

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO RESVERATROL NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO NO SISTEMA PERIFÉRICO DE RATOS COM HIPOTIREOIDISMO**

JOSIANE TONEL DA COSTA ASSUMPCÃO<sup>1</sup>; ANA CAROLINA TEIXEIRA DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, JANAINA GONÇALVES TAVAREZ<sup>3</sup>, ANITA AVILA DE SOUZA<sup>4</sup>, JULIANE TORCHELSEN SARAIVA<sup>5</sup>, JUCIMARA BALDISSARELLI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – *josi.tonelcosta@gmail.com*

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – *anacarolinateixeira\_@live.com*

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – *jana.g.tavares@gmail.com*

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – *anita\_a\_avila@hotmail.com*

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – *julianetorchelsen@gmail.com*

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – *jucimarabaldissarelli@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

O hipotireoidismo é uma deficiência hormonal que ocorre a partir de um distúrbio na glândula tireoide, caracterizado por baixos níveis de hormônio tireoidiano (HT). É um dos distúrbios hormonais mais comuns no mundo, afetando cerca de 10% da população em geral. Os tratamentos utilizados visam manter níveis adequados de HT através da reposição de tiroxina (T4). Dada a complexidade e aos vários tipos de hipotireoidismo, determinar a dose correta do tratamento atual disponível para cada paciente torna-se um desafio (Mateo e Hennessey, 2019).

Nesse contexto, alterações no sistema purinérgico já foram relatadas em doenças que afetam o metabolismo, dentre elas o próprio hipotireoidismo (VARGAS; BURDI, 2010 e BALDISSARELLI, et al. 2017). Para este estudo foram elencadas duas enzimas pertencentes ao Sistema purinérgico: Diphosphohidrolase triphosfato nucleoside (NTPDase) e a Adenosina desaminase (ADA). A família da enzima NTPDase catalisa a hidrólise de ATP à ADP, podendo também formar AMP, enquanto que a ADA é uma enzima que catalisa a desaminação irreversível da adenosina à inosina. Essas enzimas são comumente encontradas na membrana celular das células do sistema imunológico, especialmente em linfócitos. É evidente que o nucleotídeo ATP é liberado por diferentes tipos celulares e ele é reconhecido por receptores purinérgicos específicos como um sinal de alerta e perigo, o que leva a uma variedade de respostas inflamatórias (BALDISSARELLI, et al. 2017).

Levando em consideração as dificuldades encontradas pelos pacientes para controlar o hipotireoidismo, vem crescendo a busca por tratamentos coadjuvantes que possam auxiliar no controle dos sintomas. Muito vem se discutindo sobre como os compostos de origem natural podem auxiliar neste processo. Nesse contexto o resveratrol tem se destacado graças as suas propriedades, que incluem atividade contra estresse oxidativo, inflamação, neurodegeneração, vários tipos de câncer e envelhecimento (GALINIAK, S. et al. 2018). E nesse estudo foi verificada a sua eficácia em controlar alterações originadas a partir do hipotireoidismo através da avaliação das atividades das enzimas: NTPDase, ADA e Butirilcolinesterase.

### **2. METODOLOGIA**

O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética, devidamente registrado sob o nº CEUA 12594-2020. Foram utilizados 30 ratos machos, com 60 dias

de vida, divididos em 3 grupos: Grupo controle (CTL); Grupo hipotireoidismo (Hipo) e Grupo hipotireoidismo tratado com resveratrol (Hipo+Resv.). O hipotireoidismo foi induzido pela administração de metimazol, *ad libitum*, em água. Após 30 dias de experimento, os ratos foram eutanasiados e coletados os materiais para as análises.

Leucócitos mononucleares foram isolados do sangue coletado com EDTA e separados em gradientes de densidade Ficoll-Histopaque, conforme descrito por Böyum (1968). O soro foi obtido através de centrifugação do sangue por 15 minutos a 3.500 rpm.

O ensaio enzimático da NTPDase foi realizado em meio de reação contendo CaCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, glicose e tampão Tris-HCl, pH 7,4, em um volume final de 200 µL, conforme descrito por Leal *et al* (2005). Vinte microlitros da preparação enzimática (8-12 µg de proteína) foram adicionados à mistura reacional e pré-incubados durante 10 min a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de ATP em uma concentração final de 1,0 mM.

A quantidade de ADA no soro foi determinada de acordo com Guisti e Galanti (1984), com base no método de Bertholet reação. Resumidamente, 25 µL de soro foram feitos reagir com 21 mmol/L de adenosina, pH 6,5, e incubados a 37°C durante 60 min. A concentração de proteína foi ajustada entre 0,6 e 0,8 mg/mL. Os resultados são expressos em U/L. Uma unidade (1 U) de ADA é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de amônia por minuto da adenosina, em condições de ensaio padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito do resveratrol na atividade da enzima NTPDase em soro e linfócitos

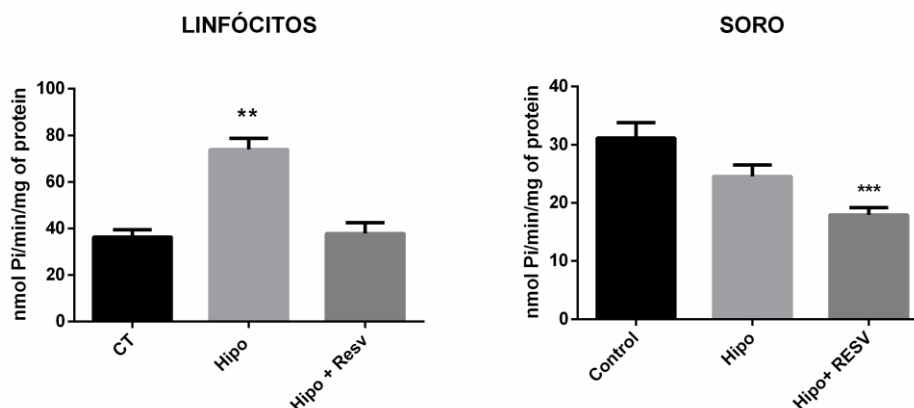


Figura 2 e 3: Os dados estão expressos como média ± S.E.M. (n = 8). \*\* e \*\*\* denotam P < 0,01 e P < 0,001, respectivamente, em comparação com o grupo Controle. ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Tukey foi usada.

A atividade da enzima NTPDase utilizando ATP como substrato mostrou-se aumentada nos linfócitos de animais com hipotireoidismo e não apresentou diferenças significativas em soro dos mesmos animais. Por outro lado, o resveratrol foi capaz de modular a atividade enzimática em ambos, linfócitos e soro, prevenindo

o aumento da atividade enzimática e demonstrando, assim, o potencial protetor deste composto, ao impedir uma desregulação da cascata purinérgica e consequentemente nos níveis de nucleotídeos.

### 3.2 Efeito do resveratrol na atividade da enzima Adenosina Desaminase em soro de ratos com hipotireoidismo.

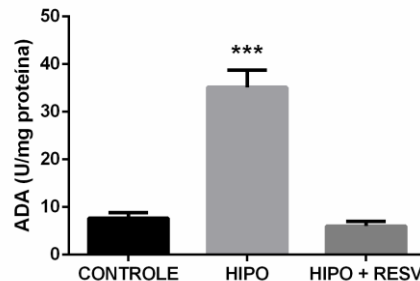


Figura 4: Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.E.M. (n = 8). \*\*\* denota  $P < 0,001$  em comparação com o grupo Controle. ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Tukey foi usada.

A atividade da enzima Adenosina desaminase (ADA) apresentou-se significativamente elevada nos animais com hipotireoidismo e, interessantemente, o resveratrol foi capaz de prevenir esse aumento e, assim, os animais do grupo que recebeu o tratamento apresentaram atividade da ADA semelhantes ao grupo controle. Esta pode ser uma importante via de ação deste composto fenólico, ao preservar os níveis do nucleosídeo adenosina, uma molécula com propriedades anti-inflamatória, cardioprotetora e neuroprotetora e impulsiona a realização de mais estudos para entender mais profundamente este mecanismo.

## 4. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados é possível observarmos os efeitos benéficos do resveratrol no hipotireoidismo ao diminuir as atividades das enzimas NTPDase e adenosina desaminase, o que poderia alterar os níveis de ATP e adenosina, demonstrando a sua capacidade de modular a sinalização purinérgica. Mas, acredita-se que sejam necessários estudos posteriores para que se possa compreender melhor a ação do resveratrol no sistema purinérgico e como isso auxiliaria no tratamento dos sintomas provenientes do hipotireoidismo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSARELLI, J.; SANTI, A.; SCHMATZ, R. et al. Hypothyroidism Enhanced Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Activities in Rat Synaptosomes can be Prevented by the Naturally Occurring Polyphenol Quercetin. **Cell Mol Neurob.** v.37, n.1, 2017.

BIONDI, B., COOPER, D., 2019. Thyroid hormone therapy for hypothyroidism. **Endocrine** 66, 18–26.

BöYUM A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest** 1968; 97:77–89.

GALINIAK S, AEBISHER D, BARTUSIK- AEBISHER D. Benefícios de saúde da administração resveratrol. **Acta Biochim Pol.** 2019 Fev 28;66(1):13-21.

GIUSTI, B.; GALANTI, B., Colorimetric Method, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.

HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTINEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proc Nutr Soc.** v. 71, n. 2, p.332-338, 2012.

LEAL D.B., STREHER C.A., NEU T.N., et al. Characterization of NTPDase (NTP-Dase1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C 3. 6. 1. 5) activity in human lymphocytes. **Biochim Biophys Acta** 2005; 1721:9–11.

MATEO, R.C.I, HENNESSEY, J., 2019. Tiroxina e tratamento do hipotireoidismo: sete décadas de experiência. **Endocrino** 66, 10 - 17.

VARGAS, A.J, BURD R., Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management, **Nutrition Reviews**, Volume 68, Issue 7, 1 July 2010, Pages 418–428.