

POTENCIAL PROTETOR DO EXTRATO DE MIRTILO NA MODULAÇÃO PURINÉRGICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPOTIREOIDISMO INDUZIDO EM RATOS

LARA VALENTE FARIAS¹; EDUARDA RIVERO²; FERMINA FRANCESCA ALVES VARGAS²; LUIZA SPOHR²; THIAGO ALVES VARGAS²; JUCIMARA BALDISSARELLI³

¹Universidade Federal de Pelotas – laravalente2@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – eduarda01@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ffrancescaavargas@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – thiagoovargas@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jucimarabaldissarelli@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As ectoenzimas NTPDase (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) e 5'-NT (5'-nucleotidase) exercem papel central na regulação da degradação de nucleotídeos extracelulares, como ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato) e AMP (adenosina monofosfato), culminando na formação de adenosina (Ado) (Zimmermann, 2021). Essas enzimas podem ser expressas em diferentes tipos celulares, como células endoteliais, linfócitos e plaquetas (Castilhos *et al.*, 2016), sendo uma via de modulação de importantes processos fisiológicos e patológicos, incluindo agregação plaquetária, controle do tônus vascular e resposta inflamatória (Stabile; Fürstenau, 2024).

No contexto do hipotireoidismo, evidências apontam para a ocorrência de modificações no metabolismo energético e função plaquetária, comprometendo a dinâmica dessas enzimas (Baldissarelli *et al.*, 2018). Essas mudanças favorecem o estabelecimento de disfunção endotelial, bem como a maior predisposição ao desenvolvimento de aterosclerose e eventos trombóticos (Chaurasia *et al.*, 2020). Nesse sentido, a atividade da NTPDase e da 5'-NT pode representar um elo importante entre a disfunção tireoidiana e o risco cardiovascular elevado.

Compostos naturais, têm despertado crescente interesse da comunidade científica, devido às suas propriedades biológicas. O mirtilo, é um fruto pertencente à família Ericaceae, rico em polifenóis, como o resveratrol e antocianinas (Kalt *et al.*, 2020). Esses compostos apresentam efeitos antioxidantes e cardioprotetores já descritos em diferentes modelos, embora pouco se saiba sobre seu impacto em distúrbios tireoidianos, como o hipotireoidismo (Kšonžeková *et al.*, 2016; Shahwan *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2020). Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do extrato de mirtilo sobre a atividade da NTPDase e 5'-NT em um modelo experimental de hipotireoidismo induzido em ratos.

2. METODOLOGIA

O experimento obteve aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) sob o nº de protocolo 12594-2020. Foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos, provenientes do Biotério Central da UFPeL, divididos em três grupos: Controle (CT), Hipotireoidismo e Hipotireoidismo + Extrato de mirtilo (MIRTILO). Para a indução do hipotireoidismo,

o fármaco antitireoidiano MTZ (metimazol) foi administrado *ad libitum* na água de beber dos animais a uma concentração de 20 mg/ml, durante 30 dias (Baldissarelli *et al.*, 2016). O extrato de mirtilo foi administrado via gavagem oral, na concentração de 200 mg/kg pelo mesmo período (Spohr *et al.*, 2018). Os animais do grupo CT e HIPO receberam apenas solução salina.

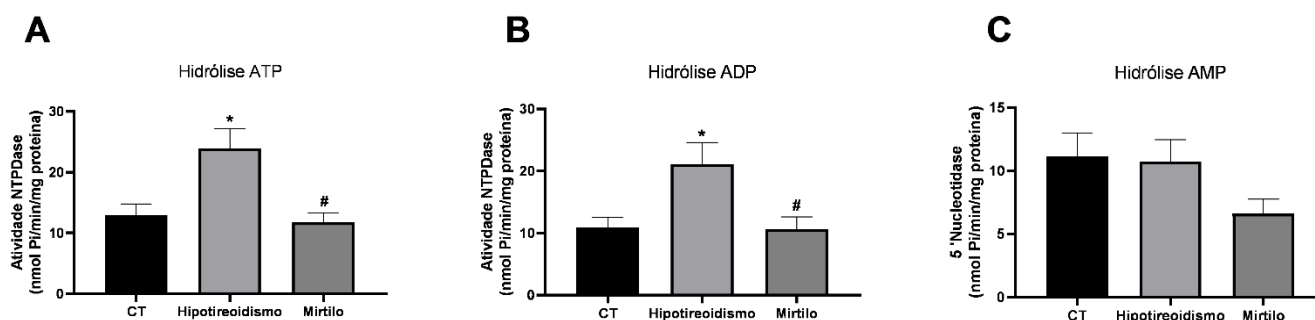
Após as 4 semanas de execução do protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia sob atmosfera de isoflurano e o sangue total colhido por punção cardíaca. As plaquetas foram preparadas pelo método de (Pilla *et al.*, 1996) modificado por (Lunkes *et al.*, 2004) e as atividades das enzimas NTPDase e 5'-NT foram determinadas segundo (Lunkes *et al.*, 2004), com modificações segundo (Baldissarelli *et al.*, 2017). Atividades enzimáticas específicas estão expressas como nmol de Pi liberado/min/mg de proteína.

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade das enzimas NTPDase e 5'-NT são mostrados na Figura 1. A hidrólise de ATP e ADP (Fig. 1 A e B) pela NTPDase foi significativamente aumentada no grupo Hipotireoidismo em comparação com o grupo CT. O extrato de mirtilo preveniu este aumento no grupo Mirtilo em comparação ao grupo Hipotireoidismo. Já a hidrólise de AMP pela 5'-NT (Fig. 1 C) não resultou em diferença estatística, sugerindo a hipótese de que efeito do extrato de mirtilo possa ser mais pronunciado nas etapas iniciais da cascata, ou específico sobre a enzima NTPDase.

Figura 1. Efeitos do extrato de mirtilo na sobre a atividade da NTPDase e 5'-NT em plaquetas de ratos com hipotireoidismo.



Hidrólise de ATP (A), ADP (B) e AMP (C). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo CT são indicadas por * ($p < 0,05$) e diferenças em relação ao grupo Hipotireoidismo são expressas por # ($p < 0,05$).

Alterações tireoidianas costumam provocar desequilíbrios metabólicos, sendo o hipotireoidismo associado a um maior risco de eventos cardiovasculares (Balasubramanian; Mehmood; Al-baldawi, 2024). Essas alterações metabólicas podem comprometer a função das plaquetas, importantes fontes de moléculas de sinalização purinérgica no organismo (Stabile; Fürstenau, 2024).

As plaquetas são fragmentos de células com funções relacionadas à hemostasia, coagulação e inflamação (Chaudhary; Kim; Kim, 2022), cuja ativação depende de inúmeros fatores, com destaque para componentes da sinalização

purinérgica, ATP, ADP e Ado (Stabile; Fürstenau, 2024). A ativação plaquetária excessiva pode levar a complicações trombóticas e consequentemente, a problemas em órgãos vitais (Chaurasia *et al.*, 2020). Adicionalmente, em concentrações micromolares, ADP pode induzir agregação plaquetária (Diamond *et al.*, 2013). Nesse sentido, as ectonucleotidases, capazes de hidrolisar ATP, ADP e AMP são de fundamental relevância na ativação plaquetária.

Nossos resultados corroboram com estudos prévios, que associam o hipotireoidismo à alteração na cascata purinérgica e à disfunção endotelial (Baldissarelli *et al.*, 2018, 2020; Razvi *et al.*, 2018). O estudo de Baldissarelli *et al.* (2016), demonstrou que a quercetina, um flavonoide presente em várias plantas, também exerce um efeito modulador da atividade de NTPDase e 5'-NT em modelo de hipotireoidismo. Embora, o presente estudo não tenha investigado a quercetina, especificamente, a presença de compostos fenólicos no extrato, pode contribuir para os efeitos observados.

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que o hipotireoidismo induzido por MTZ ocasiona alterações significativas na hidrólise dos nucleotídeos ATP e APD em plaquetas de ratos. Esses dados reforçam a hemostasia anormal imposta por este distúrbio, entretanto, a administração do extrato de mirtilo foi capaz de reduzir a hidrólise destes nucleotídeos, indicando um efeito modulador, provavelmente pelos compostos presentes no extrato.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALASUBRAMANIAN, Sneha; MEHMOOD, Khawar T; AL-BALDAWI, Shahad. Hypothyroidism and Cardiovascular Disease : A Review. **Cureus**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–10, 2024.

BALDISSARELLI, Jucimara *et al.* Hypothyroidism and hyperthyroidism change ectoenzyme activity in rat platelets. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 119, n. 7, p. 6249–6257, 2018.

BALDISSARELLI, Jucimara *et al.* Increased cytokines production and oxidative stress are related with purinergic signaling and cell survival in post-thyroidectomy hypothyroidism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 499, n. September 2019, p. 110594, 2020.

BALDISSARELLI, Jucimara *et al.* Post-thyroidectomy hypothyroidism increases the expression and activity of ectonucleotidases in platelets : Possible involvement of reactive oxygen species. **Platelets**, [s. l.], v. 00, n. 00, p. 1–10, 2017.

BALDISSARELLI, Jucimara *et al.* Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 84, p. 1849–1857, 2016.

CASTILHOS, Livia G. *et al.* Altered E-NTPDase/E-ADA activities and CD39 expression in platelets of sickle cell anemia patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 79, p. 241–246, 2016.

CHAUDHARY, Preeti Kumari; KIM, Sanggu; KIM, Soochong. An Insight into Recent Advances on Platelet Function in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 11, 2022.

CHAURASIA, Susheel N. *et al.* Human platelets express functional ectonucleotidases that restrict platelet activation signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 527, n. 1, p. 104–109, 2020.

DIAMOND, Scott L. *et al.* Systems biology of platelet-vessel wall interactions. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], n. August, p. 1–9, 2013.

KALT, Wilhelmina *et al.* Recent Research on the Health Benefits of Blueberries and Their Anthocyanins. **American Society for Nutri**, [s. l.], p. 224–236, 2020.

KŠONŽEKOVÁ, Petra *et al.* In vitro study of biological activities of anthocyanin-rich berry extracts on porcine intestinal epithelial cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 1093–1100, 2016.

LUNKES, Gilberto I.L. *et al.* NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 1–6, 2004.

PILLA, C. *et al.* ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 225–230, 1996.

RAZVI, Sakman *et al.* Thyroid Hormones and Cardiovascular Function and Diseases. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 71, n. 16, 2018.

SHAHWAN, Moyad *et al.* Role of polyphenols in combating Type 2 Diabetes and insulin resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 206, n. January, p. 567–579, 2022. D

SONG, Jenn-yeu *et al.* Influence of Resveratrol on the Cardiovascular Health Effects of Chronic Kidney Disease. **Molecular Sciences**, [s. l.], 2020.

SPOHR, Luiza *et al.* Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], p. 605–619, 2018.

STABILE, Jeferson; FÜRSTENAU, Cristina Ribas. Platelets isolation and ectonucleotidase assay: Revealing functional aspects of the communication between the vasculature and the immune system. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 533, n. August, p. 113746, 2024.

ZIMMERMANN, Herbert. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. **Purinergic Signalling**, [s. l.], p. 117–125, 2021.