com albumina bovina, efetuando as leituras em espectrofotômetro UV/VIS 5300 PC, da Metash, a 595 nm, e obteve-se o FC do reagente de 0,073. Para a dosagem de proteína, adicionou-se em um tubo de ensaio 50 μ L de amostra e 2.500 μ L de Azul de Coomassie e calculou-se as concentrações.

Para a execução dos ensaios é necessário que a concentração de proteínas na amostra se encontre entre 0,4-0,6 mg/mL. Para valores obtidos acima destes parâmetros, efetuou-se a diluição da amostra com o tampão HEPES. Preparou-se a solução de incubação empregando-se cloreto de sódio (NaCl) 1,2 M, glicose 60 mM, cloreto de potássio (KCl) 50 mM, tris hidrocloreto (Tris-HCL) 500 mM (pH 7,4), cloreto de cálcio (CaCl_2) 50 mM e água destilada, a qual foi adicionada no volume de 160 μ L em cada cavidade da placa juntamente com 20 μ L das amostras em duplicata e pré incubada a 37°C durante 10 minutos. Ao remover a placa do banho-maria, acrescentou-se 20 μ L do substrato (ATP/ADP 10 mM) e incubou-se durante 60 minutos; após este período adicionou-se 100 μ L de TCA 15%, o qual permite a interrupção da reação. Então, procedeu-se à coloração utilizando 30 μ L da amostra e 300 μ L de verde malaquita com leitura da absorbância em 630 nm. Para a determinação da atividade da ecto-5'-nucleotidase, preparou-se solução de incubação similar da NTPDase, substituindo o CaCl_2 50 mM por cloreto de magnésio (MgCl_2) 100 mM e utilizou-se como substrato o AMP 20 mM. Para ambas as determinações de hidrólise dos nucleotídeos, empregou-se as médias das absorbâncias multiplicadas pelo fator de correção do fosfato (FCF), e divididas pelo tempo de incubação, volume e concentração de proteínas. Ao final os resultados foram expressos em nmolpi/min/mg de proteína.

Para avaliação da ADA, foram identificados dois poços na placa pertencentes a mesma amostra e pipetou-se 30 μ L de amostra apenas no “poço 01”, colocou-se 90 μ L de adenosina nos dois poços, levando a placa para incubação durante 60 minutos à 37°C. Após esse período, pipetou-se 30 μ L da amostra no “poço 02” e, em ambos os poços, adicionou-se 80 μ L de fenol e 80 μ L de hipoclorito. A placa foi mais uma vez incubada durante 30 minutos à 37°C e então procedida a leitura a 620 nm. Para definição dos resultados, considerou-se a média das absorbâncias e do padrão, multiplicados pelo FC, expressando os valores obtidos em unidades/litro (U/L).

Para análise da enzima ecto-5'-nucleotidase e NTPDase em linfócitos, efetuou-se a dosagem da concentração de proteínas nas amostras de linfócitos seguindo o método de Bradford [18], conforme executado nas plaquetas. Para a operação da atividade das enzimas, adequou-se a concentração de proteínas para a faixa de 0,1-0,2 mg/mL; aos valores obtidos superiores a estes parâmetros, realizou-se a diluição da amostra com solução fisiológica. A avaliação da hidrólise dos nucleotídeos e atividade da ecto-5'-nucleotidase e da NTPDase em linfócitos foi efetuada conforme o protocolo de Pilla et al. [11], consoante com o empregado na amostra de plaquetas, diferindo unicamente no tempo de incubação, que foi de 70 minutos.

Para análise da ADA em linfócitos, efetuou-se o protocolo de avaliação da ADA de modo similar ao executado com a amostra de plaquetas.

Análise estatística

Após elaboração das planilhas eletrônicas, os dados foram submetidos aos testes estatísticos adequados para cada amostra. A normalidade foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os tempos no grupo (antes, após uma semana e após oito semanas do protocolo de exercício físico), em relação às variáveis do estudo, foram avaliadas através da análise de variância ANOVA. As amostras que não apresentaram distribuição normal foram substituídas pela análise de variância ANOVA, pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando houve diferença, os tempos foram comparados entre si com correção de Student-Newman-Keuls para variáveis paramétricas e correção de Bonferroni para variáveis não paramétricas. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Aspectos éticos

Para a realização do estudo foi seguido todos os rigores éticos contidos na Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) Nº 466 de 12 de dezembro de 2012, que trata das pesquisas com seres humanos e preconiza o sigilo dos dados e anonimato dos participantes e da instituição, onde se realizou a pesquisa.

Este estudo está vinculado ao projeto “Ensaio Clínico Randomizado de Atividade Física e Meditação para Redução de Estresse: Implicações sobre o Risco Cardiovascular e Biomarcadores” o qual possui aprovação pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Instituto

de Cardiologia do RS/Fundação Universitária de Cardiologia e foi registrado mediante Plataforma Brasil sobre o CAAE: 85407018.3.0000.5333.

Os participantes foram esclarecidos em relação ao objetivo da pesquisa e sobre os métodos utilizados para a coleta dos dados e intervenção, bem como a avaliação dos mesmos. Foi assegurada a garantia de impessoalidade nas respostas, bem como a possibilidade de interromper a participação quando achar necessário e também o direito de acesso aos resultados. Enfim, foram seguidas todas as exigências da lei para manter o respeito, a dignidade e a liberdade dos participantes.

Resultados

A amostra foi composta por 16 estudantes da área da saúde da UFFS Campus Chapecó-SC, Brasil. Destes, dois eram do curso de medicina (12,5%) e 14, do curso de enfermagem (87,5%). Quanto ao sexo, três eram do sexo masculino e, 13, do sexo feminino. A idade variou entre 20 e 40 anos (M=23 e SD=3,6).

Sistema purinérgico

As análises laboratoriais do sistema purinérgico indicaram, através da Generalized Estimating Equations (GEE), com $p=0,717$, não haver diferença na média de ATP linfócitos em relação aos momentos pré, uma semana e oito semanas após prática do exercício físico (Fig. 1). Ademais, no que se refere a hidrólise de ATP em plaquetas, através da GEE, com $p=0,062$, verificou-se não haver diferença na média de ATP plaquetas em relação aos momentos pré, uma semana e oito semanas após prática do exercício físico (Fig. 1).

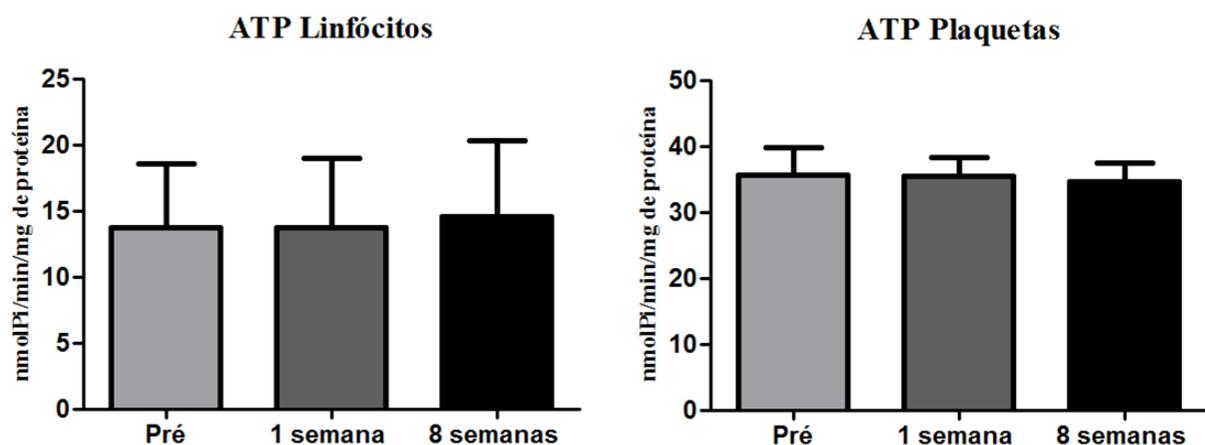


Fig. 1 Hidrólise de ATP em linfócitos e plaquetas nos momentos pré, uma semana e oito semanas após protocolo de exercício físico. Dados analisados pelo teste GEE, expressos em média e desvio padrão.

Em relação à hidrólise do nucleotídeo ADP, em plaquetas, observou-se uma diminuição significativa na hidrólise desse nucleotídeo no grupo após 8 semanas de exercício físico, com $p=0,001$. Através da GEE complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ao nível de significância de 5%, verificou-se que a média de ADP plaquetas nos momentos pré e uma semana após exercício não se diferiram entre si, todavia, foram significativamente maiores do que no momento 8 semanas após exercício (Fig. 2).

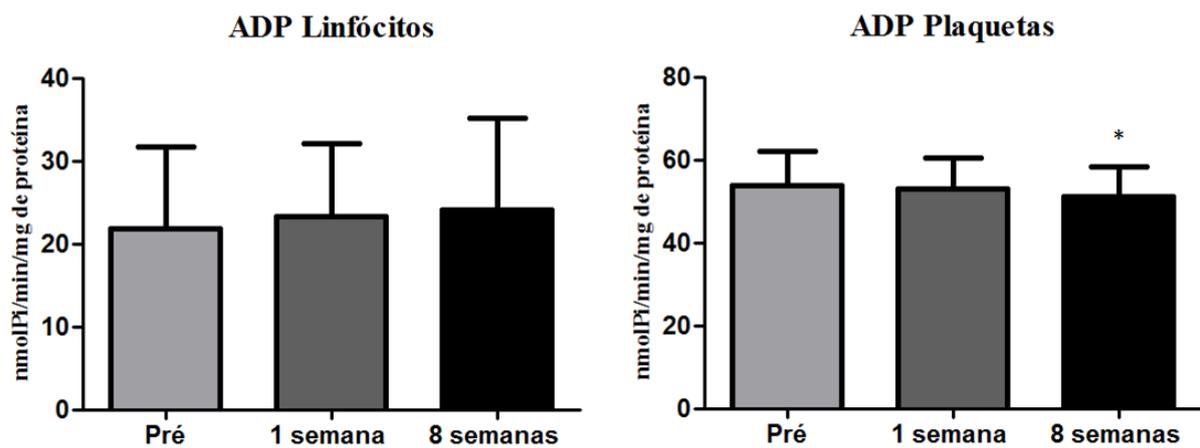


Fig. 2 Hidrólise de ADP em linfócitos e plaquetas nos momentos pré, uma semana e oito semanas após protocolo de exercício físico. Dados analisados pelo teste GEE, expressos em média e desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística $*p<0,05$.

Referente ao AMP, através da GEE, com $p=0,071$ (linfócitos) e $p=0,121$ (plaquetas), verificou-se não haver diferença na média de AMP tanto em linfócitos quanto em plaquetas em relação aos momentos pré e pós prática do protocolo de exercício físico (Fig. 3).

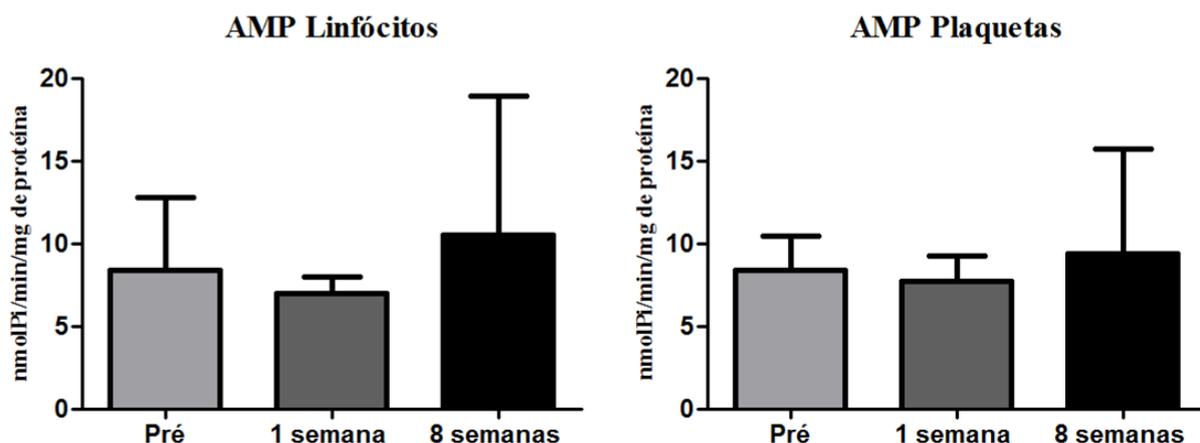


Fig. 3 Hidrólise de AMP em linfócitos e plaquetas nos momentos pré, uma semana e oito semanas após protocolo de exercício físico. Dados analisados pelo teste de Generalized Estimating Equations (GEE), expressos em média e desvio padrão.

Para mais, no que se refere a hidrólise de ADA em linfócitos, através da GEE, com $p=0,225$, verificou-se não haver diferença na média de ADA linfócitos em relação aos momentos pré e pós prática do exercício físico (Fig. 4). Já em relação a hidrólise de ADA em plaquetas, através da GEE complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ao nível de significância de 5%, verificou-se que a média nos momentos pré e uma semana após protocolo de exercícios não se diferiram entre si, todavia, no momento oito semanas após exercícios a hidrólise de ADA foi significativamente maior do que no momento pré exercício, com $p=0,041$ (Fig. 4).

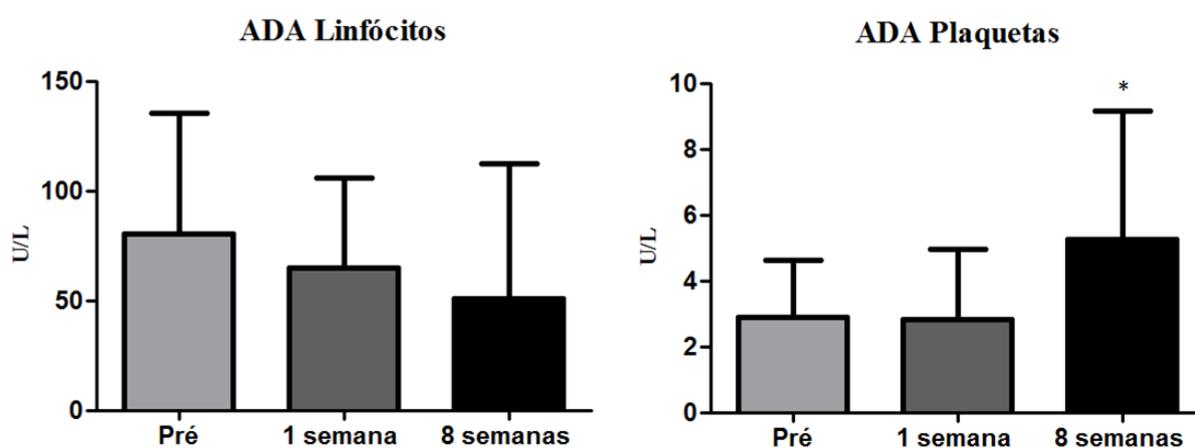


Fig. 4 Hidrólise da ADA em linfócitos e plaquetas nos momentos pré, uma semana e oito semanas após protocolo de exercício físico. Dados analisados pelo teste GEE, expressos em média e desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística $*p<0,05$.

Perfil oxidativo

O perfil oxidativo dos indivíduos em estudo foi avaliado pelas concentrações de indicadores de dano oxidativo, como a peroxidação lipídica por TBARS e a atividade da enzima MPO, avaliou-se, também, componentes do sistema de defesa antioxidante, como PSH e NPSH. Em relação a peroxidação lipídica por TBARS, através da GEE complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ao nível de significância de 5%, com $p=0,012$, verificou-se que a média de TBARS foi significativamente maior no momento pré do que no momento uma semana após exercícios. Não houve diferença significativa entre os demais momentos (Tab. 1).

No que tange a atividade da enzima MPO, através da GEE, com $p=0,907$, verificou-se não haver diferença na média de MPO em relação aos momentos pré, uma semana e oito semanas após a prática do exercício físico (Tab. 1).

Já em relação ao sistema de defesa antioxidante PSH, através da GEE complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ao nível de significância de 5%, com $p=0,004$, verificou-se que a média de PSH foi significativamente menor no momento pré do exercício físico do que nos demais momentos. Ademais, não houve diferença significativa entre uma semana e oito semanas após o exercício físico (Tab. 1).

Por fim, no que se refere ao sistema de defesa antioxidante NPSH, com $p=0,445$, verificou-se não haver diferença na média de NPSH em relação aos momentos pré, uma semana e oito semanas após a prática do protocolo de exercícios (Tab. 1).

Tab. 1 Parâmetros de perfil oxidativo nos momentos pré, uma semana e oito semanas após o protocolo de exercício físico

Parâmetros	Pré	1 Semana	8 Semanas	Valor de p
TBARS	10,474 ± 7,139	5,603 ± 4,000	8,597 ± 6,011	$p=0,012$
MPO	1,134 ± 0,734	1,171 ± 0,385	1,150 ± 0,458	$p=0,907$
Tióis Proteicos	0,094 ± 0,058	0,158 ± 0,076	0,155 ± 0,080	$p=0,004$
Tióis Não-Proteicos	0,054 ± 0,016	0,050 ± 0,008	0,049 ± 0,006	$p=0,445$

Legenda: Unidades de medidas: TBARS – nmol MDA/mL; MPO – mM de quinoneimina produzido em 30 minutos; Tióis proteicos e não-proteicos – $\mu\text{mol/mL}$ de plasma.

Discussão

Em decorrência da mudança do estilo de vida da população, nas últimas décadas, a inatividade física tem contribuído de forma significativa para o aumento do sedentarismo. Para mais, o sedentarismo contribui para o aumento de problemas de saúde, tais como hipertensão, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, dentre outras comorbidades [19]. Dessa forma, muitos estudos são realizados com a finalidade de buscar novos conhecimentos no que tange aos efeitos do exercício físico à saúde humana. Dentre as inúmeras alternativas estudadas, destacam-se os componentes do sistema purinérgico e do estresse oxidativo.

Com o transcorrer do tempo, o papel da sinalização purinérgica como mediadora do processo de comunicação intracelular, especialmente em células do sistema imunitário, tem sido reconhecida [7, 20]. Enzimas como a ecto-NTPDase e a ADA possuem destaque no que tange a modulação imune, haja vista que o ATP extracelular possui propriedades pró-inflamatórias e pró-agregante plaquetária e, em contrapartida, a ADO possui propriedade anti-inflamatória e anti-agregante plaquetária [7].

No presente trabalho, o exercício físico esteve associado ao aumento, apesar de não significativo, da atividade enzimática em linfócitos das enzimas ecto-NTPDases, mediante aumento da hidrólise de ATP e ADP. Tal atividade enzimática pode ser explicada mediante aumento da concentração de ATP no ambiente extracelular em decorrência do dano celular e do processo inflamatório ocasionados pela prática do exercício físico [7]. A ativação da ecto-NTPDase em linfócitos também foi observada em pesquisas envolvendo o exercício de natação em pacientes hipertensos [21].

Ademais, o exercício físico apresentou correlação, apesar de não significativa, com a diminuição da atividade da ADA em linfócitos, indicando uma concentração elevada de ADO disponível no ambiente extracelular. A ADO é responsável por inibir as células efectoras do sistema imunológico através da sinalização via receptor A2A. Associando o aumento da atividade da ecto-NTPDases e da ADO, podemos inferir que o exercício físico atua de modo a proporcionar a ativação de mediadores anti-inflamatórios [21, 22].

Em um estudo foi demonstrado que a ação anti-inflamatória decorrente da prática de exercício físico de modo regular pode ser alcançada através da indução de um ambiente anti-inflamatório a cada sessão de exercício [22]. Diversos mecanismos podem estar envolvidos nesse processo, a saber: aumento da produção de IL-6; aumento da liberação de adrenalina e cortisol pelas adrenais; aumento da circulação de células T regulatórias (TReg); diminuição da

infiltração de macrófagos e monócitos no tecido adiposo; diminuição da expressão de receptores do tipo Toll Like (TLRs) em macrófagos e monócitos; e diminuição da circulação de monócitos pró-inflamatórios [22].

Este estudo demonstrou que, embora o exercício físico tenha aumentado a quantidade de ATP extracelular, possivelmente em decorrência do dano celular causado pelo próprio exercício, de modo a aumentar a atividade das ecto-NTPDases, hipotetizamos que deva haver um mecanismo compensatório no que se refere ao sistema imune, visto que a atividade da ADA se mostrou reduzida, de modo a proporcionar uma quantidade maior de ADO, propiciando uma ação anti-inflamatória. Sendo assim, o treinamento físico está diretamente relacionado à modulação do sistema purinérgico no que concerne a mecanismos relacionados à inflamação. A diminuição da atividade da ADA pode estar relacionada à manutenção de ADO no meio, propiciando, assim, um ambiente anti-inflamatório [22].

Além do mecanismo inflamatório, o sistema purinérgico também está envolvido no mecanismo de agregação plaquetária. Este trabalho mostrou que houve uma redução significativa da ação da enzima ecto-NTPDase em plaquetas (hidrólise de ADP) e um aumento significativo na atividade da ADA após oito semanas de exercício físico. A diminuição da hidrólise de ADP após oito semanas de exercício indica que o ADP está em maior concentração no ambiente extracelular. É sabido que o ADP em elevada concentração estimula a agregação plaquetária [23, 24]. Esse resultado pode ser justificado pelo aumento dos níveis de AMP, apesar de não significativo, em decorrência do aumento do nível da atividade da ecto-NTPDase e da ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPP), responsáveis pela produção de AMP através da hidrólise de ATP e ADP [19]. Em contrapartida, o aumento da atividade da ADA corresponde a um aumento na concentração de ADO, molécula citoprotetora, responsável pelo mecanismo anti-inflamatório e imunossupressor, bem como pelo mecanismo antiagregante plaquetário [23]. A ADO inibe de forma competitiva o processo de coagulação plaquetária induzida pelo ADP, o que corrobora com os resultados encontrados em nosso trabalho [19].

Em um estudo com jovens adultos sedentários do sexo masculino submetidos a um protocolo de exercício aeróbico de moderada intensidade, verificou-se que houve um aumento significativo na atividade da ADA em plaquetas, dados semelhantes aos encontrados em nosso estudo [19]. Com esses dados, sugere-se que o exercício físico é capaz de modular a sinalização purinérgica, modificando a ação das nucleotidases no processo de comunicação celular. Dessa forma, a atividade da ecto-NTPDases e da ADA contribuem na modulação da resposta inflamatória e trombótica decorrentes do exercício físico, de modo a desencadear alterações na concentração de ATP, ADP, AMP e ADO.

O estresse oxidativo é característico de um conjunto diverso de estados fisiopatológicos dos mais variados sistemas, desde doenças neurológicas como doença de Parkinson e doença de Alzheimer; doenças cardiovasculares como aterosclerose e infarto do miocárdio; câncer, diabetes, insuficiência renal e várias inflamações [25]. Para a avaliação do estresse oxidativo no organismo, utiliza-se indicadores apropriados, como TBARS, MPO, PSH e NPSH.

O MDA, produto da peroxidação lipídica das membranas celulares devido reações de LPO mediadas pelas EROS, é um importante substrato que reage com o TBA, originando o composto identificado pelo TBARS [26]. Em um estudo realizado com pacientes depressivos submetidos à realização de exercícios mostrou a diminuição dos níveis séricos de TBARS após três semanas, resultado que vai ao encontro da diminuição observada em nosso estudo na comparação dos níveis mensurados entre os momentos pré e pós exercícios (ou seja, após uma semana de exercícios) [27]. Em outro estudo, mulheres com síndrome metabólica submetidas a 12 semanas de treinamento físico também demonstraram redução nos níveis de TBARS; no entanto, em nosso estudo, apesar de haver redução desse parâmetro entre as mensurações realizadas nos períodos pré e pós (ou seja, após oito semanas de exercícios), a diferença não foi estatisticamente significativa [28].

O MDA é o principal e mais estudado produto da peroxidação de ácidos graxos polinsaturados, sendo que sua interação com ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas está atrelada à possibilidade da existência ou formação de alterações sistêmicas, por exemplo, como fator mutagênico e também aterogênico [29]. Uma gama de patologias possuem significativo potencial de correlação com alterações no MDA, como fibrose hepática, progressão do processo inflamatório na aterosclerose, bem como maior ativação plaquetária, principalmente em condições patológicas como síndrome metabólica; assim sendo, a redução obtida nos níveis de TBARS pode estar correlacionada à redução do desenvolvimento ou progressão das condições patológicas recém citadas [30, 31, 32]. Nesse sentido, os resultados de nosso estudo destaca o benefício convergente encontrado na alteração de alguns marcadores (aumento da atividade da ADA e redução dos níveis de TBARS) no que se refere à agregação plaquetária patológica, conforme descrito na literatura sobre a relação desses marcadores associados a essa condição [23, 32].

A MPO é uma peroxidase expressa nos leucócitos, principalmente em neutrófilos e monócitos. Na presença de peróxido de hidrogênio e haletos, a MPO catalisa a formação de intermediários reativos de oxigênio, incluindo o HOCl. Além de desempenhar um papel importante na morte microbiana por neutrófilos, a MPO demonstrou ser um mediador local de

danos nos tecidos e uma responsável pela inflamação resultante em várias doenças inflamatórias [33].

Ademais, os tióis desempenham papéis importantes em vários aspectos das funções celulares, entre as quais inclui proteção celular contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio [34]. Os tióis auxiliam na manutenção da homeostase redox em vários compartimentos celulares, protegendo os organismos de estressores oxidativos e xenobióticos, agindo como eliminadores de peróxido de hidrogênio em enzimas antioxidantes [35]. Assim, a queda no nível plasmático de grupos tióis sugere diminuição da capacidade antioxidante do plasma [36].

Um estudo avaliou o perfil oxidativo de 16 jovens do sexo masculino após teste de esforço, teste que era realizado semanalmente, durante quatro meses; os resultados não mostraram alteração nos níveis de tióis [37]. Em nosso trabalho, houve um aumento estatisticamente significativo do marcador PSH após uma semana do protocolo de exercícios quando comparado ao momento pré exercício, sugerindo aumento na capacidade antioxidante mediada pelos tióis proteicos. A leve redução nos níveis de NPSH, ainda que não significativos estatisticamente, podem revelar uma resposta dessa defesa antioxidante na tentativa de evitar os danos ao organismo devido ao estresse oxidativo [38]. O aumento estatisticamente significativo dos níveis de PSH em nosso estudo revela provável desfecho benéfico para o organismo, visto que a queda no nível de tióis proteicos sugere diminuição da capacidade antioxidante do plasma, podendo estar associado à participação da gênese e/ou agravamento de quadros clínicos, como no processo inflamatório de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, na fisiopatologia da obesidade, na aterogênese e na progressão da placa aterosclerótica, e inclusive tendo desfechos a nível de sistema nervoso central, como neurodegeneração dopaminérgica da via nigroestriatal [36, 39, 40, 41, 42].

O estudo realizado apresentou limitações importantes quanto à sua amostra, haja vista que muitos participantes desistiram de realizar o protocolo de exercício físico. Para mais, outro fator que possa ter contribuído para resultados não significativos, porém com tendência à significância, diz respeito ao tempo de treinamento (muitos estudos sugerem um tempo de exercício físico de 10 semanas) e a frequência de treinamento por semana (estudos mostraram que uma frequência de cinco vezes por semana apresenta melhores resultados quanto aos parâmetros do estresse oxidativo e do sistema purinérgico).

Destarte, o exercício físico foi responsável por proporcionar modificações bioquímicas no que tange a sinalização purinérgica, de modo a desencadear alterações nas atividades enzimáticas tanto de ecto-NTPDases quanto de ADA em linfócitos e plaquetas. Para mais, as modificações dos marcadores do estresse oxidativo convergem com os resultados encontrados

nos marcadores da sinalização purinérgica, haja vista que a redução dos níveis de TBARS está diretamente relacionada à diminuição da progressão de processos inflamatórios e diminuição da agregação plaquetária. Dessa forma, pode-se inferir que há uma relação entre o mecanismo de sinalização purinérgica e o mecanismo do estresse oxidativo com o processo inflamatório, de modo que o exercício físico possui capacidade de modular esses sistemas com a finalidade de propiciar um ambiente anti-inflamatório e antiagregante plaquetário, favorecendo um estado biológico protetor.

Referências

- [1] World health organization (2010) Global recommendations on physical activity for health. https://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_recommendations/en/. Accessed 5 June 2020.
- [2] Dempsey PC, Owen N, Biddle SJH, Dustan DW (2014) Managing Sedentary Behavior to Reduce the Risk of Diabetes and Cardiovascular Disease. *Current Diabetes Reports* 14: 522. <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0522-0>.
- [3] Egan B, Zierath JR (2013) Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism* 17: 162-184. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>.
- [4] Mathur N, Pedersen BK (2008) Exercise as a Mean to Control Low-Grade Systemic Inflammation. *Mediators Inflamm* 2008: 1-6. <https://doi.org/10.1155/2008/109502>.
- [5] Nunes RB, Alves JP, Kessler LP, Lago PD (2013) Aerobic exercise improves the inflammatory profile correlated with cardiac remodeling and function in chronic heart failure rats. *Clinics (São Paulo)* 68: 876-882. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(06\)24](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(06)24).
- [6] Greaney JL, Wenner MM, Farquhar WB (2015) Exaggerated increases in blood pressure during isometric muscle contraction in hypertension: Role for purinergic receptors. *Autonomic Neuroscience* 188: 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.12.003>.
- [7] Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signaling. *Nature Rev Immunol* 11: 201-212. <https://doi.org/10.1038/nri2938>.

- [8] Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol. Life Sci* 64: 1471-1483. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0>.
- [9] North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>.
- [10] Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 77–89.
- [11] Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ (1996) ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets* 7: 225–230. <https://doi.org/10.3109/09537109609023582>.
- [12] Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM, Schetinger MRC (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* 109: 189–194. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(03\)00178-6](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(03)00178-6).
- [13] Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).
- [14] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- [15] Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 768-774. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- [16] Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T (1983) Assay Method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry* 132: 345–352. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90019-2).

[17] Giusti G, Galanti B (1984) Adenosine deaminase: colorimetric method. *Methods of Enzymatic Analysis* 4: 315–323.

[18] Bradford MA (1976) Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

[19] Moritz CEJ, Teixeira BC, Rockenbach L, Reischak-Oliveira A, Casali EA, Battastini AMO (2017) Altered extracellular ATP, ADP, and AMP hydrolysis in blood serum of sedentary individuals after an acute, aerobic, moderate exercise session. *Clinical Trial* 426: 55-63. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2880-1>.

[20] Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358-404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>.

[21] Cardoso AM, Abdalla FH, Bagatini MD, Martins CC, Zanini D, Schmatz R, Jaques JA, Leal DBR, Morsch VM, Schetinger MRC (2015) Swimming training prevents alterations in ecto-NTPDase and adenosine deaminase activities in lymphocytes from N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride induced hypertension rats. *J Hypertens* 33: 763-772. <https://doi.org/10.1097/hjh.0000000000000468>.

[22] Gleeson M, Bispo NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA (2011) The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 11: 607-615. <https://doi.org/10.1038/nri3041>.

[23] Fürstenau CR, Trentin DDS, Barreto-chaves MLM, Sarkis JF (2006) Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 17: 84-91. <https://doi.org/10.1080/09537100500246641>.

[24] Podgorska K, Derkacz A, Szahidewicz-Krupska E, Jasiczek J, Dobrowolski P, Radziwon-Balicka A, Skomro R, Szuba A, Mazur G, Doroszko A (2017) Effect of Regular Aerobic Activity in Young Healthy Athletes on Profile of Endothelial Function and Platelet Activity. *Biomed Res Int* 2017: 1-9. <https://dx.doi.org/10.1155%2F2017%2F8715909>.

[25] Uppu RM, Woods D, Parinandi NI (2020) Measurement of Oxidative Stress Status in Human Populations: a critical need for a metabolomic profiling. *Measuring Oxidants And Oxidative Stress In Biological Systems*. Springer International Publishing 8: 123-131. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47318-1_8.

[26] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2014: 1-31. <https://dx.doi.org/10.1155%2F2014%2F360438>.

[27] Schuch FB, Vasconcelos-Moreno MP, Borowsky C, Zimmermann AB, Wollenhaupt-Aguiar B, Ferrari P, Fleck MPA (2014) The effects of exercise on oxidative stress (TBARS) and BDNF in severely depressed inpatients. *European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience* 264: 605-613. <https://doi.org/10.1007/s00406-014-0489-5>.

[28] Farinha JB, Steckling FM, Stefanello ST, Cardoso MS, Nunes LS, Barcelos RP, Duarte T, Kretzmann NA, Mota CB, Bresciani G, Moresco RN, Duarte MMMF, Santos DL, Soares FAA (2015). Response of oxidative stress and inflammatory biomarkers to a 12-week aerobic exercise training in women with metabolic syndrome. *Sports Med Open* 1: 19. <https://doi.org/10.1186/s40798-015-0011-2>.

[29] Rio D, Stewart AJ, Pellegrini NA (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism And Cardiovascular Diseases* 15: 316-328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>.

[30] Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, Burt AD, Dia CP (2005) Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 54: 987-993. <https://dx.doi.org/10.1136%2Fgut.2004.057968>.

[31] Papac-Milicevic N, Busch CJL, Binder CJ (2016) Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis. *Advances In Immunology* 131: 1-59. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.02.001>.

[32] Zagol-Ikapite I, Sosa IR, Oram D, Judd A, Amarnath K, Amarnath V, Stec D, Oates JA, Boutaud O (2015) Modification of platelet proteins by malondialdehyde: prevention by dicarbonyl scavengers. *J Lipid Res* 56: 2196-2205. <https://dx.doi.org/10.1194%2Fjlr.P063271>.

[33] Aratani Y (2018) Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 640: 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>.

[34] Yang Y, Guan X (2017) Non-protein thiol imaging and quantification in live cells with a novel benzofurazan sulfide triphenylphosphonium fluorogenic compound. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* 409: 3417-3427. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0285-y>.

[35] Ulrich K, Jakob U (2019) The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology And Medicine* 140: 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>.

[36] Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I (2008) Cysteinylation and homocysteinylation of plasma protein thiols during ageing of healthy human beings. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine* 13: 3131-3140. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00417.x>.

[37] Zinellu A, Sotgia S, Caria MA, Tangianu F, Casu G, Deiana L, Carru C (2006) Effect of acute exercise on low molecular weight thiols in plasma. *Scandinavian Journal Of Medicine And Science In Sports* 17: 452-456. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2006.00542.x>.

[38] Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, Sen CK (1999) Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. *Redox Report* 4: 53-59. <https://doi.org/10.1179/135100099101534648>.

[39] Zinellu A, Fois AG, Sotgia S, Zinellu E, Bifulco F, Pintus G, Mangoni AA, Carru C, Pirina P (2016) Plasma protein thiols: an early marker of oxidative stress in asthma and chronic

obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Invest* 46: 181-188.
<https://doi.org/10.1111/eci.12582>.

[40] Picklo MJ, Idso JP, Jackson MI (2013) S-Glutathionylation of Hepatic and Visceral Adipose Proteins Decreases in Obese Rats. *Obesity* 21: 297-305.
<https://dx.doi.org/10.1002%2Foby.20002>.

[41] Lapedda AJ, Formato M (2020) Oxidative Modifications in Advanced Atherosclerotic Plaques: A Focus on In Situ Protein Sulfhydryl Group Oxidation. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 1-7. <https://dx.doi.org/10.1155%2F2020%2F6169825>.

[42] Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G, Georgiou CD, Matsokis NA, Panagopoulos NT (2004) Thiol redox state and oxidative stress in midbrain and striatum of weaver mutant mice, a genetic model of nigrostriatal dopamine deficiency. *Neuroscience Letters* 376: 24-28.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.11.019>.