

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

**CAROLINA ZIN  
NATAN RODRIGUES DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NAS ECTONUCLEOTIDASES EM LINFÓCITOS  
DE PACIENTES HEMODIALÍTICOS**

**CHAPECÓ - SC**

**2023**

**CAROLINA ZIN  
NATAN RODRIGUES DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NAS ECTONUCLEOTIDASES EM LINFÓCITOS  
DE PACIENTES HEMODIALÍTICOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

**CHAPECÓ - SC  
2023**

### **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Oliveira, Natan Rodrigues de  
EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NAS ECTONUCLEOTIDASES EM  
LINFÓCITOS DE PACIENTES HEMODIALÍTICOS / Natan Rodrigues  
de Oliveira, Carolina Zin. -- 2023.  
31 f.:il.

Orientadora: Profa. Dra. Sarah Franco Vieira de  
Oliveira Maciel

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2023.

1. Doença Renal Crônica. 2. Exercício Físico. 3.  
Sinalização Purinérgica. I. Zin, Carolina II. Maciel,  
Sarah Franco Vieira de Oliveira, orient. III.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

**Carolina Zin**  
**Natan Rodrigues de Oliveira**  
*acadêmicos(as)*

**Efeito das Ectonucleotidasas em Linfócitos de Pacientes Hemodialíticos**  
*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(ª). Dr(ª). Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel**

Este trabalho de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 27/06/2023

**BANCA EXAMINADORA**

Debora Tavares de R. Silva

**Prof(ª). Dr(ª). Debora Tavares de Resende e Silva**

Josiano G. Puhle  
**Prof(ª). Me(ª). Josiano Guilherme Puhle**

Sarah Franco  
**Prof(ª). Dr(ª). Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel**

## RESUMO

**Introdução:** A sinalização purinérgica no rim ocorre por mecanismos complexos. Constatou-se que a lesão renal promove o aumento na concentração de ATP, suscitando o estado de inflamação na Doença Renal Crônica (DRC). Além disso, a ADA, enzima – conversora da adenosina em inosina – também contribui para a ampliação da inflamação. O exercício físico de resistência, marcado pela contração muscular, aumenta a produção de antioxidantes, com efeito anti-inflamatório, por isso, pode ser utilizado como recurso terapêutico não farmacológico para diversas doenças crônicas. **Objetivos:** avaliar o efeito do exercício físico de resistência nos marcadores inflamatórios do sistema purinérgico em pacientes com DRC. **Metodologia:** O estudo tem um caráter intervencional de abordagem quantitativa de natureza descritiva e comparativa do tipo antes e depois de 30 pacientes em tratamento hemodialítico da Clínica Renal do Oeste. A avaliação se deu através da determinação da atividade de ectonucleotidases (CD39, CD73 e ADA) envolvidas no metabolismo do ATP, ADP, AMP e adenosina, e quantificação de ATP extracelular, nos linfócitos desses pacientes antes e após a realização do exercício. **Resultados:** verificou-se após o protocolo de exercício físico de resistência, o aumento na quantidade de ATP extracelular, redução na hidrólise de ATP e de AMP, e aumento na atividade da enzima ADA. Os resultados obtidos evidenciaram que a prática de exercício físico proporcionou um quadro pró inflamatório nesses pacientes. **Conclusão:** a prática de exercício físico em pacientes com DRC influenciou nos marcadores bioquímicos de inflamação do sistema purinérgico em linfócitos. Portanto, é certo afirmar que mais estudos são necessários para fornecer uma visão mais ampla e clara do efeito a curto e longo prazo, bem como de baixa e moderada intensidade, do exercício físico no sistema purinérgico.

**Palavras-chave:** Doença Renal Crônica; Exercício Físico; Sinalização Purinérgica

## ABSTRACT

Introduction: Purinergic signaling in the kidney occurs through complex mechanisms. It is known that renal injury leads to an increase in ATP concentration, contributing to the inflammatory responses in Chronic Kidney Disease (CKD). In addition, ADA, the enzyme that converts adenosine into inosine, also contributes to an increased inflammation profile. Resistance physical exercise, marked by muscle contraction, increases the production of antioxidants, with an anti-inflammatory effect, therefore, it can be used as a non-pharmacological therapeutic resource for several chronic diseases. Objectives: evaluate the effect of resistance physical exercise on inflammatory markers of the purinergic signaling in patients with CKD. Methods: This is an interventional study with a quantitative approach and a descriptive and comparative nature, using a before-and-after design in 30 patients undergoing hemodialysis at the Clínica Renal do Oeste (CRO). The evaluation was carried out through the determination of ectonucleotidases' (CD39, CD73 and ADA) activity involved in the metabolism of ATP, ADP, AMP and adenosine, and quantification of extracellular ATP, in the lymphocytes of these patients before and after the practice of the exercise. Results: An increase in the amount of extracellular ATP, a reduction in the hydrolysis of ATP and AMP, and an increase in the activity of the ADA enzyme were found after the resistance exercise protocol. The results obtained evidence that the practice of physical exercise led to a pro-inflammatory condition in these patients. Conclusion: The practice of physical exercise in patients with CKD influenced the inflammation biochemical markers of the purinergic system in lymphocytes. Therefore, it is safe to say that more studies are needed to provide a broader and clearer view of the short- and long-term effect, as well as low and moderate intensity, of physical exercise on the purinergic system.

Keywords: Chronic Kidney Disease; Physical Exercise; Purinergic Signaling

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Cascata da sinalização purinérgica.....	<b>14</b>
<b>Figura 2:</b> Resultados das análises laboratoriais pré e pós intervenção.....	<b>19</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resultados das análises de marcadores do sistema purinérgico.....	<b>20</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRC: Doença Renal Crônica

TFG: Taxa de Filtração Glomerular

TRS: Terapia Renal Substitutiva

HD: Hemodiálise

ATP: Adenosina Trifosfato

ADP: Adenosina Difosfato

UDP: Uridina Difosfato

UTP: Uridina Trifosfato

ADA: Adenosina Deaminase

CD73: Ecto 5'-nucleotidase

CD39: Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase-1

AMP: Adenosina Monofosfato

AMPc: Adenosina Monofosfato Cíclico

CRO: Clínica Renal do Oeste

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA E SISTEMA PURINÉRGICO.....	12
2.2 ECTONUCLEOTIDASES.....	13
2.3 EXERCÍCIO FÍSICO.....	14
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>16</b>
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	16
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM.....	16
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	16
3.4 COLETA DE DADOS.....	16
3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	17
3.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	18
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 QUANTIDADE DE ATP.....	20
4.2 HIDRÓLISE DE ATP.....	20
4.3 HIDRÓLISE DE ADP.....	20
4.4 HIDRÓLISE DE AMP.....	21
4.5 ADENOSINA DEAMINASE.....	21
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>24</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>25</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) pode ser definida como uma condição caracterizada pela deterioração irreversível da função renal, marcada por uma evolução insidiosa e progressiva, com alto risco de morbidade e mortalidade, devido a incapacidade dos rins de manter suas funções, como equilíbrio hidroeletrólítico e metabólico (AMMIRATI, 2020). Essa patologia é considerada pelo Ministério da Saúde (2014) como um grave problema à saúde pública, considerando sua elevada incidência e prevalência. Em 2017, foi estimado que a DRC tinha uma prevalência de 9,1%, cerca de 700 milhões de casos ao redor do mundo (CARNEY, 2020), enquanto no Brasil, ainda que incerta a epidemiologia da doença, um estudo de 2020 estimou que o valor absoluto de pacientes com DRC ficou na margem de 135 a 150 mil pacientes, mantendo a tendência do aumento em relação aos anos anteriores (NERBASS *et al.*, 2022).

A DRC vem apresentando uma constante crescente em sua prevalência e incidência (NERBASS *et al.*, 2022), e em 2017, o estudo de Carga Global de Morbidade indicou que a doença foi responsável por 1,2 milhões de mortes globalmente, o que a colocou como 12ª maior causa de morte no mundo. O mesmo estudo também evidenciou um aumento de 41,5% na taxa de mortalidade em todas as idades por DRC entre 1990 e 2017.

São considerados portadores de DRC indivíduos que apresentam Taxa de Filtração Glomerular (TFG) abaixo de 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> por três meses consecutivos, ou pacientes com TFG maior ou igual a 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> associado à marcador de dano no parênquima renal, como albuminúria >30 mg/24 horas ou relação albumina/creatinina >30 mg/g, hematuria, alterações eletrolíticas, anormalidades tubulares e/ou alterações na biópsia renal (BRASIL, 2014). Desse modo, o tratamento visa adiar a progressão da DRC, tratando complicações como anemia, distúrbios hidroeletrólíticos, distúrbios metabólicos, doença cardiovascular e alterações osteomusculares, bem como preparar o paciente para terapia renal substitutiva (TRS), em estágios mais avançados da doença (AMMIRATI, 2020).

A hemodiálise (HD), uma das técnicas mais eficazes para o tratamento da DRC, realiza a filtração do sangue de modo a eliminar substâncias que em excesso trazem prejuízos ao organismo, por meio de um dialisador que retém substâncias e retorna o sangue filtrado para o paciente. Contudo, tanto a doença crônica como o tratamento hemodialítico acarretam em limitação funcional nos indivíduos, contribuindo para o sedentarismo, deficiência

funcional e inatividade física (SILVA *et al.*, 2013), além de danos celulares e biomoleculares, fatores que a longo prazo podem levar a pior prognóstico (ZARGAR; SEDIGHI, 2015), o que demonstra a importância de buscar intervenções capazes de reduzir esses efeitos .

No contexto do mecanismo biomolecular, nucleotídeos — subunidades de ácidos nucleicos — são liberados no meio extracelular como mensageiros capazes de fornecer energia para o metabolismo intracelular e podem agir tanto de forma fisiológica quanto patológica. Os receptores P2X são ativados pela adenosina trifosfato (ATP), enquanto os receptores P2Y, acoplados à proteína G, são ativados por ATP, adenosina difosfato (ADP), uridina trifosfato (UTP) e uridina difosfato (UDP). Por sua vez, os receptores P1 são ativados pela adenosina . Nas células renais, ocorre sinalização purinérgica devido à presença de enzimas chamadas ectonucleotidases, que fazem parte do sistema purinérgico e são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares, como ATP e ADP . Na lesão do tecido renal, a estimulação deste sistema é anormal, com características inflamatórias marcada pelo aumento local na concentração de ATP, resultando em ativação excessiva dos receptores P2, que é capaz de ocasionar danos nas células renais (MENZIES *et al.*, 2017), tendo em vista que a inflamação crônica é capaz de acarretar lesão tecidual (YUAN *et al.*, 2021).

Portadores de DRC possuem menor força aeróbica e funcionalidade comparados a pessoas inativas sem comorbidades (AOIKE *et al.*, 2015). Existem evidências de que o exercício aeróbio proporciona efeito positivo para esses pacientes e proporciona redução de processos inflamatórios (AIOKE *et al.*, 2015; VILLANEGO, 2020; METSIOS; MOE; KITAS, 2020). Contudo, existem poucos estudos acerca de exercício físico resistido, favorecendo o interesse em verificar seus efeitos em pacientes renais crônicos. Mais além, considerando o perfil pró-inflamatório da DRC (EBERT, 2020) associado à sinalização purinérgica nessa condição (MENZIES *et al.*, 2016), é evidente a perda de qualidade de vida nesses pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis (WEBSTER, 2016), com níveis de qualidade de vida ainda mais prejudicados em pacientes em HD (PERLMAN, 2005).

Desta forma, o presente estudo buscou verificar a eficácia da prática de exercícios físicos na melhora de marcadores inflamatórios do sistema purinérgico, o tem relevância ao apresentar uma atividade que traz benefícios no perfil inflamatório e na qualidade de vida desses pacientes.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do exercício físico resistido em pacientes renais crônicos em tratamento hemodialítico, bem como avaliar os parâmetros do

sistema purinérgico antes e após realização de exercício físico através de análise sanguínea, por meio dos seguintes biomarcadores: quantificação de ATP sérico, atividade da adenosina deaminase (ADA), da ecto 5'-nucleotidase (CD73) e da ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1 (CD39), também conhecida como NTPDase-1.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA E SISTEMA PURINÉRGICO

A DRC representa uma síndrome clínica decorrente da alteração irreversível, de evolução lenta e progressiva, da função e/ou estrutura renal, sustentada por três meses ou mais. Ela apresenta alto risco de complicações e mortalidade, principalmente cardiovasculares (AMMIRATI, 2020; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2022). Essa doença não provoca sintomas significativos ou específicos nos estágios iniciais, ressaltando a importância do conhecimento sobre a mesma e seus principais fatores de risco, como diabetes mellitus e hipertensão arterial. Quando em estágio avançado, são necessários tratamentos como a HD e o transplante renal. Existem mais de 140 mil pacientes que realizam HD no país e a incidência de DRC é crescente no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2022).

O rim possui complexos mecanismos para sinalização purinérgica, expressando receptores P<sub>2</sub>, canais iônicos controlados por ligantes, que são ativados por ATP. Em condições normais, ATP pode ser liberado pelas células renais, mas possui curta meia vida devido ao catabolismo pelas ectonucleotidases. O metabolismo do ADP produz adenosina monofosfato (AMP), através da CD39, e eventualmente a adenosina, através da CD73 (MENZIES, 2017).

Estímulos como danos celulares provocam liberação de ATP no meio extracelular. As ectonucleotidases localizadas na membrana plasmática catalisam a hidrólise de ATP em ADP, AMP e adenosina. Nas lesões crônicas, ocorre um aumento sustentado nas concentrações de ATP, ADP, UTP e UDP (MENZIES, 2017).

A adenosina, um nucleosídeo de purina endógeno, está presente em baixos níveis extracelulares, mas pode aumentar suas concentrações após condições de estresse metabólico. A adenosina induz seus efeitos por meio de interação com receptores de superfície celular, alguns destes presentes nos linfócitos, que são as principais células da imunidade adaptativa, correspondendo a 20-40% das células sanguíneas. Quando essa ligação ocorre, há aumento na produção de AMP cíclico (AMPc), que tem efeito imunossupressor (GESSI *et al.*, 2007; PRZBYLA, T., SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M., PAWELCZYK, T., 2018).

## 2.2 ECTONUCLEOTIDASES

As ectonucleotidasas são enzimas de membrana responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de purina e pirimidina, responsáveis por proporcionar equilíbrio entre os nucleotídeos pró-inflamatórios e a adenosina anti-inflamatória (GIULIANI; SARTI; DI VIRGILIO *et al.*, 2021).

Após a liberação de ATP no espaço extracelular, a CD39 converte o ATP em AMP numa reação de dois passos, convertendo inicialmente o primeiro em ADP e este em AMP. Na sequência, a CD73 age defosforilando o AMP em adenosina (ANTONIOLI *et al.*, 2013). A CD39 afeta as respostas de todas as células imunes, como os linfócitos. Processos não regulados podem aumentar a concentração de ATP no meio extracelular, ocasionando desequilíbrio. A expressão de CD39 e CD73 é alterada com o contexto fisiopatológico no qual se encontram (ANTONIOLI *et al.*, 2013). Nos rins, a atividade enzimática do CD73 é a mais alta comparando aos demais tecidos do corpo, e durante DRC em pacientes hipertensos está em níveis aumentados (MINOR *et al.*, 2019).

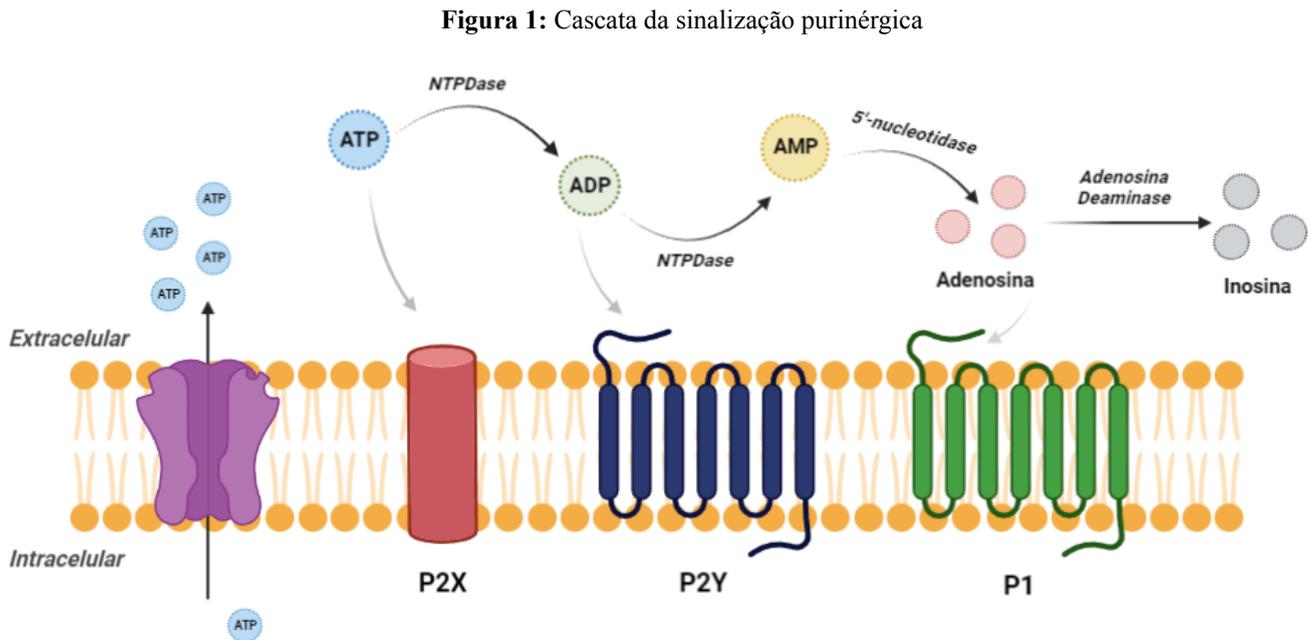
A hidrólise de nucleotídeos purínicos extracelulares gera adenosina, um importante imunossupressor. Os nucleotídeos iniciam ou reduzem a inflamação por meio de receptores P2X. Dependendo da concentração do agonista, são moduladores da inflamação e promovem ativação de células imunes, levando ao reparo e regeneração tecidual (GIULIANI; SARTI; DI VIRGILIO *et al.*, 2021).

A lesão renal ocasiona aumento localizado na concentração de ATP e a ativação sustentada dos receptores P2, o que acarreta dano nas células tubulares, glomerulares e vasculares nos rins. Além disso, receptores purinérgicos regulam a atividade de fibroblastos, promovendo inflamação e fibrose em doenças crônicas (MENZIES *et al.*, 2017).

A ADA, expressa como uma ectoenzima na superfície de diferentes células, desempenha papel essencial no metabolismo das purinas (MORENO *et al.*, 2018). Ela é responsável por regular a concentração de adenosina, transformando-a em inosina. A adenosina é um inibidor parácrino da inflamação, porém, quando há alterações na homeostase, a concentração de adenosina aumenta, o que pode levar a papel anti inflamatório

e protetor celular. Nesse sentido, a ADA pode contribuir para uma situação de maior inflamação de modo que reduz a concentração extracelular de adenosina (LU *et al.*, 2021).

Para melhor compreender a cascata do sistema purinérgico, a Figura 1 traz uma representação visual desta, indicando os principais marcadores descritos:



Fonte: Criado com BioRender.com

### 2.3 EXERCÍCIO FÍSICO

A DRC é marcada por altos níveis de estresse oxidativo, perfil pró-inflamatório e desnutrição. Esses fatores em desequilíbrio aumentam a mortalidade e morbidade principalmente em nível cardiovascular e no aparelho locomotor, evidenciado com a perda de massa muscular (VILLANEGO *et al.*, 2020).

A prática de exercício físico resistido repercute na função endotelial, fluxo sanguíneo, diminuição da glicemia, efeito antioxidante, aumento da sensibilidade à insulina bem como da massa magra e força muscular (JOHANSEN., 2006). Ainda, o sedentarismo pode ser causa e consequência da progressão da doença renal, de modo a reduzir a prática do exercício físico à medida que a filtração glomerular reduz (VILLANEGO *et al.*, 2020).

O exercício físico de resistência, marcado pela contração muscular, aumenta a produção de antioxidantes, com efeito anti-inflamatório, imunoregulador e metabólico (DÍAZ *et al.*, 2018). Durante a prática do exercício, assim como em processos fisiológicos, são gerados radicais livres, que em pequena quantidade são importantes para manutenção da homeostasia, ocasionando processos como contração muscular, respostas imunológicas, promoção de apoptose e desintoxicação (SIMIONI, 2018).

Como terapia não farmacológica, o exercício físico moderado pode ser realizado em pacientes com diversas doenças crônicas, inclusive com doença renal (DÍAZ *et al.*, 2018; SIMIONI *et al.*, 2018; MAGHERINI *et al.*, 2019, THIRUPATHI, PINHO, CHANG, 2020).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo intervencional de abordagem quantitativa de caráter descritivo e comparativo, antes e depois, com pacientes provenientes da Clínica Renal Oeste (CRO), no município de Chapecó/SC.

#### 3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

Fizeram parte do estudo 30 pacientes (n= 30) com DRC em tratamento de HD na CRO.

#### 3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

**Critérios de Inclusão:** pacientes dos sexos feminino e masculino, com idade superior ou igual a 18 anos, submetidos a acompanhamento médico devido a diagnóstico de DRC, sob tratamento hemodialítico há no mínimo 6 meses.

**Critérios de Exclusão:** pacientes que vieram a óbito ou desistiram da participação ao longo do desenvolvimento da pesquisa, bem como aqueles que já realizavam exercícios em período anterior à pesquisa ou durante a pesquisa fora do protocolo.

#### 3.4 COLETA DE DADOS

A primeira etapa foi a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A primeira coleta de sangue ocorreu após a aplicação do TCLE e antes das intervenções, na qual foi coletado sangue de cada paciente antes da sessão de HD. A segunda coleta de sangue foi feita uma semana após o fim das intervenções, também precedendo a sessão de HD. As intervenções ocorreram com os pacientes do primeiro turno de diálise da

clínica (5h30min) e foram realizadas de modo intradialítico, ou seja, durante o procedimento de HD.

### 3.5 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO

O protocolo de exercício físico resistido foi executado sob a supervisão de um Profissional de Educação Física e um Fisioterapeuta. Os exercícios foram realizados em uma cadeira de diálise, com os participantes sentados ou deitados, durante um total de 36 sessões. As sessões ocorreram três vezes por semana, ao longo de 12 semanas. Para realizar os exercícios, foram utilizadas faixas elásticas, halteres e caneleiras com diferentes pesos, os quais foram ajustados de acordo com o desempenho e o progresso de cada paciente.

Os exercícios próximos a áreas anatômicas com cateteres foram evitados, sendo realizados no lado oposto. O protocolo utilizado foi baseado e adaptado do protocolo desenvolvido por Cheema e colaboradores (2007). Cada sessão teve uma duração de 30 a 45 minutos e consistiu em três séries de 10 a 15 repetições dos seguintes exercícios:

- Extensão do joelho, seguida de retorno à posição inicial (flexão);
- Flexão do quadril, seguida de retorno à posição inicial (extensão);
- Abdução do quadril, seguida de retorno à posição inicial (adução);
- Rotação medial do quadril, seguida de retorno à posição inicial (rotação medial);
- Flexão do cotovelo, seguida de retorno à posição inicial (extensão);
- Extensão do cotovelo, seguida de retorno à posição inicial (flexão);
- Elevação da escápula, seguida de retorno à posição inicial (depressão);
- Abdução do ombro, seguida de retorno à posição inicial (adução).

### 3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

**Análises sanguíneas:** As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas em tubos Vacutainer® de 4mL contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e foram utilizados para obtenção dos linfócitos seguindo os passos descritos por Da Silva e colaboradores (2022).

**Quantificação de proteínas:** A determinação proteica foi realizada seguindo o método de Bradford (1976), que envolve a união proteica com Coomassie® Azul Brilhante G-250.

**Atividade das ectonucleotidases:** A atividade da ADA nos linfócitos foi realizada de acordo com a técnica de Giusti e Galanti (1974). Já a avaliação da atividade da CD39 nos linfócitos seguiu o protocolo de Leal e colaboradores (2005). A atividade da CD73 nos linfócitos foi realizada seguindo os moldes de Da Silva e colaboradores (2022).

**ATP extracelular:** A determinação de ATP extracelular foi realizada usando o kit comercial Invitrogen® com ensaio de bioluminescência, também seguindo os passos de Da Silva e colaboradores (2022).

**Análises estatísticas:** Os valores obtidos foram tabulados e as análises estatísticas foram feitas por Teste T para dados pareados a partir do programa *GraphPad Prism 9*. A normalidade dos grupos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram computados como média  $\pm$  desvio padrão. Foram consideradas estatisticamente significativas as amostras que rejeitaram a hipótese nula de 5% ( $p < 0,05$ ).

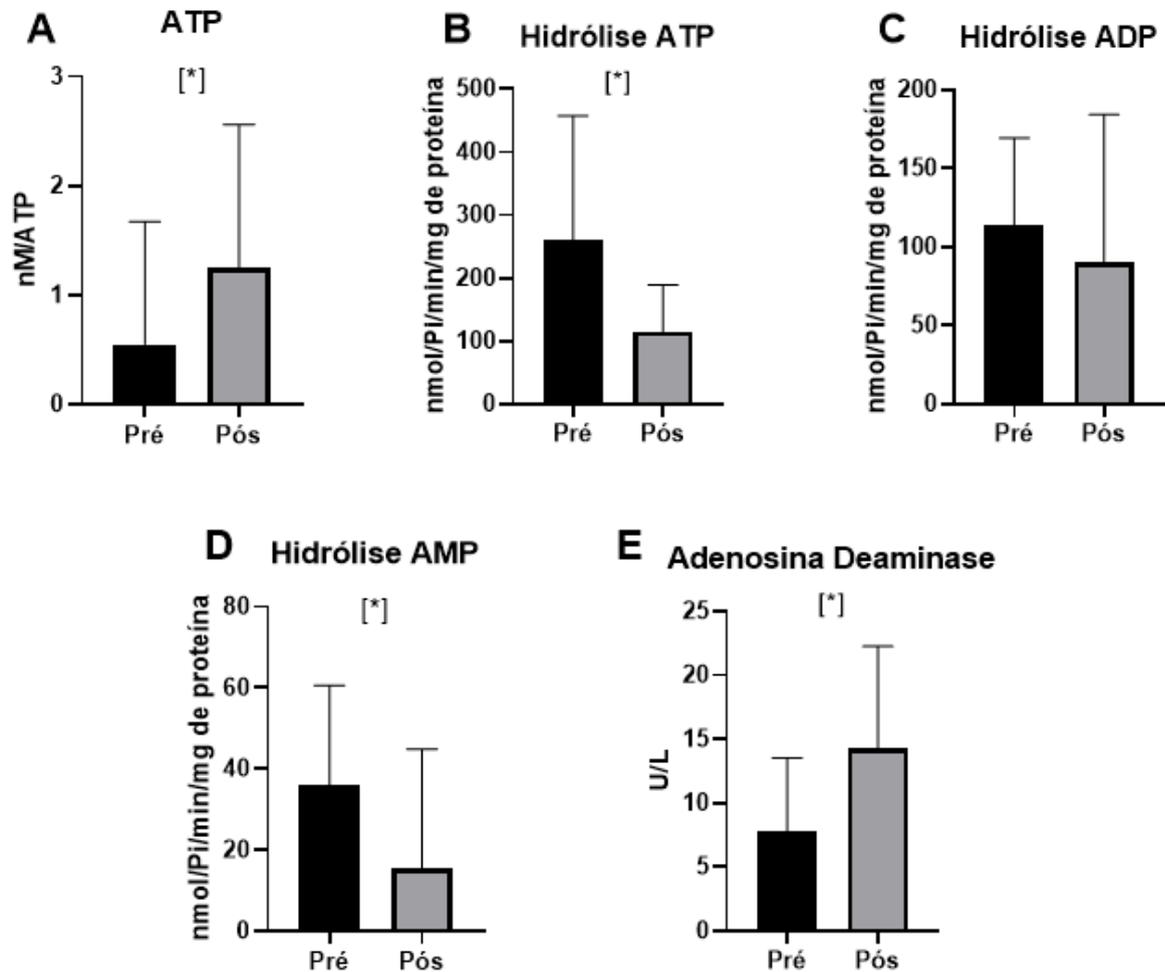
### 3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Fronteira Sul (número do parecer: 4.731.485 - 25 de maio de 2021). Os pacientes elegíveis foram previamente informados sobre a pesquisa e utilização do material biológico para realização do estudo, por meio de uma conversa realizada presencialmente com os mesmos na CRO. Em seguida, o TCLE foi apresentado aos voluntários que aceitaram participar do estudo.

## 4 RESULTADOS

Após a análise laboratorial dos marcadores bioquímicos dos grupos Pré (intervenção) e Pós (intervenção), os resultados encontrados foram sintetizados na Figura 2. Todos os dados levam em consideração a população de n=30.

**Figura 2:** Resultados das análises laboratoriais pré e pós intervenção



**A:** Quantidade de ATP antes e após intervenção. **B:** Hidrólise de ATP antes e após intervenção. **C:** Hidrólise de ADP antes e após intervenção. **D:** Hidrólise de AMP antes e após intervenção. **E:** Atividade da ADA antes e após intervenção. [\*] denota significância estatística ( $p \leq 0,05$ ).

Para complementar a compreensão dos valores, os dados também foram sintetizados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resultados das análises de marcadores do sistema purinérgico

<b>Marcador</b>	<b>Pré</b>	<b>Pós</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Quantificação ATP</b>	0,548 ± 1,125	1,248 ± 1,313	<b>0,037*</b>
<b>Hidrólise ATP</b>	260,3 ± 197,2	114,6 ± 74,58	<b>&lt;0,001*</b>
<b>Hidrólise ADP</b>	114,1 ± 55,24	90,21 ± 94,01	0,241
<b>Hidrólise AMP</b>	36,13 ± 24,52	15,31 ± 29,59	<b>0,013*</b>
<b>ADA</b>	7,824 ± 5,694	14,31 ± 7,944	<b>0,001</b>

Unidades de medida, respectivamente: nM/ATP, nmol/Pi/min/mg de proteína, nmol/Pi/min/mg de proteína, nmol/Pi/min/mg de proteína e U/L. Dados expressos em média ± desvio padrão. \* denota diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) antes e após a intervenção.

Dessa forma, pudemos observar um aumento na quantidade de ATP sérico, aumento esse que se mostrou estatisticamente significativo ( $p = 0,037$ ). Já a hidrólise de ATP se apresentou diminuída, e também com significância estatística ( $p = 0,0008$ ). A hidrólise de ADP também seguiu o padrão de diminuição, no entanto, não se notou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Pré e Pós ( $p = 0,241$ ). A atividade da CD73 na hidrólise de AMP também apresentou redução no grupo Pós, rejeitando hipótese nula ( $p = 0,013$ ). Por fim, na atividade da ADA foi percebido um aumento que também se provou estatisticamente significativo ( $p = 0,001$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o exercício físico impacta no sistema purinérgico em pacientes de DRC, o qual pode ter uma atuação tanto pró-inflamatória, através de receptores de ATP como os P2X, quanto anti-inflamatória, por meio de receptores de adenosina da família P1 (BURNSTOCK; NOVAK, 2013).

A Figura 2A evidencia um aumento no nível de ATP extracelular, que pode ter causas variadas, incluindo lesão tecidual decorrente do exercício físico. A diminuição da CD39 — responsável pela hidrólise de ATP e ADP — associada à maior quantidade sérica de ATP contribui para um ambiente pró-inflamatório, dada a ação deste nos receptores P2X. Este perfil pró-inflamatório fica ainda mais claro quando correlacionada com a diminuição da atividade da CD73 na hidrólise de AMP, formando menos adenosina com o ATP disponível (BURNSTOCK; NOVAK, 2013).

Tratando-se mais especificamente da atividade da enzima CD73, sua diminuição também pode estar intimamente relacionada à diminuição da atividade da CD39. Ora, uma menor hidrólise de ATP e ADP indica um menor nível extracelular de AMP, de forma que a CD73 tenha menos substrato livre para agir sobre. Ainda assim, a diminuição da sua atividade está relacionada a menos adenosina livre e, logo, a um meio pró-inflamatório (LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019).

A ADA, por sua vez, é responsável pela conversão de adenosina em inosina, e sua atividade aumentada, conforme evidenciada pela Figura 2E, está ligada, então, a uma diminuição dos índices de adenosina, que tem uma função anti-inflamatória (ZHULAI *et al.*, 2022). Deste modo, a maior atividade da ADA indica uma menor quantidade de adenosina extracelular e, conseqüentemente, um aumento no perfil inflamatório pós intervenção.

Quanto ao exercício físico, a literatura traz uma crescente quantidade de estudos que indicam a importância e eficácia terapêutica deste (METSIOS; MOE; KITAS, 2020), especialmente a longo prazo nos pacientes de DRC (VILLANEGO *et al.*, 2020). No entanto, os resultados obtidos evidenciaram que a prática de exercício físico por pacientes de DRC provocou um aumento geral e consistente no quadro inflamatório destes. Contudo, ainda que o exercício físico esteja associado a uma diminuição na inflamação, é possível que ele cause uma sobrecarga inflamatória a curto prazo (METSIOS; MOE; KITAS, 2020), e a janela de

transição entre curto e longo prazo ainda é incerta, deixando em aberto onde se encaixaria o protocolo de 12 semanas realizado.

Mais além, o protocolo de exercícios realizado se inclui na categoria de exercício físico resistido de intensidade moderada. Ao ser aplicado em pacientes com DRC, demonstrou ser um potencial agente pró-inflamatório, inclusive, causando diminuição na função física (WATSON et al., 2021). Sendo assim, é promissor considerar a realização de exercícios físicos de leve intensidade nesse grupo de pacientes. Um estudo mostrou que a prática de atividade física resistida leve apresenta uma melhora na longevidade e qualidade de vida pacientes com DRC, não obstante pela prática de atividade física em si, mas também por gerar redução do tempo gasto realizando atividades sedentárias, o que habitualmente ocupa a maior parte do tempo na maioria dos pacientes com DRC. Ora, adicionando atividades físicas de leve intensidade na rotina desses pacientes, é intrínseca a redução de tempo gasto com atividades sedentárias. (BEDDU et al., 2015).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O exercício físico é uma conhecida e importante opção terapêutica complementar para pacientes com doenças crônicas, especialmente em pacientes com DRC. Os resultados após a intervenção demonstraram que a prática de exercício físico de moderada intensidade nesses pacientes se mostrou uma importante influência nos marcadores bioquímicos de inflamação do sistema purinérgico em linfócitos, visto que foram identificadas alterações estatisticamente significativas em 4 dos 5 marcadores avaliados. Todavia, foi encontrado um aumento no nível de inflamação desses pacientes, que pode ser relacionado com o caráter de moderada intensidade do protocolo de exercício, bem como com a duração deste.

Em conclusão, é certo afirmar que mais estudos na área são necessários para fornecer uma visão mais ampla e clara do efeito a curto e longo prazo, e da diferença entre exercício físico de baixa e moderada intensidade no sistema purinérgico, buscando, assim, novas opções terapêuticas para pacientes com DRC.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOIKE D T, *et al.* Impact of home-based aerobic exercise on the physical capacity of overweight patients with chronic kidney disease. **Int Urol Nephrol**. v.47, n.2, p.359-67, 2015.

AMMIRATI, A. L. Chronic Kidney Disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, n. 1, p. 03-09, 2020.

BEDDHU, Srinivasan; WEI, Guo; MARCUS, Robin L.; CHONCHOL, Michel; GREENE, Tom. Light-Intensity Physical Activities and Mortality in the United States General Population and CKD Subpopulation. **Clinical Journal Of The American Society Of Nephrology**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1145-1153, jul. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.2215/cjn.08410814>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes Clínicas para o Cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único de Saúde. Brasília -DF, 2014.

BURNSTOCK, G.; NOVAK, I. Purinergic signalling and diabetes. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 3, p. 307–324, 3 abr. 2013.

CARNEY, E. F. The impact of chronic kidney disease on global health. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 5, p. 251–251, 1 maio 2020.

CHEEMA B.S., *et al.* Progressive exercise for anabolism in kidney disease (PEAK): a randomized, controlled trial of resistance training during hemodialysis. **J Am Soc Nephrol**. v.18, n.5, p. 1594-1601, 2007.

DA SILVA, G. B. *et al.* High levels of extracellular ATP lead to different inflammatory responses in COVID-19 patients according to the severity. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 100, n. 4, p. 645–663, 2022.

DÍAZ, B. B. *et al.* Myokines, physical activity, insulin resistance and autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 203, p.1-5, 2018.

EBERT, T. *et al.* Inflammation and Premature Ageing in Chronic Kidney Disease. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 227, 1 abr. 2020.

GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 395, n. 10225, p. 709–733, fev. 2020.

GESSE, S. et al. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1-2, p. 109–116, 16 jan. 2007.

Giusti, G. (1974) Adenosine Deaminase. In: Bergmeyer, H.U., Ed., *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd Edition, Academic Press, New York, 1092-1099.

Giuliani A; Sarti A.C; Di Virgilio F. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. **Front Pharmacol**. 2021;11:619458. Published 2021 Feb 3. doi:10.3389/fphar.2020.619458;

JOHANSEN, K.L. *et al.* Effects of resistance exercise training and nandrolone decanoate on body composition and muscle function among patients who receive hemodialysis: A randomized, controlled trial. **J Am Soc Nephrol**; v.17, n.8, p.2307-2314, 2006.

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

LINDEN, Joel; KOCH-NOLTE, Friedrich; DAHL, Gerhard. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. **Annual Review Of Immunology**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 325-347, 26 abr. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052406>.

LU, CF. *et al.* “Serum adenosine deaminase levels are associated with diabetic kidney disease in type 2 diabetic patients.” **Endocrine connections** vol. 10,9 973-979. 24 Aug. 2021, doi:10.1530/EC-21-0306

MAGHERINI, F. *et al.* Oxidative stress in exercise training: the involvement of inflammation and peripheral signals. **Free Radical Research**, v. 53, n. 11–12, p. 1155–1165, 2019.

MENZIES, Robert I.; TAM, Frederick W.; UNWIN, Robert J.; BAILEY, Matthew A.. Purinergic signaling in kidney disease. **Kidney International**, v. 91, n. 2, p. 315-323, 2017.

METSIOS, G. S.; MOE, R. H.; KITAS, G. D. Exercise and inflammation. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, p. 101504, 2 abr. 2020.

MINOR, Marquet *et al.* “Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73).” *American journal of physiology. Cell physiology* vol. 317,6 (2019): C1079-C1092. doi:10.1152/ajpcell.00285.2019

MORENO, E. *et al.* Molecular Evidence of Adenosine Deaminase Linking Adenosine A2A Receptor and CD26 Proteins. **Front Pharmacol.** 2018;9:106. Published 2018 Feb 15. doi:10.3389/fphar.2018.00106

NERBASS, F. B. *et al.* Brazilian Dialysis Survey 2020. **Brazilian Journal of Nephrology**, 23 fev. 2022.

PERLMAN, R. L. *et al.* Quality of life in Chronic Kidney Disease (CKD): A cross-sectional analysis in the Renal Research Institute-CKD study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 45, n. 4, p. 658–666, 1 abr. 2005.

PRZBYLA, T., SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M., PAWELCZYK, T. Purinergic signaling in B cells. *Acta Biochim Pol.* 2018;65(1):1-7. doi:10.18388/abp.2017\_1588r

SILVA, Saulo Freitas da; PEREIRA, Augusto Alves; SILVA, Weliton Aparecido Honorato da; SIMÔES, Roger; BARROS NETO, José de Resende. Physical therapy during hemodialyse in patients with chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 3, p. 170-176, 2013.

SIMIONI, C. *et al.* Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. **Oncotarget**, v. 9, n. 24, p. 17181-17198, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Hemodiálise - SBN. Disponível em: <<https://www.sbn.org.br/orientacoes-e-tratamentos/tratamentos/hemodialise/>>. Acesso em: 11 jun 2023.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Dia Mundial do Rim. Disponível em: <<https://www.sbn.org.br/dia-mundial-do-rim/dia-mundial-do-rim-2022/>>. Acesso em: 11 jun 2023.

THIRUPATHI, A.; PINHO, R.A.; CHANG, Y.Z. Physical exercise: an inducer of positive oxidative stress in skeletal muscle aging. **Life Sciences**, v. 252, n. 2020, p. 1-11, 2020.

VILLANEGO, F. *et al.* Impact of physical exercise in patients with chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. *Nefrologia* vol. 40,3. 2020. 237-252. doi:10.1016/j.nefro.2020.01.002

WATSON, Emma L; A BAKER, Luke; WILKINSON, Tom J; GOULD, Doug W; XENOPHONTOS, Soteris; GRAHAM-BROWN, Matthew; MAJOR, Rupert W; ASHFORD, Robert u; VIANA, Joao L; SMITH, Alice C. Inflammation and physical dysfunction: responses to moderate intensity exercise in chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 860-868, 22 nov. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfab333>.

WEBSTER, A. C. *et al.* Chronic Kidney Disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10075, p. 1238–1252, mar. 2017.

WILKINSON, T. J.; SHUR, N. F.; SMITH, A. C. “Exercise as medicine” in chronic kidney disease. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 26, n. 8, p. 985–988, 1 ago. 2016.

YUAN, Xiaoyi; FERRARI, Davide; MILLS, Tingting; WANG, Yanyu; CZOPIK, Agnieszka; DOURSOUT, Marie-Francoise; EVANS, Scott E.; IDZKO, Marco; ELTZSCHIG, Holger K.. Editorial: purinergic signaling and inflammation. **Frontiers In Immunology**, v. 12, n. 5, p. 1-4, 2021.

ZARGARI, Mehryar; SEDIGHI, Omid. Influence of Hemodialysis on Lipid Peroxidation, Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Capacity in Chronic Renal Failure Patients. **Nephro-Urology Monthly**, v. 7, n. 4, p. 1-5, 2015.

ZHULAI, Galina; OLEINIK, Eugenia; SHIBAEV, Mikhail; IGNATEV, Kirill. Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer. **Biomolecules**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 418, 8 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom12030418>.