

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

Dissertação



**Efeito do exercício passivo em parâmetros bioquímicos e na atividade
de ectonucleotidases em plaquetas de pacientes com Acidente Vascular
Cerebral internados em Unidade de Terapia Intensiva**

Elise Beck da Motta

Pelotas, 2014

Elise Beck da Motta

**Efeito do exercício passivo em parâmetros bioquímicos e na atividade
de ectonucleotidases em plaquetas de pacientes com Acidente Vascular
Cerebral internados em Unidade de Terapia Intensiva**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial a obtenção do título de
Mestre em Ciências (Bioquímica e
Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. William Peres
Coorientadora: Profa. Dra. Roselia M. Spanevello

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaggetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M917e Motta, Elise Beck da
Efeito do exercício passivo em parâmetros bioquímicos e na atividade de ectonucleotidases em plaquetas de pacientes com Acidente Vascular Cerebral internados em Unidade de Terapia Intensiva / Elise Beck da Motta. – 60f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2014. – Orientador William Peres ; co-orientador Roselia Maria Spanevello.

1. Exercício passivo. 2. Plaquetas. 3. Acidente Vascular Cerebral. 4. Ectonucleotidases. I.Peres, William. II.Spanevello, Roselia Maria. III.Título.

CDD: 574.1925

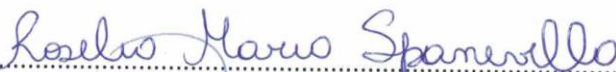
Elise Beck da Motta

Efeito do exercício passivo em parâmetros bioquímicos e na atividade de ectonucleotidases em plaquetas de pacientes com Acidente Vascular Cerebral internados em Unidade de Terapia Intensiva

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17/02/2014

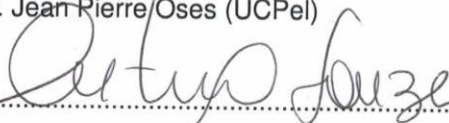
Banca examinadora:



Profa. Dra. Roselia Maria Spanevello (Co-orientadora) (UFPel)



Prof.Dr. Jean Pierre Oses (UCPel)



Profa.Dra. Izabel Cristina Custodio de Souza (UFPel)

Dedico este trabalho a minha mãe, Sonia, e meu irmão, Frederico, por todas as oportunidades que me proporcionaram de estudar, pelo incentivo e apoio. E ao meu noivo, Gabriel, pelo incansável apoio e carinho.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a minha mãe, Sonia, e irmão, Frederico, pelo carinho e apoio incondicional. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Amo vocês.

Ao meu noivo, Gabriel, pelo apoio, atenção e companheirismo durante todo este período.

A Profa. Dra Roselia, meu agradecimento especial, que me acolheu, me incentivou e me ensinou. Obrigada por toda atenção e paciência durante este período. E, obrigada, acima de tudo, por me orientar.

Ao Prof Dr. William Peres e Prof Dr Rafael Orcy, por acreditarem em mim colocando este trabalho em minhas mãos.

As Professoras Elissandra e Francieli, por me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço também, ao grupo BIOFISC, que me auxiliaram durante o período de coletas de materiais e dados dentro do Hospital Universitário São Francisco de Paula.

Agradeço ao grupo NEUROCAN pela ajuda durante as análises e a disponibilidade do laboratório.

Agradeço, principalmente ao Felipe, Jéssica, Gabriela e Mauricio por me acompanharem durante as incansáveis incubações, sempre com bom humor e força de vontade.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção pelos ensinamentos.

A UFPEL pela estrutura onde eu tive a oportunidade de realizar meus estudos.

Agradeço a toda equipe do Hospital Universitário São Francisco de Paula e Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC), por permitir que este trabalho se realizasse e pelo espaço para armazenamento e preparo das amostras.

Aos enfermeiros, fisioterapeutas e toda equipe da UTI do Hospital Universitário São Francisco de Paula, pela atenção conosco e com os pacientes.

Fisioterapeuta Marina, que realizou os procedimentos de mobilização passiva nos pacientes sempre com muito profissionalismo.

Agradeço, com todo o carinho, a todos os pacientes e familiares que sem eles, com certeza, este trabalho não teria sido desenvolvido. Obrigada pela confiança.

Agradeço a os auxílios financeiros recebidos para a execução deste projeto.

“A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou ainda sobre aquilo que todo mundo vê”. (Arthur Schopenhauer)

Resumo

MOTTA, Elise Beck. **Efeito do exercício passivo em parâmetros bioquímicos e na atividade de ectonucleotidases em plaquetas de pacientes com Acidente Vascular Cerebral internados em Unidade de Terapia Intensiva.** 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de ectonucleotidases e parâmetros bioquímicos em plaquetas e soro de pacientes com AVC internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) que foram submetidos a um protocolo de exercício passivo. A população estudada foi composta por 18 pacientes com AVC e 18 indivíduos saudáveis como grupo controle. A mobilização passiva foi realizada em pacientes com AVC durante sete dias, o sangue foi coletado no primeiro e no sétimo dia. Em cada dia, o sangue foi coletado antes da sessão de exercício (tempo 0), imediatamente após a sessão de exercício (tempo de 20) e 40 minutos após a intervenção passiva (tempo 60). O sangue foi utilizado para a preparação de plaquetas e soro. Em plaquetas foi avaliada a atividade das enzimas NTPDase, 5 - nucleotidase e adenosina deaminase (ADA) e em soro parâmetros bioquímicos como a uréia, ácido úrico, colesterol, triglicérides, AST, ALT, creatinina e proteína C-reativa (PCR). Os resultados demonstraram um aumento da hidrólise de ATP e uma diminuição na hidrólise de ADP e AMP em plaquetas dos pacientes com AVC, quando comparado com o grupo controle ($P \leq 0,05$). Não foram observadas alterações na atividade da ADA. Após sete dias de aplicação do exercício passivo foi observado um aumento na atividade de NTPDase utilizando ADP como substrato. Nenhuma mudança foi observada na hidrólise de ATP e AMP. Em relação à ADA foi observado um aumento na atividade dessa enzima em plaquetas depois de sete dias apenas no tempo de 20. Em relação aos parâmetros bioquímicos nossos resultados mostraram uma diminuição significativa apenas nos níveis de ALT e de PCR no soro de pacientes com AVC após sete dias de exercício passivo. Estes resultados sugerem que as alterações nas atividades de ectonucleotidases em plaquetas podem contribuir para as complicações vasculares observadas no AVC e o exercício passivo pode ser importante nos mecanismos de trombose, porque influencia na hidrólise do ADP, o principal agonista de agregação de plaquetas.

Palavras-chave: exercício passivo, plaquetas, acidente vascular cerebral, ectonucleotidases

Abstract

MOTTA, Elise Beck. **Effect of passive exercise on biochemical parameters and ectonucleotidases activity in platelets of patients with stroke admitted to the Intensive Care Unit.** 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Platelet activation and aggregation are critical in the pathogenesis of stroke. The aim of this study was evaluated the ectonucleotidase activities and biochemical parameters in platelets and serum from stroke patients hospitalized in the unit care intensive. The population studied consisted of the 18 cerebral stroke patients and 18 healthy individuals as control group. Passive mobilization was performed in stroke patients during seven days and the blood was collected in the first and seventh day. In each day the blood was collected before exercise session (time 0) immediately after exercise session (time 20) and 40 minutes after the application of passive intervention (time 60). The blood was used for platelet and serum preparation. In platelets was evaluated the NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) activity an in serum biochemical parameters such as urea, uric acid, cholesterol, triglycerides, AST, ALT, creatinine and C-reactive protein. The results demonstrated an increase in the ATP hydrolysis and a decrease in the ADP and AMP hydrolysis in platelets from stroke patients when compared to control group ($P \leq 0.05$). No alterations were observed in ADA activity. After seven days the exercise passive was observed an increase in the NTPDase activity using ADP as substrate. No change was observed in the ATP and AMP hydrolysis. In relation the ADA was observed an increase in this enzyme activity in platelets after seven days the passive exercise only in the time 20. In relation the biochemical parameters our results showed a significant decreased only in the ALT and levels of C-reactive protein in serum of stroke patients after seven days of passive exercise. These results suggest that ectonucleotidase activities alterations in the platelet may contribute to vascular complications in the stroke and that passive exercise can be important in thrombosis mechanisms because it increase the ADP hydrolysis, the main agonist of platelet aggregation.

Key words: passive exercise, platelets, stroke, ectonucleotidases

Lista de Figuras

Figura 1	Ilustração do AVCi e AVCh.....	20
Figura 2	Mecanismos que levam à formação de um tampão de plaquetário ou um trombo.....	25
Figura 3	Ilustração dos receptores de membrana para ATP, ADP e adenosina.....	27
Figura 4	Subtipos da enzima NTPDase já identificadas com sua localização celular e domínios transmembrana.....	29

Lista de abreviaturas

- A₁₋₃** - Receptores para Adenosina
- AC** – Adenil Ciclase
- ACR** – Regiões Conservadas da Apirase
- ADA** – Adenosina deaminase
- ADP** – Difosfato de adenosina
- ALT** – Alanina aminotransferase
- AMP** – Monofosfato de adenosina
- AMPc** – Monofosfato de Adenosina Ciclico
- AST** –Aspartato aminotransferase
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- AVC** – Acidente Vascular Cerebral
- AVCh** – Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico
- AVCi** – Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
- Ca⁺²** - íon Cálcio
- GPI** – Glicosil Fosfatidil-inositol
- HAS** – Hipertensão Arterial Sistêmica
- Mg²⁺** - íon Magnésio
- NTPDase** – Nucleosídeo Trifosfato Hidrolase
- UTI** – Unidade de Terapia Intensiva
- P2Y₁₋₁₂** – Receptores para ATP e ADP
- P2X₁₋₇** – Receptores para ATP
- SUS** – Sistema Único de Saúde
- SNC** – Sistema Nervoso Central

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Objetivos.....	18
	Objetivo Geral.....	18
	Objetivos Específicos.....	18
3	Revisão de Literatura.....	19
	Acidente Vascular Cerebral (AVC).....	19
	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi).....	19
	Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCh).....	20
	Fatores de Risco	22
	Tratamento	23
	Mobilização passiva.....	24
	Plaquetas	25
	Sinalização Purinérgica.....	27
	Ectonucleotidases	28
	NTPDases	29
	5'-nucleotidase	30
	Adenosina deaminase (ADA)	31
4	Manuscrito.....	33
5	Conclusões.....	54
6	Referências.....	55

1 Introdução

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) representa a terceira maior causa de morte no mundo e é responsável por aproximadamente 80% das internações em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Sistema Único de Saúde (SUS) (TRÓCOLI e FURTADO, 2008). Pacientes internados em UTI, devido ao fato de estarem em repouso no leito, têm um risco maior de sequelas neuromusculares como fraqueza, mobilidade reduzida, contratura dos tecidos moles e redução na amplitude de movimento (GOSSELINK, 2008). Essas sequelas podem ter um impacto importante na capacidade funcional e na qualidade de vida dos pacientes. Assim, medidas para minimizar ou prevenir as complicações neuromusculares de pacientes de UTI tornaram-se particularmente importantes para a prevenção e a diminuição dessas complicações com intervenções que incluem exercícios de fortalecimento e exercício passivos dos membros (SILVA et al., 2013).

O exercício passivo faz parte do atendimento oferecido aos pacientes em UTI de alguns hospitais com o objetivo de evitar complicações respiratórias, motoras e vasculares (JERRE et al., 2007). Este método é muito empregado em pacientes com AVC, pois é a patologia que mais causa imobilidade em pessoas idosas. O imobilismo pode levar ao desenvolvimento de muitas complicações, como úlceras de decúbito, perda de força muscular, osteoporose e tromboembolismo (SILVA et al., 2013).

O acidente vascular cerebral pode ser classificado em dois principais grupos: isquêmico (AVCi) e hemorrágico (AVCh), os quais apresentam diferenças na forma como o fluxo sanguíneo cerebral é interrompido. O AVCi é característico de trombo ou embolo obstruindo a passagem de sangue para os tecidos cerebrais, já no AVCh é caracterizado pelo rompimento de um vaso sanguíneo, também levando a uma diminuição do aporte de glicose e oxigênio para os tecidos cerebrais (CHAVES et al., 2000). O AVCi é mais prevalente com 86% dos casos e o AVCh com 14% dos casos (SHIBER et al., 2010).

As plaquetas estão relacionadas com a fisiopatologia do acidente vascular cerebral, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos (CEVIK et al., 2013). As plaquetas sanguíneas desempenham um papel crucial na manutenção da integridade vascular através de mecanismos de adesão, agregação, coagulação e formação de trombos nos vasos sanguíneos danificados (MARCUS e SAFIER, 1993; NI e FREEDMAN, 2003).

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados que possuem um papel essencial na hemostasia. Durante a circulação sanguínea normal, as plaquetas circulam em um estado de repouso como pequenos discos. Quando há lesão vascular, as plaquetas são ativadas, modificando a sua forma e agregam-se rapidamente a parede do vaso, a fim de recuperar o vaso lesado (GRESELE et al., 2008). As plaquetas possuem um grande número de moléculas biologicamente ativas em seu interior. Possuem armazenadas em grânulos, proteínas essenciais para adesão nas células vasculares e nucleotídeos que são responsáveis pelo recrutamento plaquetário (GRESELE et al., 2008).

A agregação plaquetária está relacionada com a liberação de nucleotídeos de adenina como o ATP e ADP para o meio extracelular pelas plaquetas ativadas. O ADP, por sua vez, é responsável por intensificar a agregação plaquetária atuando no recrutamento de plaquetas através da ação em receptores do tipo P2Y, que estão situados nas membranas das plaquetas, via proteína Gq (P2Y1) e proteína Gi (P2Y12) (STAFFORD et al., 2003; ANDRE et al., 2003). A adenosina, o produto de degradação destes nucleotídeos, possui ação contrária ao ADP, sendo considerada uma importante molécula com ações antiagregantes e anti-inflamatória atuando em receptores do tipo A_{2A} e A_{2B} nas membranas das plaquetas (HASKÓ e CROSTEIN, 2004; HILLARY et al., 2011). A ativação dos receptores A_{2A} e subtipos de A_{2B} nas plaquetas pela adenosina causa inibição do receptor P2Y1 nessas células (SOUZA et al., 2012). O receptor P2Y1, que liga preferencialmente o ADP, é responsável pelo aumento intracelular dos níveis de Ca⁺⁺ e ocasiona a liberação de ADP para o meio extracelular (HILLARY et al., 2011).

A sinalização induzida pelo ADP e adenosina em plaquetas é regulada por uma cascata enzimática localizada na membrana das plaquetas (ROBSON et al., 2006). As principais enzimas que são responsáveis por manter as concentrações normais de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina no meio extracelular são a NTPDase, 5-nucleotidase e adenosina deaminase (ADA). A NTPDase hidrolisa ATP

e ADP até AMP, o qual é subsequentemente degradado a adenosina pela ação da 5'-nucleotidase. A adenosina gerada é convertida em inosina pela ação da ADA (CRISTALLI et al., 2001). Estas enzimas são importantemente empregadas para a manutenção da homeostase vascular. A NTPDase pode ser encontrada na superfície de plaquetas, linfócitos, células endoteliais e na forma solúvel e é uma enzima importante para a inibição da agregação plaquetária pois hidrolisa ADP, que é o principal agonista dos mecanismos de agregação plaquetária (HANDA e GUIDOTTI, 1996). NTPDase e 5'-nucleotidase possuem ação importante no sistema vascular devido a hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP que são considerados trombolíticos e pró-inflamatórios e formação de adenosina. O aumento da atividade da ADA está relacionado a estados inflamatórios e trombóticos, pois esta atua hidrolisando adenosina que é um agente anti-trombótico, antiinflamatório e vasodilatador no sistema vascular (KAWASHIMA et al., 2000).

Senso assim, o objetivo do presente trabalho é verificar a influência do exercício passivo em parâmetros bioquímicos bem como na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase em plaquetas de pacientes diagnosticados com AVC internados em UTI.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar parâmetros bioquímicos séricos e a atividade de ectonucleotidases em plaquetas de pacientes com Acidente Vascular Cerebral (AVC) internados em UTI e submetidos a um protocolo de exercício passivo.

Objetivos Específicos

- Determinar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase em plaquetas de pacientes com AVC e indivíduos controles.
- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase em plaquetas de pacientes com AVC internados em UTI antes e após sete dias de exercício passivo.
- Avaliar parâmetros bioquímicos como colesterol total, creatinina, ácido úrico, triglicerídeos, ureia, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em soro de pacientes com AVC internados em UTI antes e após sete dias de exercício passivo.
- Avaliar os níveis de proteína C reativa ultrasensível em pacientes com AVC internados em UTI antes e após sete dias de exercício passivo.

3 Revisão de Literatura

Acidente Vascular Cerebral (AVC)

O sistema circulatório é responsável por garantir a chegada de nutrientes e de oxigênio a todos os órgãos, e a remoção de substâncias tóxicas decorrentes do metabolismo celular. No encéfalo, o aporte sanguíneo chega através das artérias vertebrais e as artérias carótidas internas que se comunicam através do polígono de Willis. O encéfalo requer um contínuo suprimento de glicose e oxigênio para manter suas funções normais (DINARGL et al., 1999).

O acidente vascular cerebral (AVC) é classificado como uma síndrome clínica com desenvolvimento rápido de sinais clínicos de perturbação focal (determinada região cerebral) ou global (toda região cerebral) da função cerebral, com possível origem vascular e com mais de 24 horas de duração que pode ser de natureza hemorrágica ou isquêmica (ZEMKE et al., 2004; ARAUJO et al., 2008) (Figura 1).

O AVC é altamente prevalente sendo a segunda causa de morte no mundo e terceira em países em desenvolvimento. Cerca de 86% dos AVCs são de origem isquêmica e 14% de hemorragia cerebral (SHIBER et al., 2010). Os sobreviventes de AVC têm um alto risco de complicações vasculares subsequentes e de novos AVCs. Este é um problema de importância social, já que, atualmente, há um número elevado de sobreviventes dessa doença cerebrovascular (ALEXANDROVA e BOCHEV, 2005).

As manifestações clínicas presentes no AVC envolvem comumente alterações motoras e sensitivas, prejudicando a função física. Déficits nas funções cognitivas, perceptivas, visuais e emocionais podem estar associados ao AVC e a severidade do quadro clínico dependerá da área e extensão da lesão (VALENTE et al., 2006).

Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCi)

O AVCi é caracterizado pelo bloqueio do fluxo sanguíneo ocasionado por embolo ou trombo, resultando no fornecimento deficiente de nutrientes que são essenciais para o funcionamento cerebral (CHAVES et al., 2000; ZEMKE et al., 2004) (Fig. 1).

Os principais mecanismos que levam à morte celular durante a lesão cerebral isquêmica é a excitotoxicidade juntamente com o desequilíbrio iônico e o estresse oxidativo (LO et al., 2003). A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral concomitante com a falha do processo celular normal durante a isquemia desencadeia uma cascata de eventos moleculares, os quais são responsáveis pelo acúmulo e produção de substâncias tóxicas, como a liberação exacerbada do neurotransmissor excitatório glutamato e acúmulo de cálcio intracelular, que podem levar a morte celular (LO et al., 2003). A retomada da circulação sanguínea (reperfusão) pode contribuir, ainda mais, para o dano neuronal através da estimulação da produção de radicais livres devido à alta demanda de oxigênio neste período que podem danificar estruturas celulares (TAYLOR et al., 1995).

Dentre os possíveis e mais importantes mecanismos envolvidos no AVCi, as principais causas são: aterotrombose de pequenos vasos e desordens cardiovasculares (CHAVES et al., 2000; ROWLAND e PEDLEY, 2011). A aterosclerose é um dos principais fatores para desenvolvimento de trombos. Estudos demonstram que a inflamação está intimamente ligada à formação, progressão e ruptura de placa aterosclerótica, portanto marcador inflamatório como Proteína C Reativa (PCR) deve ser acompanhado (LIBBY et al., 2002; 2010). As doenças cardiovasculares podem proporcionar o desenvolvimento da fibrilação atrial, que é uma patologia que, se não monitorada, pode levar a formação de coágulos que possivelmente podem vir obstruir um vaso sanguíneo cerebral (CHAVES et al., 2000).

Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCh)

O Acidente vascular cerebral hemorrágico é caracterizado principalmente por ruptura de um vaso sanguíneo cerebral (Figura 1). O AVCh inclui principalmente hemorragias intracerebrais e as hemorragias subaracnóideas. Nestes casos, os sintomas ocorrem por compressão de estruturas nervosas e/ou por aumento da pressão intracraniana (ARAUJO et al., 2008).

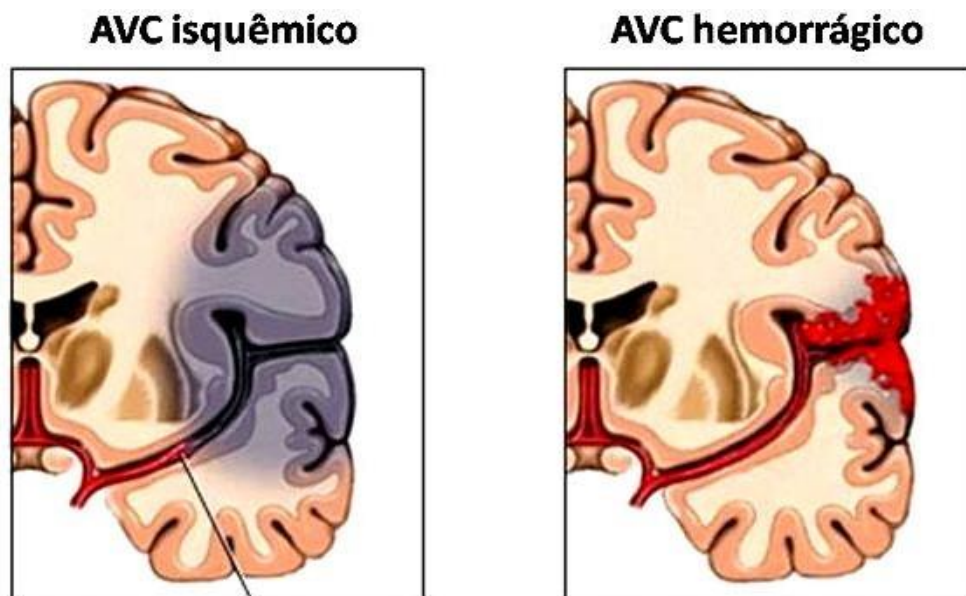


Figura 1. Ilustração do AVCi e AVCh. AVCi - há interrupção da passagem sanguínea causando isquemia em uma determinada região cerebral. AVCh há extravasamento de sangue na cavidade cerebral. Fonte: MORAES, 2014.

O AVC hemorrágico ocorre como uma lesão expansiva aguda, levando à destruição, compressão e deslocamento de estruturas encefálicas. Após este fato poderá ocorrer uma lesão secundária isquêmica, ao redor do hematoma, podendo se originar de substâncias vasoconstritoras, da compressão mecânica direta sobre os vasos e aumento da pressão intracraniana com consequente diminuição do fluxo sanguíneo cerebral causando assim edema cerebral local e morte celular programada de células neuronais e gliais devido a apoptose e ruptura da membrana hematoencefálica (ROWLAND e PEDLEY, 2011).

A hemorragia cerebral pode ocorrer de várias formas, sendo os principais o rompimento de um aneurisma cerebral e um ponto fraco ou fino na parede de uma artéria, e são agravados aumento da pressão arterial que leva a ruptura. (ARAUJO et al., 2008; ROWLAND e PEDLEY, 2011).

As hemorragias intracerebrais são mais comumente causadas por hipertensão prolongada, mas podem ocorrer na angiopatia amiloide, malformações arteriovenosas, vasculites, tumores cerebrais primários e metastáticos, entre outras (OLIVEIRA e ANDRADE, 2001; ROWLAND e PEDLEY, 2011).

A hemorragia subaracnóidea é uma emergência médica com taxas elevadas de morbimortalidade. A causa mais comum é a ruptura de um aneurisma cerebral. Classicamente se manifesta com cefaleia aguda, de início abrupto, súbito e de forte

intensidade desde o início, podendo apresentar vômitos, rigidez de nuca e alteração no nível de consciência (ROWLAND e PEDLEY, 2011).

Fatores de Risco

Considerando o AVC um estado de emergência, a identificação e tratamento dos principais fatores de risco podem desempenhar um importante papel na sua prevenção (TRÓCOLI E FURTADO, 2008).

O AVC acomete mais homens e afrodescendentes (ZETOLA et al., 2001; OLIVEIRA e ANDRADE, 2001). Os fatores de risco podem ser classificados como não modificáveis e modificáveis. Dentro dos não modificáveis destacam-se o gênero, idade, descendência e hereditariedade enquanto os fatores modificáveis incluem a hipercolesterolemia, diabetes mellitus, tabagismo, sedentarismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade, consumo de álcool e o estresse. Estes fatores, associados ou não, contribuem para o desenvolvimento do AVC (CUBRILO-TUREK, 2004; GRYSIEWICS et al., 2008; ROWLAND e PEDLEY, 2011)

Em relação aos fatores modificáveis, o diabetes mellitus constitui forte risco para o desenvolvimento de doença vascular cerebral, por interagir com outros fatores, como hipertensão arterial sistêmica e hiperlipidemia, os quais, quando associados, potencializam o risco (CHAVES et al., 2000).

A HAS eleva em até quatro vezes o risco do desenvolvimento de AVC, (ARAUJO et al, 2008). Está presente em 60% a 70% da população com idade superior a 60 anos, aumentando o risco de doença cardiovascular, cerebrovascular e renal (OLIVEIRA e ANDRADE, 2001; CUBRILO-TUREK, 2004).

No Brasil, a hipertensão arterial é um dos fatores de risco mais importante para doença cerebrovascular, cuja estimativa é maior para pessoas acima dos 50 anos. Aproximadamente 85% dos pacientes diagnosticados com AVC são acometidos por HAS (CHAVES, 2000).

Hipertensão crônica mal controlada causa uma vasculopatia de pequenos vasos caracterizada por fragmentação, degeneração e ruptura final das artérias do encéfalo (ROWLAND e PEDLEY., 2011).

O consumo de bebidas alcoólicas é um fator de risco tanto para AVCi e AVCh, pois o álcool pode afetar a função plaquetária e promover fragilidade vascular (ROWLAND e PEDLEY, 2011).

Tratamento

As terapias para prevenção e tratamento de AVCs visam evitar um primeiro AVC (prevenção primária), obter uma recuperação funcional após o AVC e impedir recorrências dessa patologia. As medidas específicas para tratamento e prevenção dependem dos fatores de risco e do mecanismo de desenvolvimento do AVC no paciente (ROWLAND e PEDLEY, 2011).

Na prevenção primária dos AVCs a intervenção medicamentosa se dá para minimizar os fatores de risco, por exemplo: pacientes hipertensos o tratamento são anti-hipertensivos; infarto do miocárdio o tratamento são inibidores da HMG-CoA redutase; a fibrilação atrial é tratada com a varfarina (OLIVEIRA e ANDRADE, 2001; ROWLAND e PEDLEY, 2011).

O tratamento para recuperação do AVC depende da sua causa. Para AVCi dentro de 3h do início dos sintomas e nenhuma evidência hemorrágica na Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética a droga trombolítica ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA) é bastante utilizada. Pacientes com evidências de AVC por fatores cardioembólicos o medicamento de uso é a varfarina (ROWLAND e PEDLEY, 2011). A terapia antiplaquetária é também indicada para pacientes estes pacientes sendo os medicamentos mais usados o ácido acetilsalicílico, dipiridamol, ticlopidina e bissulfato de clopidogrel (RIBEIRO, 2003; ROWLAND e PEDLEY, 2011).

Para hemorragia intracerebral a principal intervenção é a cirúrgica, devido a necessidade de evacuar o hematoma seguido do uso de drogas pró-trombóticas para reduzir a expansão e limitar as lesões cerebrais. Em hemorragias subaracnóides, o clipamento do aneurisma é um dos procedimentos definitivos (ROWLAND e PEDLEY, 2011).

Após o AVC, juntamente com tratamento medicamentoso é necessária à reabilitação com fisioterapia a fim de melhorar a qualidade de vida destes pacientes, já que AVC deixa grandes sequelas musculares. Procedimentos de fisioterapia incluem exercício passivo e ativo, dependendo da gravidade e condicionamento do paciente (TEIXEIRA-SALMELA et al., 2005; SILVA et al., 2013).

Mobilização passiva

O processo de conduta fisioterapêutica objetiva maximizar a capacidade funcional e evitar complicações secundárias, possibilitando ao paciente reassumir todos os aspectos da rotineiramente antes realizados. A aplicação do exercício passivo em pacientes em recuperação de AVC vem sendo estudada a fim de evitar complicações respiratórias, vasculares e musculares de pacientes acamados, auxiliando, assim, na recuperação e qualidade de vida destes pacientes (SILVA, et al., 2013).

Os movimentos baseiam-se no limite da amplitude de movimento de cada membro e é produzido por uma força externa, seja com o auxílio de um aparelho ou outra pessoa, não havendo contração muscular voluntária (REBELO e JUNIOR, 2010).

A fraqueza muscular é uma das alterações mais significativas presentes após o AVC e um fator limitante para a recuperação funcional (TEIXEIRA-SALMELA et al., 2005 e TRÓCOLI e FURTADO, 2008). Os pacientes com AVC perdem algumas funções, mas podem recupera-las em parte ou totalmente por recuperação neurológica anatômica e fisiológica, pela redução de edema cerebral, desenvolvimento de novas vias e plasticidade neuronal; ou por mecanismos adaptativos, que ocorre através do aprendizado de novas maneiras para executar as funções (VALENTE et al., 2006).

Acredita-se que o tratamento fisioterapêutico precoce pode ser benéfico, de modo que previnem alterações musculoesqueléticas secundárias, como atrofia e dor, além de evitar o aprendizado de estratégias de movimentos anormais ou a inutilização do membro (VALENTE et al., 2006; SILVA et al., 2013).

Um estudo realizado por Valente et al, 2006, em 08 pacientes com AVC, observou-se que o exercício passivo teve influencia na melhora da função motora, força muscular e sensibilidade do membro superior com 2 aplicações diárias de 25 minutos de duração. Além disso, há evidências de que a reabilitação do AVC reduz a incidência de complicações (pneumonia e outras complicações pulmonares, úlceras de decúbito e trombose venosa profunda), a taxa de mortalidade dos mesmos, e conseqüentemente o tempo de internação hospitalar (VALENTE et al., 2006; SILVA, et al., 2013).

Plaquetas

As plaquetas sanguíneas são fragmentos citoplasmáticos anucleados produzidos através da ruptura dos megacariócitos. A concentração sanguínea das plaquetas é de 150.000 a 350.000 por milímetro cúbico e seu tempo de vida média é de 7 a 10 dias (CASTRO et al., 2006).

A membrana externa da plaqueta é constituída por bicamada lipídica, e é rica em glicoproteínas, que servem como alvo para as reações de adesão, ou como receptores, desencadeando a ativação plaquetária. O citoplasma da plaqueta é constituído por grânulos (grânulos alfa, lisossomos, microperoxissomos e grânulos densos), mitocôndrias e glicogênio. Os grânulos alfa possuem armazenados fatores plaquetários (fator IV), proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina) e proteínas sintetizadas pelos trombócitos (fator de von Willebrand). Os grânulos densos contêm trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), Cálcio (Ca^{2+}) e serotonina (GRESELE et al., 2008; CASTRO et al., 2006). O ATP e ADP são liberados para o meio extracelular em resposta à ruptura celular ou ativação plaquetária (HOLMSEN, 1985).

A principal função das plaquetas sanguíneas está relacionada à manutenção da integridade vascular. Normalmente elas circulam intactas no sangue sem serem ativadas pelo endotélio vascular. Isto ocorre devido à carga negativa das superfícies das plaquetas e das células endoteliais vasculares, as quais são eletrostaticamente repulsivas, dificultando a formação de trombos (GRESELE et al., 2008). A ativação plaquetária está associada com a expressão de P-selectina, que se liga aos monócitos e granulócitos envolvidos na degradação da camada subendotelial e, portanto, esta associada com processos inflamatórios ateroscleróticos. As plaquetas são ativadas por estimulantes da circulação sanguínea, tais como exposição do sub-endotélio vascular, o colágeno, e fibrina (CEVIK et al., 2013).

Quando há ruptura de um vaso sanguíneo (podendo ocasionar AVCh) ou ruptura de uma placa de ateroma (que pode levar a AVCi) os eventos iniciais são modulados pelos componentes dos vasos sanguíneos expostos, como microfibrilas, membrana basal e colágeno. Concomitantemente, a adesão de plaquetas à matriz subendotelial ocorre a ativação plaquetária. As plaquetas ativadas liberam ADP, ATP, serotonina, tromboxano A_2 , enzimas lisossomais para auxiliar no recrutamento

de mais plaquetas a fim de formar um tampão plaquetário (AARON et al., 2003) (Figura 2).

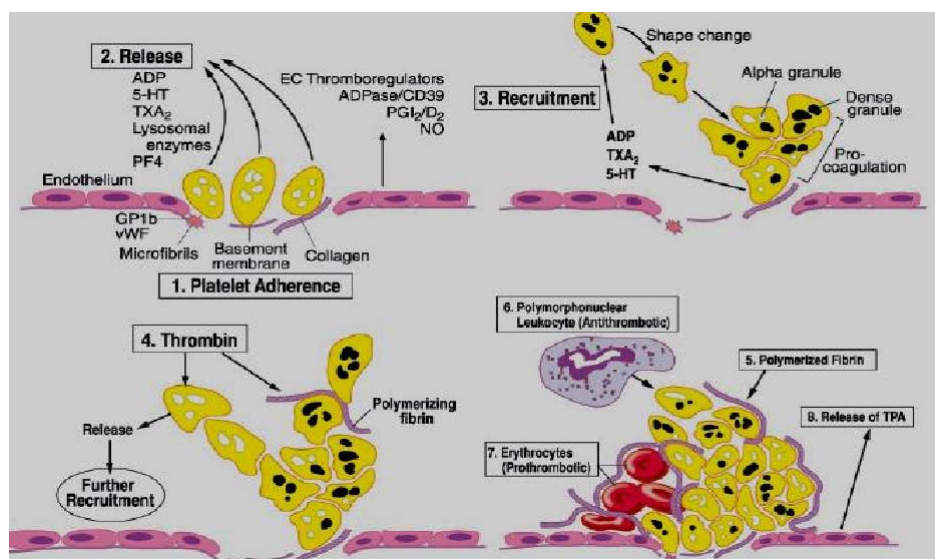


Figura 2. Mecanismos que levam à formação de um tampão de plaquetário ou um trombo. Fonte: AARON et al., 2003

Patologias como as doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas podem levar ao desequilíbrio nos mecanismos de tromboregulação. Este processo pode levar ao desencadeamento de patologia como AVC e trombose venosa profunda podendo levar embolia pulmonar (BARUZZI et al., 1996).

As plaquetas são importantes para a manutenção da integridade do sistema vascular. Em situações patológicas, quando elas encontram a matriz subendotelial exposta devido à lesão do vaso podem ocorrer alterações nos processos tromboregulatórios, levando à hemorragia excessiva podendo ocasionar o AVCh ou à formação de trombos levando ao AVCi (AARON et al., 2003).

Sinalização Purinérgica

A sinalização purinérgica está amplamente envolvida em muitos mecanismos presentes no sistema nervoso central (SNC) (ABRACCHIO et al., 2008; BURNSTOCK, 2008), sistema nervoso periférico, nas respostas imunes (ROBSON et al., 2006), inflamação e agregação plaquetária (ATKINSON et al., 2006). Esta sinalização envolve liberação de nucleotídeos e nucleosídeos para o meio extracelular, ação destes em receptores celulares específicos e o controle da concentração dessas moléculas no meio extracelular mediado por enzimas (Figura 2).

A sinalização mediada pelo ATP ocorre via a ativação de receptores de membrana do tipo P2. Estes receptores são classificados em duas famílias: P2X e P2Y (BURNSTOCK, 2008). A família P2X compreende sete subtipos diferentes (P2X₁₋₇) e são receptores ionotrópicos. Os receptores do tipo P2Y pertencem a superfamília dos receptores acoplados a proteína G e até o momento foram clonados oito subtipos (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,e,14}) (Figura 3). Estes receptores metabotrópicos transmembrana acoplam-se com proteínas G dos tipos Gq, Gs ou Gi. O ADP atua em receptores do tipo P2Y, preferencialmente P2Y₁₂ (proteína Gi) e P2Y₁ (proteína Gq) que estão localizados nas superfícies das plaquetas, responsáveis por intensificar a agregação plaquetária (STAFFORD et al., 2003; ANDRE et al., 2003). O receptor P2Y₁₂ situado na porção externa da membrana das plaquetas é alvo molecular de fármacos antiagregantes como ticlopidina e clopidogrel (CATTANEO e GACHET, 1999).

O ATP, por sua vez, pode interagir com receptores do tipo P2X₁ na membrana das plaquetas, mas ainda não está estabelecida a ação destes em relação à agregação plaquetária. Sabe-se também que o ATP em altas concentrações pode atuar como antagonista dos efeitos do ADP nos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ nas plaquetas (STAFFORD et al., 2003).

Os receptores para adenosina pertencem à classe de receptores acoplados a proteína G. São caracterizados pela inibição ou ativação da adenil ciclase (AC) e aumento ou inibição de AMPc. São classificados com A₁, A₂ e A₃ (Figura 3). O receptor de adenosina A₁ está acoplado a proteína Gi, levando a redução dos níveis de AMPc. O receptor de adenosina A₃ está também acoplado a proteína Gi. O receptor de adenosina A₂ é subdivididos em A_{2a} e A_{2b}, são acoplados com proteína

Gs que resulta a aumento dos níveis de AMPc no interior das células. O receptor de adenosina A_{2b} também está acoplado a proteína Gq que leva a uma modificação intracelular dos níveis de cálcio através do segundo mensageiro inositol trifosfato. Nas plaquetas os receptores para adenosina são A_{2a} e A_{2b} (HILLARY e RAVID, 2011; SANDOLI et al., 1994).

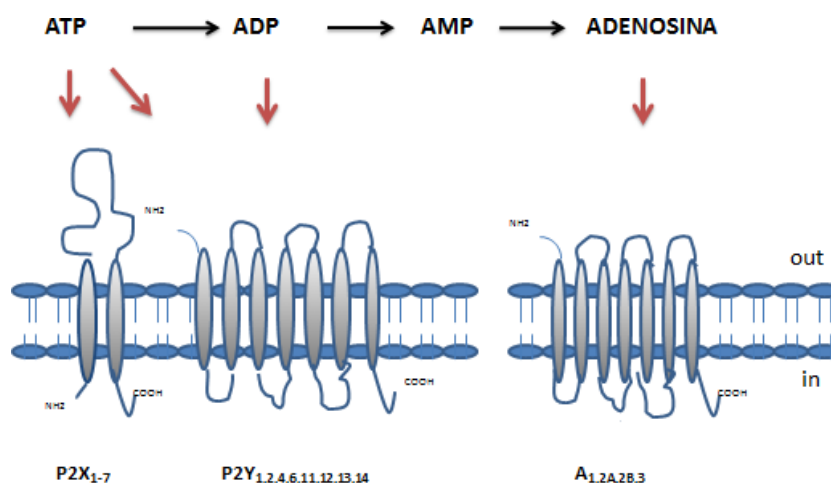


Figura 3. Ilustração dos receptores de membrana para ATP, ADP e adenosina (Adaptado de YEGUTKIN, 2008).

Ectonucleotidases

São ectoenzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina extracelulares. Estas enzimas encontram-se nas superfícies celulares, no meio intracelular e na forma solúvel (ZIMMERMAN 2000). Fazem parte desta família as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) a 5'-nucleotidase e adenosina deaminase (ADA).

As NTPdase são enzimas que hidrolisam ATP e ADP a AMP. Posteriormente o AMP formado é hidrolisado pela enzima 5'nucleotidase formando adenosina, a qual é degradada pela enzima ADA a inosina (CRISTALLI et al., 2001). Estas enzimas exercem papel fundamental na sinalização purinérgica, pois regulam a disponibilidade de nucleotídeos no meio extracelular, regulando assim, as respostas mediadas pelos purinoreceptores (CHEN e GUIDOTTI, 2001).

NTPDases

As Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) pertencem a uma família de enzimas onde já foram descritos 8 membros, os quais são denominados de NTPDase 1-8. Essas enzimas diferem quanto a localização celular e preferência por substratos. As NTPdase 1, 2, 3 e 8 são proteínas com domínios transmembranas sendo que o sítio catalítico é voltado para o meio extracelular, enquanto NTPdase 4, 5, 6 e 7 estão localizadas no meio intracelular (Figura 4). Todos os membros desta família possuem regiões conservadas da apirase (ACR) que são de grande relevância para a atividade catalítica (HANDA e GUIDOTTI, 1996). As NTPDases localizadas na superfície celular possuem um papel crucial na manutenção da concentração extracelular de nucleotídeos de adenina (ROBSON et al 2006).

A NTPdase 1 é uma enzima que hidrolisa igualmente ATP e ADP é encontrada preferencialmente nas membranas das plaquetas e células endoteliais. A NTPDase 2 hidrolisa preferencialmente ATP. NTPDase 3 e 8 possuem características hidrolíticas bem parecidas, hidrolisam preferencialmente ATP. Estas enzimas possuem dois domínios transmembranares e a atividade catalítica destas enzimas requer a presença de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), sendo inativas sem a presença destes íons. As NTPdases 5 e 6 possuem apenas um domínio transmembrana e podem sofrer clivagem proteolítica e serem secretadas na forma solúvel (LAVOIE et al., 2004).

Os membros da família das NTPDases com domínios extracelulares são constitutivamente expressos em diversas células como linfócitos (LEAL et al., 2005) e plaquetas (PINSKY et al., 2002). A atividade da NTPDase em plaquetas já foi estudada em insuficiência renal crônica (SILVA et al., 2005), câncer de mama (ARAUJO et al., 2005), isquemia cerebral (FRASSETTO et al., 2000) entre outros.

Em ratos submetidos a isquêmica cerebral focal em que a enzima NTPDase1 não é expressa apresentaram diminuição do fluxo sanguíneo. Quando a forma solúvel da NTPDase 1 foi administrada a camundongos sem a expressão desta enzima demonstraram aumento do fluxo sanguíneo pós-isquêmica. Observou-se que a NTPDase 1 tem a capacidade de inibir a reatividade das plaquetas no acidente vascular cerebral reduzindo a ocorrência de trombose intravascular (PINSKY et al., 2002).

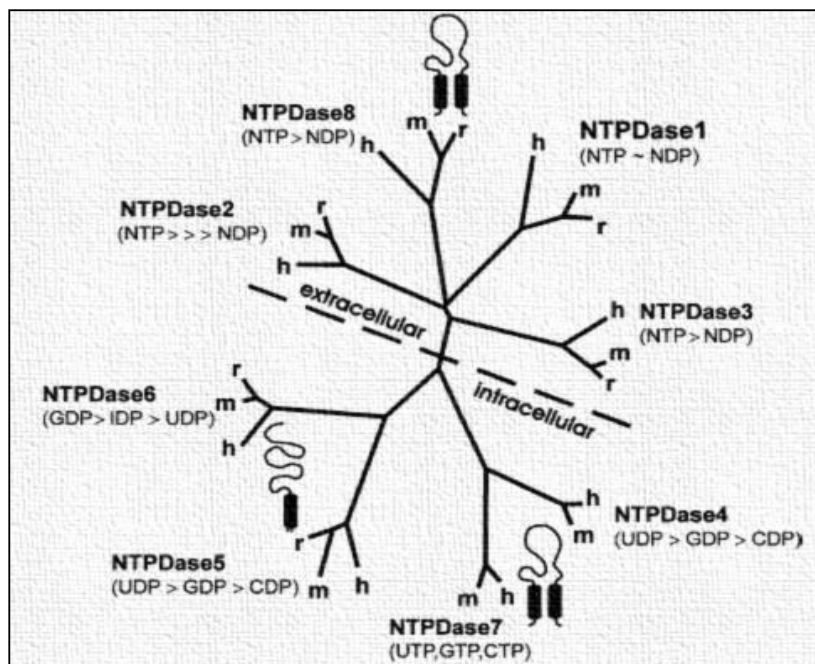


Figura 4. Subtipos da enzima NTPDase já identificadas com sua localização celular e domínios transmembrana. (Fonte: ROBSON et al., 2006).

5'-nucleotidase

A enzima 5'-nucleotidase catalisa a desfosforilação de 5'-monofosfatos, mas com maior eficiência o AMP. Esta enzima está amplamente distribuída em bactérias, células de plantas e tecidos de vertebrados, esta enzima é classificada de acordo com a localização celular e propriedades bioquímicas: ancoradas a membrana e duas formas citoplasmáticas (KAWASHIMA et al., 2000).

A 5'nucleotidase presente nas plaquetas é uma glicoproteína ancorada a membrana via GPI (glicosil fosfatidil-inositol) e o íon magnésio é cofator. Está amplamente distribuída em tecidos como nervoso, renal, hepático, placenta, endotélio vascular (KAWASHIMA et al., 2000) e nas plaquetas (FRASSETTO et al., 2000).

Suas funções relacionam-se a hidrólise do AMP extracelular derivado do ATP e do ADP liberado para o meio extracelular formando adenosina. A adenosina atua em receptores específicos, desempenhando as funções de neurotransmissão, neuromodulação, neuroproteção, controle do tônus vascular e da função plaquetária (ZIMMERMANN et al., 2000).

Com base nisto, a 5'-nucleotidase atua em conjunto com a NTPDase na tromboregulação, pois a adenosina formada atua em receptores presente na

membrana das plaquetas sanguíneas, inibindo a agregação plaquetária, devido a degradação ATP-ADP para AMP e, posteriormente para adenosina controlando as funções plaquetárias.

Estudos tem demonstrado alterações na atividade dessa enzima em muitas situações patológicas como por exemplo a isquemia cerebral (FRASSETO et al., 2000), *diabetes mellitus*, insuficiência renal crônica e câncer de mama (ARAUJO., 2005; SILVA et al., 2005) entretanto a atividade dessa enzima em pacientes com AVC submetidos a protocolos de exercício passivo ainda não foi descrito na literatura.

Adenosina deaminase (ADA)

Adenosina deaminase é uma enzima responsável pela reação de desaminação irreversível de adenosina a inosina, e 2'-desoxiadenosina a 2'-desoxi-inosina. Esta enzima requer o pH próximo do neutro e um cátion bivalente para a sua atividade catalítica (Zinco ou Cobalto) (CRISTALLI et al., 2001).

ADA é expressa no intestino, timo, baço, plaquetas, eritrócitos, linfócitos e células do SNC (FRANCO et al., 1997). Pode ser encontrada no citosol e na superfície das células. Em humanos, a atividade da ADA deve-se a duas isoenzimas: Adenosina-deaminase 1 (ADA1) e adenosina-deaminase 2 (ADA2). ADA1 constitui a maior parte da atividade da ADA nas células, já a isoenzima predominante no plasma e soro é a ADA2 (CRISTALLI et al., 2001).

Estudos demonstram que a ausência da ADA em linfócitos está relacionada com imunodeficiência severa combinada (SCID), devido a esta enzima ser fundamental para o desenvolvimento das células T e B (CRISTALLI et al., 2001; FRANCO et al., 1997). Alterações na atividade da ADA foram descritas na síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), Síndrome de Down, Doença de Parkinson, artrite reumatoide entre outras (CRISTALLI et al., 2001).

A atividade da ADA em plaquetas pode favorecer um estado pró-trombótico por degradar a adenosina, que tem efeito anti-agregante plaquetário e vasodilatador (ANWAR, 2013).

Sendo assim, sabe-se que as ectonucleotidases presentes nas plaquetas constituem um importante mecanismo na manutenção da hemostasia. Considerando que o AVC é uma patologia que envolve a ruptura ou oclusão de vasos sanguíneos

torna-se relevante avaliar a atividade dessas enzimas em plaquetas de pacientes portadores dessa patologia. Além disso, esse trabalho visa também determinar como o exercício passivo pode modular a atividade dessas enzimas buscando assim encontrar mecanismos que possam beneficiar o tratamento de portadores de AVC.

4 Manuscrito

Effects of passive exercise on the biochemical parameters and ectonucleotidase activities in platelets from patients with stroke hospitalized in intensive care unit

Elise Beck da Motta¹, Mauricio Machado Ferreira¹, Felipe Giovaninni¹,
Jessica Pureza¹, Caroline Machado¹, Gabriela Debom¹, Marina Madeira², Rafael
Orcy³, Elizandra Braganhol¹, William Peres¹, Roselia M. Spanevello¹

**Effects of passive exercise on the biochemical parameters and
ectonucleotidase activities in platelets from patients with stroke hospitalized
in intensive care unit**

Elise Beck da Motta¹, Mauricio Machado Ferreira¹, Felipe Giovaninni¹, Jessica
Pureza¹, Caroline Machado¹, Gabriela Debom¹, Marina Madeira², Rafael Orcy³, Elizandra
Braganhof¹, William Peres¹, Roselia M. Spanevello¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de
Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas,
Campus Universitário Capão do Leão S/N, Cep 96010900, Pelotas, RS, Brazil.

² Hospital Universitário São Francisco de Paula, Pelotas, RS, Brazil

³ Instituto de Biologia, Campus Universitário Capão do Leão S/N
Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Cep 96010900,
Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding author:

Roselia Maria Spanevello, PhD

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de
Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de
Pelotas, Campus Universitário- Capão do Leão 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

E-mail addresses: roseliabioquimica@gmail.com

Phone: +55 53 32753355

Abstract

The aim of this study was evaluated the ectonucleotidase activities and biochemical parameters in platelets and serum from stroke patients hospitalized in the unit care intensive. The population studied consisted of the 18 cerebral stroke patients and 18 healthy individuals as control group. Passive mobilization was performed in stroke patients during seven days and the blood was collected in the first and seventh day. In each day the blood was collected before exercise session (time 0) immediately after exercise session (time 20) and 40 minutes after the application of passive intervention (time 60). The blood was used for platelet and serum preparation. In platelets was evaluated the NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) activity and in serum biochemical parameters such as urea, uric acid, cholesterol, triglycerides, AST, ALT, creatinine and C-reactive protein. The results demonstrated an increase in the ATP hydrolysis and a decrease in the ADP and AMP hydrolysis in platelets from stroke patients when compared to control group ($P \leq 0.05$). No alterations were observed in ADA activity. After seven days the exercise passive was observed an increase in the NTPDase activity using ADP as substrate. No change was observed in the ATP and AMP hydrolysis. In relation the ADA was observed an increase in this enzyme activity in platelets after seven days the passive exercise only in the time 20. In relation the biochemical parameters our results showed a significant decreased only in the ALT and levels of C-reactive protein in serum of stroke patients after seven days of passive exercise. These results suggest that ectonucleotidase activities alterations in the platelet may contribute to vascular complications in the stroke and that passive exercise can be important in thrombosis mechanisms because it increase the ADP hydrolysis, the main agonist of platelet aggregation.

Key words: passive exercise, platelets, stroke, ectonucleotidases, biochemical parameters

Introduction

Survival rate of patients admitted in Intensive Care Unit (ICU) has increased largely due to advances in care and development of medical and pharmacological interventions (MORAN, 2008). Passive exercise is part of the standard procedures applied to patients in ICU with the purpose of strengthening muscle tone and prevents respiratory and vascular complications (ALLEN, 1999). Application of this procedure is of great importance in patients with stroke, sometimes referred to as a cerebrovascular accident, because this condition is associated with high rates of disability in older people (CHERUBINI et al., 2005).

Strokes can be classified into two major types: ischemic and hemorrhagic. Ischemic stroke occurs as result of obstruction within a blood vessel resulting in a lack of delivery of oxygen and nutrients to the brain while hemorrhagic stroke occurs as result of rupture of a blood vessel or abnormal vascular structure into the brain. About 86% of the strokes are ischemic and 14% are hemorrhagic, however hemorrhagic stroke is the responsible for more than 30 percent of all stroke deaths (SHIBER et al., 2008).

Stroke is a medical emergency and can cause permanent neurological disability and death (OLIVEIRA and ANDRADE, 2001). Some risk factors for stroke include *diabetes mellitus*, high cholesterol, high blood pressure, tobacco smoking, atrial fibrillation and age (KEYS et al., 2010). Of particular importance, studies have demonstrated an increase in platelets activation and aggregation in both ischemic and hemorrhagic stroke types (SMITH et al., 1999). Platelet hyperreactivity is associated with increased risk of thrombosis, however, these alterations in platelet function in stroke and their contribution to further injury have received little attention (CEVIK et al., 2013).

Blood platelets play a pivotal role in the maintenance of vascular integrity through adhesion, aggregation, coagulation and thrombus formation in the injured blood vessel (MARCUS and SAFIER, 1993; NI and FREEDMAN, 2003). One of the most important mediators of hemostasis and thrombosis are the extracellular adenine nucleotides such as ATP, ADP and adenosine nucleoside. (ASLAM et al., 2013). Both ATP and ADP are released by platelets upon activation and are necessary for the aggregation process (GACHET, 2005). ADP is a potent agonist of platelet aggregation via binding to P2Y₁ and P2Y₁₂ nucleotide receptors (STAFFORD et al.,

2004). On the other hand, the nucleoside adenosine is a molecule with antiaggregant and vasodilating effects (HILLARY and RAVID, 2011).

Ectonucleotidases are present in platelet surface and have a crucial role in control extracellular nucleotide levels and consequently their physiological effects. NTPDase are $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dependent, ecto-enzymes that converts ATP and ADP in AMP, which in turn is broken down by 5'-nucleotidase to adenosine (YEGUTKIN, 2008). The resulting adenosine can be directly inactivated on the cell surface through sequential action of ectoADA, which catalyses irreversible deamination of adenosine to inosine (FRANCO et al., 1997). Thromboregulatory properties of these enzymes may be of therapeutic relevance (ROBSON et al., 2005; ATKISON et al., 2006). Frassetto et al. (2000) demonstrated that brain ischemia alters ectonucleotidases activities in platelets from rats, suggesting that these enzymes have main relevance in this pathological situation.

In this line, the aim of the present study was evaluate the effect of passive exercise in the activity of the enzymes NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA in platelet from patients with ischemic and hemorrhagic stroke hospitalized in the ICU of the University Hospital São Francisco de Paula in Pelotas – RS - Brazil.

Material and Methods

Study population

The population studied consisted of the 18 stroke patients hospitalized in ICU in University Hospital São Francisco de Paula in Pelotas - RS between the periods of the November 2012 to May 2013. Eight patients have ischemic stroke and ten patients have hemorrhagic stroke. The diagnostic were established by computed tomography. Other characteristics of the patients can be observed in the Table 1.

All patients with stroke (ischemic or hemorrhagic) were submitted to passive exercise session during 7 days. The passive mobilization was standardized as is now routinely applied to bedridden patients in ICU, consisting of flexion - extension for 5 minutes on each member, totalizing 20 minutes of exercise per day. Performed by a physiotherapist. Blood samples were collected in 1st and 7th days of intervention. In each day, four milliliters of blood were collected of patients before exercise session (T0), four milliliters immediately after exercise (T20) and four milliliters 40 minutes

after exercise (T60). Blood were collected in tubes containing sodium citrate as anticoagulant and clot activator utilized for platelets separation and biochemical assays respectively (Scheme 1).

The stroke group was compared with control group before passive exercise. The control group consists of healthy adult patients (Table 1). This study protocol was approved by the Human Ethics Committee from Universidade Federal de Pelotas. The exercise session and blood collect only were performed after medical authorization and signing of consent form for the family responsible for the patient.

Biochemical profile

Was analyzed in serum urea, uric acid, total cholesterol, triglycerides, AST, ALT, creatinine and ultrasensitive C-reactive protein by commercial kit Labtest®.

Platelet separation

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by the method of Pilla et al. (1996). Total blood was collected with sodium citrate as anticoagulant. The total blood citrate system was centrifuged at 160 x g during 10 min. After this, the PRP was centrifuged at 1400 x g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

NTPDase and 5'-Nucleotidase assays

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 µl as described by Pilla et al. (2006). For AMP hydrolysis, the medium reaction was used as previously described except that 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂.

Twenty microliters of the enzyme preparation (8-12 µg of protein) were added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM, and AMP at a final concentration of 2 mM. The incubation time was 60 minutes.

Both enzyme assays were stopped by the addition of 200 μ l of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. Subsequently, the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1996) using malachite green as the colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolysis of nucleotides by adding platelets after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Adenosine deaminase determination

Adenosine deaminase (ADA) from platelets was determined according to Guisti and Galanti (1974). Briefly, 50 μ L of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, incubated at 37°C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. Results were expressed in units per mg of protein (U/mg of protein). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

Protein determination

Protein content was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by the Student's t-test and one-way anova for parametrical numerical variables. $P \leq 0.05$ were taken to indicate statistical significance. All data were expressed as mean $\pm$ SEM. The sample size calculation was performed in the statistical program PEPI 404X considering a statistical power of 80% and significance level in two-tailed t-test of 0.05.

Results

In this study were evaluated both hemorrhagic and ischemic patients hospitalized in the ICU. The mean of age of patients were 60 years and the women were more affect those men in the study period. The time of hospitalization before the exercise passive application was between 2 to 5 days (Table I). All the patients have the normal number of platelets (data not showed).

In first time the results obtained in the present study showed that ectonucleotidases activities were altered in platelets from stroke individuals hospitalized in the unit care intensive. As can be observed in the Figure 1 NTPDase activity, using ATP as substrate, was significantly increased in platelets of stroke patients when compared to control group ($P \leq 0.05$) (Figure 1 A). On the other hand was observed a decrease in NTPDase activity in ADP hydrolysis in this patient group in relation to healthy subjects (Figure 1 B). Similar results were obtained in relation to 5'-nucleotidase activity ($P \leq 0.05$). The Figure 1C shows a decrease in AMP hydrolysis in platelets of stroke patients when compared to control group ($P \leq 0.05$). No alterations were observed in ADA activity (Figure 1D).

The effect of passive exercise in the ectonucleotidase activities in platelets from stroke patients is shown in the Figure 2, 3 and 4. Passive mobilization was performed during seven days and blood was collected in first and seventh day. In each day the blood was collected before exercise session (time 0) immediately after exercise session (time 20) and 40 minutes after application of passive intervention (time 60). Comparing the results obtained in first day with the obtained in the seventh day, our findings demonstrated that the NTPDase activity using ADP as substrate was increased in platelets from stroke patients after seven days of the passive exercise in all times evaluated (Figure 2B; $P \leq 0.05$). No change was observed in the ATP and AMP hydrolysis (Figure 2A and Figure 3). In relation the ADA was, it observed an increase in enzyme activity in platelets after seven days of passive exercise only in time 20 (Figure 4).

In this study was also evaluated the effects of the passive exercise in biochemical parameters such as cholesterol, triglycerides, creatinine, urea, uric acid, AST, ALT and C-reactive protein (CRP) in serum from stroke patients. Comparing the results obtained in the first day with the obtained in the seventh day, our findings

showed a significant decreased only in ALT and CRP levels after seven days of passive exercise (Table II and Figure 5; $P \leq 0,05$).

Discussion

Many studies have demonstrated alterations in platelets functions in stroke. Platelets are responsible for the maintenance of vascular integrity and its functions are altered in thrombotic conditions, when there is decreased permeability and increased vascular fragility (AARON et al., 2003). Studies have demonstrated that activation was enhanced in the ischemic stroke and returned in baseline levels three months later this pathology (MOGHADAM et al., 2007). Decrease fluidity in the platelets membrane and functional properties are observed in stroke, aggravated when affected along with risks factors with diabetes mellitus and hypertension arterial systemic (NANETTI et al., 2008). Although platelets constitute the major component of a thrombus its role in determining the clinical severity of stroke is unknown. For our knowledge there are no studies in literature evaluating the effects of passive exercise in the ectonucleotidases activities in platelets of the stroke patients.

In first time our results demonstrated alteration in ectonucleotidases activities in platelets of stroke patients when compared with the control group. It was observed an increase in ATP hydrolysis and a decrease in the ADP and AMP hydrolysis in the platelets from stroke group (Figure 1. A, B, C).

The activity of ectonucleotidases is one of the most important factors involved in modulation of nucleotides and nucleosides and thus in different platelet receptors. The action of the NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activity are responsible for pro-inflammatory and pro-thrombotic responses in the cardiovascular system (ROBSON and ZIMMERMAN, 2006; ATIKINSON et al., 2006). In this context increase in ATP hydrolysis and a decreased in ADP hydrolysis may lead an increase in extracellular ADP concentrations. The nucleotide ADP is principal agonist in platelet recruitment and the main factor in the development of thrombus (STAFFORD et al., 2003; ANDRE et al., 2003). On the hand the enzyme 5'-nucleotidase is responsible by hydrolysis of AMP to adenosine (KAWASHIMA et al., 2000). A decrease in this enzyme activity observed in this study.

The decrease adenosine levels in the circulation causing vascular complications, since adenosine has an important role in preventing the thrombotic

process because the antiaggregant effects of this molecule. These unbalance in the ratio nucleotides and nucleosides in the platelet surface could explained, at least in part, the procoagulant environment observed in the stroke.

The passive mobilization is being increasingly applied in patients recovering from stroke. Studies show that passive exercise intervention showed improvement motor function, muscle strength and sensitivity of the upper limbs on stroke patients (VALENTE et al., 2006).

The next set of experiments were conducted to evaluate if effects of exercise passive are capable to modulate ectonucleotidase activities in platelets from stroke patients. We observed that seven days after the exercise passive occurred an increase in ADP hydrolysis in all time evaluated. In this line is plausible suggest that application the exercise passive may contribute to reduce the thrombotic process by depleting the ADP.

Our study also evaluated the effects of passive exercise in biochemical parameters such as AST, ALT, urea, creatinine, cholesterol, triglycerides, uric acid (Table II), and serum levels of C-Reactive Protein (CRP) (Figure 5). It was found a significant decrease in serum levels in ALT and CRP during the seven days of passive mobilization ($P < 0.05$). PCR is used as an inflammatory marker in various diseases. Atherosclerosis is considered a major risk factor for the development of AVC. Atherosclerosis is characterized by inflammation in the blood vessels and increased levels of this protein. Due to this fact the serum PCR is a marker that should be monitored in patients with stroke (LIBBY et al., 2010; 2002).

Markers of liver damage as AST and ALT are importantly controlled in stroke patients because excessive alcohol consumption is a risk factor for the development of this pathology (ROWLAND e PEDLEY, 2011). Studies show that serum ALT levels, were elevated in healthy patients when undergoing exercise (CAMERINO et al., 2012).

In conclusion, our results demonstrated alterations in the adenine nucleotide hydrolysis in platelets from stroke patients suggesting that these dysfunctions can contribute for vascular complications associated with stroke. The passive exercise can modulate the ectonucleotidases activities and biochemical parameters such as CRP and ALT in this pathological condition. Further studies have to be carried out in order to determine the therapeutic potential of the passive exercise the purinergic signaling associated with stroke.

Acknowledgments

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

References

- AARON, J. M. BROEKMAN, M. J., DROSOPOULOS, H. F., ISLAM, N., PINSKY, D.J., SESTI, C., LEVI, R. Metabolic control of Excessive Extracellular nucleotise accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: Implication for Ischemic Vascular Diseases. **Perspectives in Pharmacology**, 305:9-16, 2003.
- ALLEN, C., P. GLASZIOU; C. DEL MAR. Bed rest: a potentially harmful treatment needing more careful evaluation. **Lancet** 354(9186):1229-1233, 1999.
- ANDRE, P et al. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus grow, and thrombus stability in injured arteries. **Clinical Investigation** 112:398 – 406, 2003.
- ANDRE, P.; DELANEY, S.; LAROCCA, T.; VICENT, D.; DEGUZMAN, F.; JUREK, M.; KOLLER, B.; PHILLIPS, D.; CONLEY, P. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thtombus growth, and thrombus stability in injured arteries. **The Journal Clinical Investigation**. 112:398-406, 2003.
- ASLAM, M; SEDDING, D; KOSHTY, A; SANTOSO, S; SCHULZ, R; HAMM, C; GUNDUZ, D. Nucleoside triphosphates inhibit ADP, collagen, and epinephrine-induced platelet aggregation: Role of P2Y1 and P2Y12 receptors. **Thrombosis Research** 132: 548-557, 2013.
- ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S. Ecto-nucleotidases on the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules and Diseases** 36: 217-222, 2006.
- CEVIK, O.; ADLGUZEL, Z.; BAYAKAL, A. T.; SOMAY, G.; SENER, A.; The apoptotic action of platelets in acute ischemic stroke. **Molecular Biology Reports** 40:6721-6727, 2013.
- CHERUBINI, A; RUGGIERO, C.; POLIDORI, A. C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Radical Biology & Medicine** 39: 841-852, 2005.
- FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.; LUIS, C. Cell surface adenosine deaminase much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology** 52: 283-294, 1997.
- FRASSETTO, S. S.; SCHETINGER, A. R. C.;SCHIERHOLT, R.; WEBBER, A.; BONAN, C. D.; WYSE, A. T.; DIAS, R. D.; NETTO, C. A.; SARKIS, J. J. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naïve and preconditioned rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 33: 1369-1377, 2000.
- GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targerts for old and new antiplatelet drugs. **Pharmacology and Therapeutics** 108: 180-192, 2005.
- GONZAGA, W. D. S. 4,5, GOMES, L. P. S. 1,5, PRADO, E. S.Cevik, O.; ADLGUZEL, Z.; BAYAKAL, A. T.; SOMAY, G.; SENER, A. The apoptotic action of platelets in acute ischemic stroke. **Molecular Biology Reports** 40: 6721-6727, 2013.

JOHNSON BD, PADILLA J, WALLACE JP. The exercise dose affects oxidative stress and brachial artery flow-mediated dilation in trained men. **European Journal of Applied Physiology**, 2011.

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

KAWASHIMA, Y. NAGASAWA, T. NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood** 96:2157-2162, 2000.

LIBBY P, OKAMOTO, Y; ROCHA, V. Z; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: Transition from theory to practice. **Circulation** 74:213-220. 2010.

LIBBY P, RIDKER P, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation** 105: 1135-43, 2002.

MARCUS, A; SAFIER, L.. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. **The FASEB Journal** 6: 516-522, 1993.

MONHADAM, S. F. et al Hyperresponsiveness of platelets In ischemic stroke. **Platelets and Blood Cells** 97:974-978, 2007.

MORAN, J.L.; BRISTOW P; SOLOMON PJ; GEORGE C; HART GK. Mortality and length-of-stay outcomes, 1993-2003, in the binational Australian and New Zealand intensive care adult patient database. **Critical Care Medicine** 36(1):.46-61, 2008.

NANETTI, L et al. Platelet membrane fluidity and Na/K ATPase activity in acute stroke, **Brain Research** 1205:21-26, 2008.

NI, H; FREEDMANN, J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. **Transfusion and Apheresis Science** 28: 257-26, 2003.

OLIVEIRA, R. M. C., ANDRADE, L. A. F. Acidente vascular cerebral. **Hipertensão** 8:280-290, 2001.

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

ROWLAND, L. P. PEDLEY, t. a. Tratado de Neurologia. 12º ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro 2011.

SHIBER, J. R.; FONTANE, E.; ADEWALW, A. Stroke registry: hemorrhagic vs ischemic strokes. **American Journal of Emergency Medicine**. 28: 331-333, 2008.

SMITH, N. M. Platelets and stroke. **Vascular medicine**, 4(3):165-172, 1999.

STAFFORD, N. et al Mechanisms involved in adenosine triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 1928-1933, 2003.

STAFFORD, N. P.; PINK, A. E.; WHITE, A. E.; GLENN, J. R.; Heptinstall, S. Mechanisms Involved in Adenosine triphosphate-Induced Platelet Aggregation in Whole Blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 23:1928-1933, 2003.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**. 673-694, 2008.

Legends to Figures

Figure 1- Ectonucleotidases activities in platelets from stroke patients and control group. NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrate; 5'-nucleotidase activity using AMP as substrate (C) and adenosine deaminase (ADA) using adenosine as substrate (D). Bars represent means $\pm$ SEM. *Represents statistical difference in relation the control group (Student's t test, $P \leq 0.05$, $n = 18$ each group).

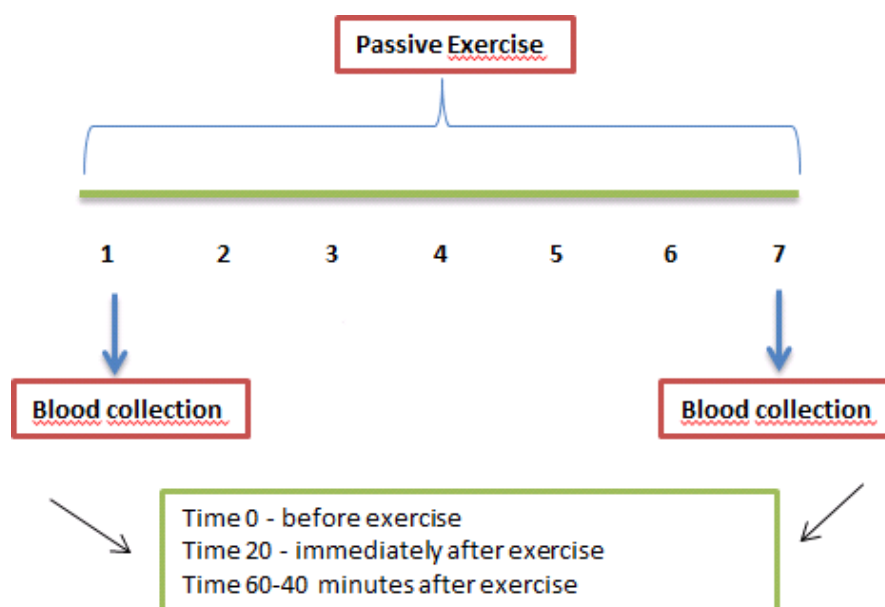
Figure 2 - NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrate in platelets from stroke patients submitted to passive exercise. Comparison the times 0, 20 and 60 minutes between the first and seventh day of intervention with passive mobilization. NTPDase activity is expressed in nmol of Pi/min/mg of protein. Bars represent means $\pm$ SEM. *Represents statistical difference between times (One-way Anova with post-test Tukey, $P \leq 0.05$, $n = 18$).

Figure 3 - 5'- nucleotidase activity using AMP as substrate in platelets from stroke patients submitted to passive exercise. Comparison the times 0, 20 and 60 minutes between the first and seventh day of intervention with passive mobilization. 5'-nucleotidase activity is expressed in nmol of Pi/min/mg of protein. Bars represent means $\pm$ SEM (One-way Anova with post-test Tukey, $P \leq 0.05$, $n = 18$).

Figure 4 - ADA activity using adenosine as substrate in platelets from stroke patients submitted to passive exercise. Comparison the times 0, 20 and 60 minutes between the first and seventh day of intervention with passive mobilization. ADA activity is expressed in U/L. Bars represent means $\pm$ SEM. *Represents statistical difference between days (One-way Anova with post-test tukey, $P \leq 0.05$, $n = 18$).

Figure 5 - Ultrasensitive C-reactive protein (CRP) in serum from stroke patients submitted to passive exercise. Comparison between the first and seventh day of intervention with passive mobilization. CRP is expressed in mg/L. Bars represent means $\pm$ SEM. *Represents statistical difference between days (Student's t test, $P \leq 0.05$, $n = 18$).

	Control	Ischemic group	Hemorrhagic group
Number	18	08	10
Women	12	05	09
Men	06	03	01
Mean age (years)	60± 15.3	65 ± 0.1	61±16.9
Days of Hospitalization before exercise	-----	2.14±1.2	5.25±3.84



Scheme 1

Table II – Biochemical parameters in serum from stroke patients hospitalized in intensive care unit before and after seven days of passive exercise. Data are expressed in mg/dl, AST and ALT in U/L. Results are expressed in means $\pm$ SEM. *Represents statistical difference between days (Student's t test, $P \leq 0.05$, $n = 18$).

	1 st day	7 th day
Cholesterol	160.05 $\pm$ 11.97	152.41 $\pm$ 9.02
Triglycerides	143.36 $\pm$ 13.14	161.38 $\pm$ 12.12
Creatinine	0.90 $\pm$ 0.10	1.05 $\pm$ 0.17
Urea	49.00 $\pm$ 4.65	51.43 $\pm$ 5.86
Uric Acid	3.72 $\pm$ 0.37	3.63 $\pm$ 0.30
AST	35.23 $\pm$ 6.59	29.14 $\pm$ 3.18
ALT	28.15 $\pm$ 4.23	17.30 $\pm$ 1.72*

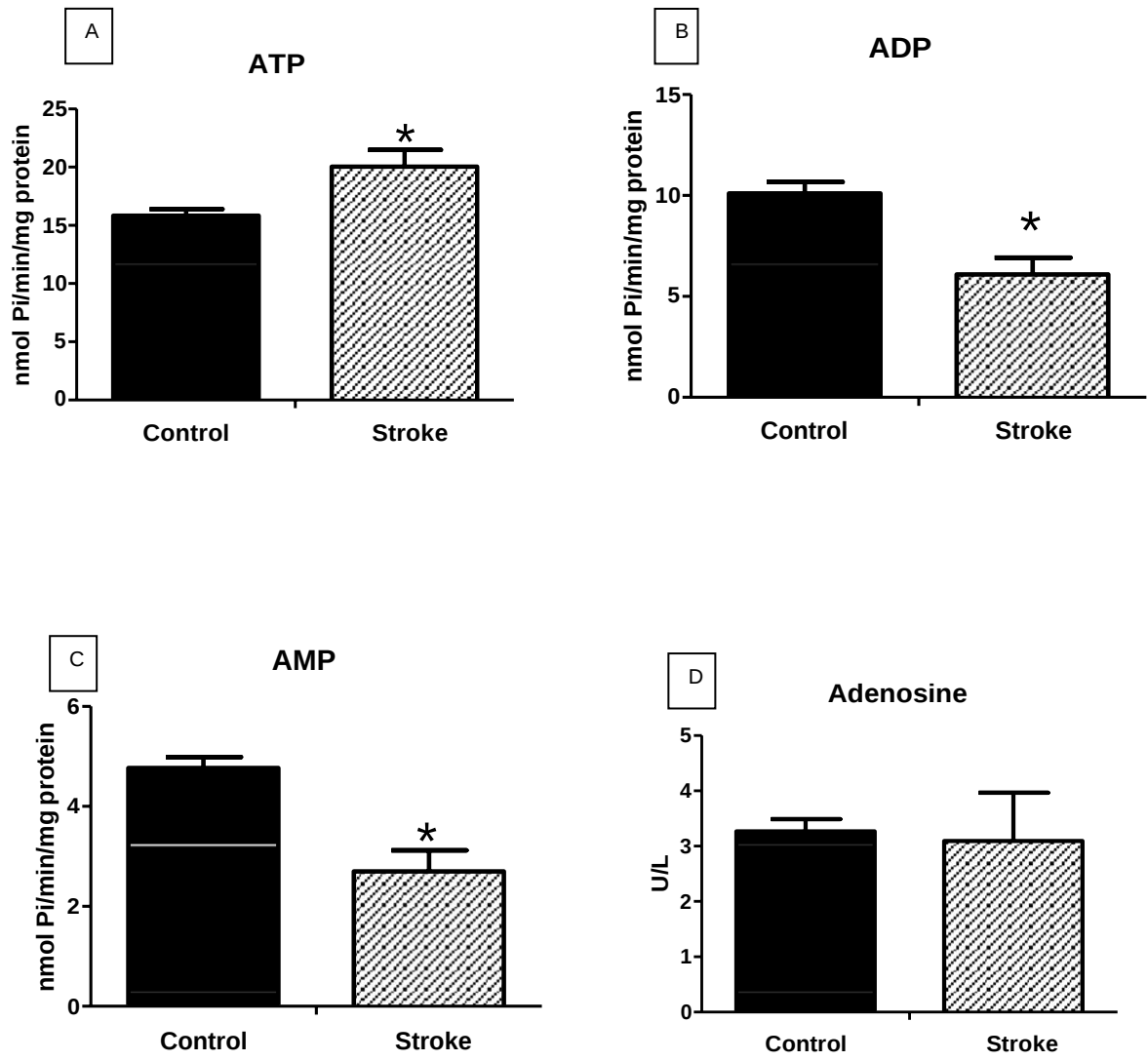


Figure 1

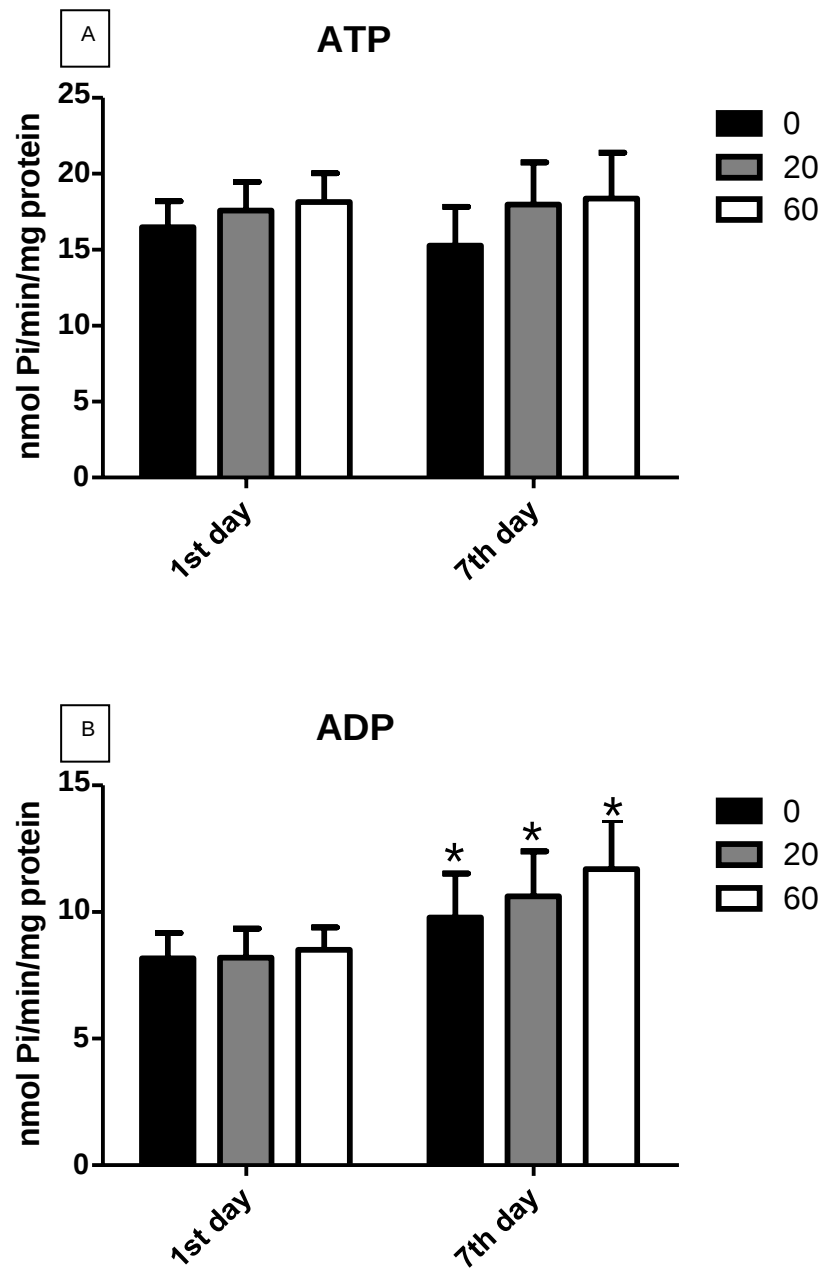


Figure 2

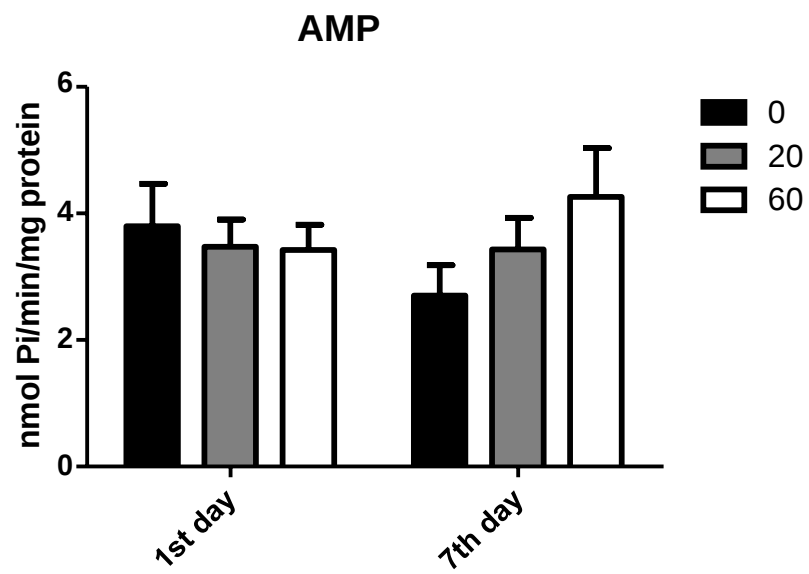


Figure 3

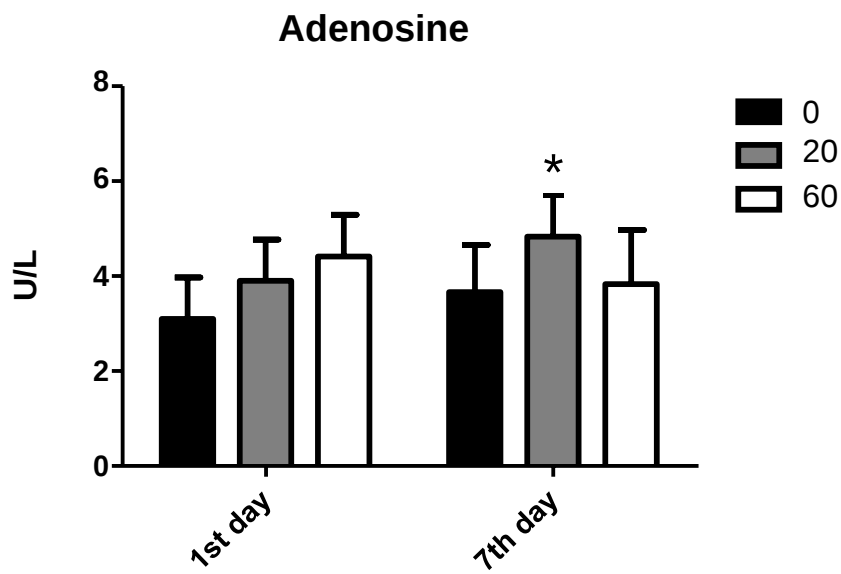


Figure 4

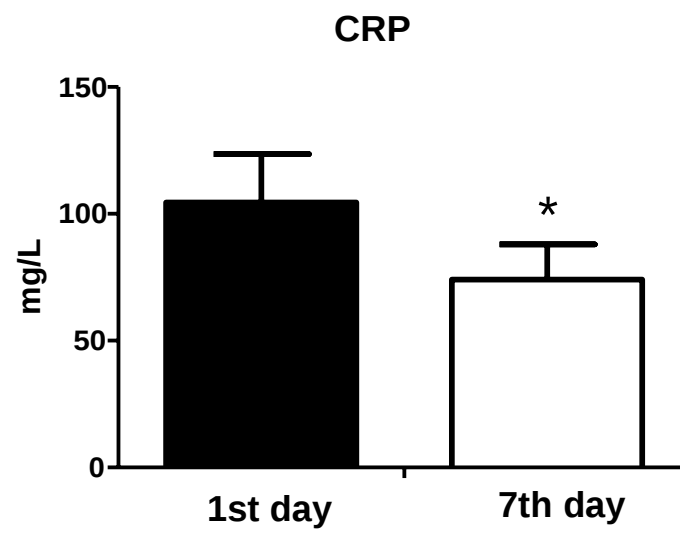


Figure 5

5 Conclusões

A hidrólise dos nucleotídeos de adenina está alterada em plaquetas de pacientes com AVC quando comparado a indivíduos saudáveis como grupo controle. As alterações na atividade da NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA podem contribuir para aumentar os níveis de ADP, o principal agonista de agregação plaquetária, e diminuir os níveis de adenosina, uma molécula com ações antiagregantes e cardioprotetoras. Esses achados podem contribuir para explicar as alterações trombo regulatórias observadas nessa condição patológica.

O exercício passivo é capaz de modular a atividade das ectonucleotidases de plaquetas de pacientes com AVC internados em unidade de terapia intensiva. Após sete dias de exercício foi observado um aumento na hidrólise do ADP sugerindo que o a mobilização passiva pode influenciar nos mecanismos associados à ativação e agregação plaquetária.

Dentre os parâmetros bioquímicos avaliados foi observado que após sete dias houve uma diminuição nos níveis de PCR. A PCR é considerada um marcador agudo de inflamação. Sendo assim nossos resultados sugerem que o exercício passivo também pode exercer algum efeito nos mecanismos de inflamação associado ao AVC.

Muitos estudos têm relacionado os níveis elevados de ALT com o aumento no risco de doenças cardiovasculares. Neste contexto, o presente trabalho demonstrou que exercício passivo também diminui os níveis de ALT em pacientes com AVC. Embora nesse trabalho não seja possível estabelecer os mecanismos pelos quais isso ocorre, estes achados demonstram que o exercício passivo pode ter contribuições importantes para o paciente com AVC.

6 Referências

- AARON, J. M. BROEKMAN, M. J., DROSOPOULOS, H. F., ISLAM, N., PINSKY, D.J., SESTI, C., LEVI, R. Metabolic control of Excessive Extracellular nucleotise accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: Implication for Ischemic Vascular Diseases. **Perspectives in Pharmacology**, 305:9-16, 2003.
- ABBRACCIO, M. P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A. ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling In the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, 2008.
- ALEXANDROVA, M. L. BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology & Medicine** 39: 297-316, 2005.
- ALLEN, C., P. GLASZIOU; C. Bed rest: a potentially harmful treatment needing more careful evaluation. **Lancet** 354: 1229-1233, 1999.
- ANDRE, P et al. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus grow, and thrombus stability in injured arteries. **Clinical Investigation** 112:398 – 406, 2003.
- ANDRE, P.; DELANEY, S.; LAROCCA, T.; VICENT, D.; DEGUZMAN, F.; JUREK, M.; KOLLER, B.; PHILLIPS, D.; CONLEY, P. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thtombus growth, and thrombus stability in injured arteries. **The Journal Clinical Investigation**. 112:398-406, 2003.
- ANWAR, J. et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adults rats. **Food and Chemical Toxicology** 56:459- 466, 2013.
- ARAUJO, A. P. S., SILVA. P. C. F., MOREIRA, R. C. P. S. BONILHA, S. F. Prevalência dos fatores de risco em pacientes com acidente vascular encefálico atendidos no setor de neurologia da clinica de fisioterapia da UNIPAR, campus sede. **Arquivos de Ciências Saúde Unipar** 12:35-42, 2008.
- ARAUJO, M. C. ROCHA, J. B. MORSCH, A. ZANIN, R. BAUCHPIESS, R. MORSCH V. M. SCHETINGER, M. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta** 170:421-426, 2005.
- ASLAM, M; SEDDING, D; KOSHTY, A; SANTOSO, S; SCHULZ, R; HAMM, C; GUNDUZ, D. Nucleoside triphosphates inhibit ADP, collagen, and epinephrine-induced platelet aggregation: Role of P2Y1 and P2Y12 receptors. **Thrombosis Research** 132: 548-557, 2013.
- ATKINSON, B. DWYER, K. ENJYOJI, K. ROBSON, S. C. Ecto-nucleotidase of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood cells, Molecules, and Diseases** 36:217-222, 2006.
- BARUZZI, A. C. A.; NUSSBACHER, A.; SOUZA, J. A. M.; Trombose venosa profunda. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia** 67(3):215-218, 1996.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and disorders of the central nervous system. **Nature** 7:575-590, 2008.

CAMERINO, S. R. A. S. LIMA, R. C. P. CALHEIROS, C. R. BARROSO, S. S. Cetoácidos redefinem a anemia e alteram biomarcadores de dano muscular em atletas após exercício prolongado. **VII Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. 2012.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 42: 321-332, 2006.

CATTANEO, M., GACHET, C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 2281-2285, 1999.

CEVIK, O.; ADLIGUZEL, Z.; BAYAKAL, A. T.; SOMAY, G.; SENER, A.; The apoptotic action of platelets in acute ischemic stroke. **Molecular Biology Reports** 40:6721-6727, 2013.

CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. **Revista Brasileira de Hipertensão** 7: 372-382, 2000.

CHEN, W., GUIDOTTI, G. Soluble apyrase release ADP during ATP hydrolysis. **Biochemical and Biophysical research communication**, 282:90-95, 2001.

CHERUBINI, A; RUGGIERO, C.; POLIDORI, A. C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Radical Biology & Medicine** 39: 841-852, 2005.

CRISTALLI, G. CONSTANZI, S. LAMBERTUCCI, C. LUPIDI, G. VITTORI, S. VOLPINI, R. CAMAIONI, E. Adenosine Deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, 21:105-128, 2001.

CUBRILLO-TUREK. M. Stroke risk factors: recent evidence and new aspects. **International Congress Series** 1262: 466-460, 2004.

DIRNALLG, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. **Trends Neuroscience** 22: 391-397, 1999.

FRANCO, R. CASADÓ, V. CIRUELA, F. SAURA, C. MALLOI, J. CANELA, E. I. LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology** 52:283-294, 1997.

FRASSETTO, S. S. SCHETINGER, M. R. C. WEBBER, A. SCHIERHOLT, R. BONAN, C. D. WYSE, A. T. DIAS, R. D. NETTO, C. A. SARKIS, F. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33: 1369-1377, 2000.

FREITAS, G. D. Reabilitação neurofuncional em paciente com hemiplegia espástica como sequela de AVC. **EFDesportes – Revista digital**, Nº 155, 2011.

GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. **Pharmacology and Therapeutics** 108: 180-192, 2005.

GONZAGA, W. D. S. 4,5, GOMES, L. P. S. 1,5, PRADO, E. S. Cevik, O.; ADL GUZEL, Z.; BAYAKAL, A. T.; SOMAY, G.; SENER, A. The apoptotic action of platelets in acute ischemic stroke. **Molecular Biology Reports** 40: 6721-6727, 2013.

GOSSELINK, R. et al. Physiotherapy for adult patients with critical illness: recommendations of the European Respiratory Society and European Society of Intensive Care Medicine Task Force on Physiotherapy for Critically Ill Patients. **Intensive Care Medicine** 34 (7):1188-1199, 2008.

GRESELE, P. et al. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. **Ed. Cambridge**. 2008.

GRYSIEWICZ, R. A.; THOMAS, K., PANDEY, D. K. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: Incidence, prevalence, mortality and risk factors. **Neurologic Clinics**, 26: 871-895, 2008.

HANDA, M. GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-Diphosphohydrolase (Apyrase) from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and biophysical research communication** 218:916-923, 1996.

HASKÓ, G. CROSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trend in immunology** 25(1), 2004.

HILLARY, A. J. RAVID, K. Adenosine and blood platelets. **Purinergic Signalling** 7: 357-365, 2011.

HOLMSEN, H. Nucleotide metabolism of platelets. **Annual Review Physiology** 47: 677-690, 1985.

JERRE, G. BERALDO et al. Fisioterapia no paciente sob Ventilação Mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** 19: 399-407, 2007.

JOHNSON BD, PADILLA J, WALLACE JP. The exercise dose affects oxidative stress and brachial artery flow-mediated dilation in trained men. **European Journal of Applied Physiology**, 2011.

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

KAWASHIMA, Y. NAGASAWA, T. NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood** 96:2157-2162, 2000.

LAVOIE, E. G. KUKULSKI, F. SEBASTIEN, A. LECKA, J. SEVIGNI, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. **Biochemical Pharmacology** 67:1917-1926, 2004.

LEAL, B.R et al Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase. CD39. EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1721: 9-15, 2005.

LIBBY P, OKAMOTO, Y; ROCHA, V. Z; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: Transition from theory to practice. **Circulation** 74:213-220. 2010.

LIBBY P, RIDKER P, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation** 105: 1135-43, 2002.

LO, H. DALKARA, T. MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Neuroscience** 4:399-416, 2003.

MARCUS, A; SAFIER, L. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. **The FASEB Journal** 6: 516-522, 1993.

MONHADAM, S. F. et al Hyperresponsiveness of platelets In ischemic stroke. **Platelets and Blood Cells** 97:974-978, 2007.

MORAES, P. L. O que é acidente vascular cerebral. Disponível em: <<http://www.mundoeducacao.com/doencas/o-que-acidente-vascular-cerebral.htm>> Acesso em: 03/02/2014.

MORAN, J.L.; BRISTOW P; SOLOMON PJ; GEORGE C; HART GK. Mortality and length-of-stay outcomes, 1993-2003, in the binational Australian and New Zealand intensive care adult patient database. **Crit Care Medicine** 36(1):.46-61, 2008.

MORRIS, P.E. Moving our critically ill patients: mobility barriers and benefits. **Crit Care Clinics** 23(1):1-20, 2007.

NANETTI, L et al. Platelet membrane fluidity and Na/K ATPase activity in acute stroke, **Brain Research** 1205:21-26, 2008.

NI, H; FREEDMANN, J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. **Transfusion and Apheresis Science** 28: 257-264, 2003.

OLIVEIRA, R. M. C., ANDRADE, L. A. F. Acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hipertensão** 8:280-290, 2001.

PINSKY, D. J. et al Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemia brain. **J. Clinical Investigation** 109: 1031-1040, 2002.

REBELO, J. M., JUNIOR, J. A. N. Exercícios passivos em indivíduos que sofreram AVE como uma proposta de tratamento. **Conexão** 7:84-88, 2010.

RIBEIRO, J. M. Prevenção secundária do acidente vascular cerebral. **Revista brasileira de hipertensão**, 10(2): 142-144, 2003.

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

ROWLAND, L. P. PEDLEY, t. a. Tratado de Neurologia. 12º ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro 2011. Cap. 40, 41, 44 e 46.

SANDOLI, D, CHIU, P., CHINTALA, M. DIONISOTTI, S., ONGINI, E. In vivo and ex vivo effects of adenosine A1 and A2 receptor agonist on platelet aggregation in the rabbit. **European Journal of Pharmacology** 259:43-49, 1994.

SHIBER, J. R. FONTANE, E. ADEWALE, A. Stroke registry: hemorrhagic vs ischemic stroke. **American Journal of Emergency Medicine** 28:331-333, 2010.

SHIBER, J. R.; FONTANE, E.; ADEWALW, A. Stroke registry: hemorrhagic vs ischemic strokes. **American Journal of Emergency Medicine**. 28: 331-333, 2008.

SILVA, A. C. MORSCH, A. L. B. ZANIN, R. F. CORREA, M. C. ARANTES, L. C. ARAUJO, M. C. MORSCH, V. M. SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: Relationship between hemostatic defects and renal failure severity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1741: 282-288, 2005.

SILVA, D, C. S., NASCIMENTO, C. F., BRITO, E. S. Efeitos da mobilização precoce nas complicações clínicas pós-avc. **Neurociências** 21:620-627, 2013.

SMITH, N. M. Platelets and stroke. **Vascular medicine**, 4(3):165-172, 1999.

SOUZA, V. C. G et al., Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of chagas disease. **Purinergic signaling** 8:753-762, 2012.

STAFFORD, N. et al Mechanisms involved in adenosine triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 23:1928-1933, 2003.

STAFFORD, N. P.; PINK, A. E.; WHITE, A. E.; GLENN, J. R.; Heptinstall, S. Mechanisms Involved in Adenosine triphosphate-Induced Platelet Aggregation in Whole Blood. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 23:1928-1933, 2003.

TAYLOR, C. P. BURKE, S. P. WEBER, M. L. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. **Journal of Neuroscience Methods** 59: 121-128, 1995.

TEIXEIRA- SAMELA, T. L., LIMA, L.A, MORAIS, S.G. GOULART, F. Assimetria e desempenho funcional em hemiplégicos crônicos antes e após programa de treinamento em academia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, 9(2): 227-233 2005.

TRÓCOLI, T. O., FURTADO, C. Fortalecimento muscular em hemiparéticos crônicos e sua influência no desempenho funcional. **Revista Neurociências** 17:336-341, 2008.

VALENTE, S. C. F. et al Resultados da fisioterapia hospitalar na função do membro superior comprometido após acidente vascular cerebral. **Revista Neurociências** 14(3):122-126, 2006.

WENDLAND, A. E., FARIAS, M. G., Manfro, W. C. Volume plaquetário médio e doença cardiovascular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 45(5), 2009.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**. 673-694, 2008.

ZEMKE, D. SMITH, J. L. REEVES, M. J. MAJID, A. Ischemia and Ischemic Tolerance in the Brain: an Overview. **Neuro Toxicology** 25:895-904, 2004.

ZÉTOLA, V. H. F. et al. Acidente vascular cerebral em pacientes jovens. **Arquivos de neuro-psiquiatria** 59:740-745, 2001.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Archives of Pharmacology**, 362: 299-309, 2000.