

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

JUCIMARA BALDISSARELLI

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO, COLINÉRGICO E
ESTRESSE OXIDATIVO NOS DISTÚRBIOS DA TIREOIDE:
POSSÍVEL EFEITO PROTETOR DA QUERCETINA**

Santa Maria, RS

2017

Jucimara Baldissarelli

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO, COLINÉRGICO E ESTRESSE
OXIDATIVO NOS DISTÚRBIOS DA TIREOIDE: POSSÍVEL EFEITO PROTETOR
DA QUERCETINA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor(a) em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Roberta Schmatz

Santa Maria, RS

2017

Jucimara Baldissarelli

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO, COLINÉRGICO E ESTRESSE
OXIDATIVO NOS DISTÚRBIOS DA TIREOIDE: POSSÍVEL EFEITO PROTETOR
DA QUERCETINA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor(a) em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em: 22 de fevereiro de 2017

**Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

Daniela Bitencourt Rosa Leal (UFSM)

Elizandra Braganhol (UFCSPA)

Margarete Dulce Bagatini (UFFS)

Marina Prigol (UNIPAMPA)

**Santa Maria, RS, Brasil
2017**

Esta tese é dedicada aos meus amores: minha mãe,
meu pai e minha irmã. Se hoje concluo mais esta etapa
foi porque eles sempre estiveram presentes,
acreditando, estimulando e torcendo com muito
carinho e amor.

Agradecimentos

Tão importante quanto o trabalho realizado é a gratidão a todas as pessoas que contribuíram para que ele que fosse possível...

À minha orientadora, professora Maria Rosa, por ser parte fundamental no meu desenvolvimento científico, por acreditar nos seus alunos, incentivá-los e ser um exemplo de pessoa e de dedicação, obrigada profe!

À professora Vera, pelo exemplo de ética, profissionalismo e bom humor para lidar com os problemas do dia-a-dia. Se eu levar um pouco de cada uma de vocês certamente encerro esta etapa como pessoa e profissional melhor!

À minha co-orientadora Roberta, amiga querida que levo para a vida, e que me mostrou que podemos sim conseguir o que queremos, obrigada por tudo!

À Micheli, uma grande amiga que a vida me trouxe, obrigada pelo auxílio neste trabalho e por ser essa pessoa sempre tão disposta a ajudar, otimista e com um coração lindo, saiba que te considero um exemplo!

Às professoras que disponibilizaram seu tempo e conhecimentos para ler e avaliar este trabalho, muito obrigada!

Aos meus pais Ana e Clademir: ter vocês comigo neste momento é um privilégio, e eu farei sempre o meu melhor para agradecê-los por terem me proporcionado estar aqui. Obrigada pelo exemplo de vida, pelo amor, pela preocupação e incentivo nos momentos de dúvida, vocês nem imaginam o quanto isso é importante! Amo vocês!

À minha irmã Maiara, que depois de sentir a distância passou a novamente ser parte do meu dia-a-dia. Obrigada por aguentar minhas chatices, reclamações e por estar sempre do meu lado, pronta para um abraço, um mate, uma doação de sangue (só um pouquinho...), uma comida fit ou “estranha” (Obrigada ao Fernando também!). Que sorte a nossa! Te amo fofinha!

Às minhas queridas Farmacêuticas, que de longe ou de perto estão sempre presentes e dão sentido à palavra amizade, obrigada!

Aos meus amigos e colegas do Enzitox: todos vocês fazem parte disso, cada um, de alguma forma colaborou para que essa etapa fosse concluída, por isso: Muito obrigada! Tenho certeza que parcerias como essas não se encontram em todo lugar, esses anos de convivência, com muito trabalho, preocupações, alegrias, mates e conquistas marcaram para sempre minha vida! E meninas: não importa aonde estivermos, sempre levarei o carinho de vocês, contem comigo para o que precisarem!

Às amigas que o destino escolheu e que fizeram do 310, em cada uma das suas versões, um apartamento sempre cheio de alegria. Obrigada por dividirem comigo essa fase da vida, os problemas e as conquistas, e serem uma grande família com quem pude contar!

A todos que de alguma forma auxiliaram durante esse período, na realização das técnicas, na escrita dos artigos, na troca de ideias, ou mesmo torcendo e apoiando, o meu agradecimento. Em especial ao Pablo, pelo carinho, paciência e incentivo cada vez que eu desanimei, obrigada!

Aos pacientes que fizeram parte desse trabalho, por compartilharem suas histórias, se disponibilizarem e acreditarem na pesquisa, muito obrigada!

À UFSM e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO, COLINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO NOS DISTÚRBIOS DA TIREOIDE: POSSÍVEL EFEITO PROTETOR DA QUERCETINA

AUTORA: Jucimara Baldissarelli

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina Schetinger

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Roberta Schmatz

Os hormônios tireoídianos modulam as rotas metabólicas no organismo e apresentam funções fisiológicas importantes no cérebro e sistema vascular. Alterações na sua produção ou distribuição levam a distúrbios como o hipotireoidismo e o hipertireoidismo, os quais estão relacionados à mudanças na função endotelial, contribuindo para uma maior incidência de doenças vasculares, além de possuírem relação com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, no Sistema Nervoso Central (SNC), o envolvimento dos sistemas purinérgico e colinérgico nos distúrbios tireoídianos vem ganhando importância. Adenosina trifosfato (ATP) e acetilcolina (ACh) são moléculas de sinalização extracelular no SNC e outros tecidos que ao serem liberadas são degradadas pela ação das ectonucleotidases e da acetilcolinesterase (AChE), respectivamente. Juntamente com o ATP, o ADP, o AMP e a adenosina (Ado) regulam processos fisiológicos como a agregação plaquetária e o tônus vascular. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com quercetina na atividade das ectonucleotidases e da AChE em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos com hipotireoidismo. Além disso, avaliar a atividade e expressão das ectonucleotidases em plaquetas e biomarcadores de estresse oxidativo em modelo experimental de hipotireoidismo e hipertireoidismo e em pacientes com hipotireoidismo pós-tireoidectomia. O hipotireoidismo e o hipertireoidismo nos modelos animais foram induzidos pela administração de metimazol ou L-Tiroxina, respectivamente, durante 30 dias. O tratamento com quercetina 10 ou 25 mg/kg iniciou após a indução do hipotireoidismo ser confirmada e seguiu-se por 60 dias concomitantemente à administração de metimazol. As coletas dos pacientes foram realizadas aproximadamente 45 dias após a tireoidectomia. Os resultados demonstraram que o hipotireoidismo causou uma diminuição na atividade da AChE em sinaptossomas de córtex cerebral e o tratamento com quercetina manteve essa atividade diminuída. Testes *in vitro* confirmaram a inibição da AChE proporcional à dose de quercetina testada, o que sugere que ela poderia ser utilizada como adjuvante no tratamento de distúrbios neurológicos. A atividade da NTPDase não foi alterada no hipotireoidismo, mas a hidrólise de AMP pela ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) aumentou. O tratamento com quercetina causou uma diminuição nas atividades da NTPDase, E-5'-NT e adenosina desaminase (ADA), o que poderia contribuir para níveis moderadamente aumentados de Ado no SNC. Como a Ado atua como uma molécula neuroprotetora esse pode ser um dos mecanismos pelos quais a quercetina exerce os seus efeitos benéficos no SNC. Os resultados encontrados em plaquetas mostraram uma diminuição nas atividades da NTPDase e E-5'-NT e um aumento nos níveis de ATP, ADP e AMP em animais com hipertireoidismo. Já os níveis de Ado foram menores, o que pode ser atribuído à atividade reduzida da 5'-NT e aumentada da ADA. Os animais com hipotireoidismo apresentaram diminuição apenas na atividade da E-5'-NT e aumento nos níveis de AMP, o que pode ser devido à maior hidrólise de ATP a AMP pela ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPP), que aumentou em ambos os grupos. No terceiro trabalho desta tese os resultados mostraram um aumento nas atividades das enzimas do sistema purinérgico em pacientes com hipotireoidismo. Além disso, a expressão de NTPDase 1 (CD39) também foi maior, indicando que o impacto da remoção da tireoide pode causar mudanças importantes a nível molecular. Os níveis de Ado foram menores nos pacientes e a atividade da ADA aumentada. Observamos também alterações nos parâmetros redox como: aumento na produção de ERO, na peroxidação lipídica, na carbonilação de proteínas, nos níveis de T-SH, NPSH e ácido ascórbico, além de diminuição da atividade da GST. Sugerimos com esses resultados que o estresse oxidativo apresentado por pacientes possui relação com o aumento na atividade das ectonucleotidases e da ADA, o que foi demonstrado pela correlação positiva entre a produção de ERO e as atividades enzimáticas. Por fim, os resultados apresentados podem ajudar a compreender as alterações metabólicas que ocorrem nos distúrbios da tireoide, com o envolvimento dos sistemas purinérgico e colinérgico e do estresse oxidativo, e a buscar terapias que previnam o agravamento das doenças.

Palavras-chave: hipotireoidismo; hipertireoidismo, ectonucleotidases, estresse oxidativo, quercetina

ABSTRACT

INVOLVEMENT OF PURINERGIC AND COLINERGIC SYSTEMS AND OXIDATIVE STRESS IN THYROID DISORDERS: POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF QUERCETIN

AUTHOR: Jucimara Baldissarelli

ADVISER: Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosa Chitolina Schetinger

CO-ADVISER: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Schmatz

Thyroid hormones modulate the metabolic pathways in the body and have important physiological functions in the brain and vascular system. Changes in their production or distribution lead to disorders such as hypothyroidism and hyperthyroidism, which are related to modifications in endothelial function, contributing to a higher incidence of vascular diseases, besides being related to reactive oxygen species production (ROS). Moreover, in the Central Nervous System (CNS), the involvement of purinergic and cholinergic systems in thyroid disorders has been gaining significance. Adenosine triphosphate (ATP) and acetylcholine (ACh) are extracellular signaling molecules in the CNS and other tissues that upon release are degraded by the action of ectonucleotidases and acetylcholinesterase (AChE), respectively. Together with the ATP, ADP, AMP and adenosine (Ado) regulate physiological processes such as platelet aggregation and vascular tone. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of quercetin on ectonucleotidase and AChE activities in the synaptosomes of the cerebral cortex of rats with hypothyroidism. Moreover, to evaluate the activity and expression of ectonucleotidases in platelets and biomarkers of oxidative stress in experimental model of hypothyroidism and hyperthyroidism and in patients with post thyroidectomy hypothyroidism. Hypothyroidism and hyperthyroidism in animal models were induced by administration of methimazole or L-Thyroxine, respectively, for 30 days. Treatment with quercetin 10 or 25 mg/kg started after that the hypothyroidism induction was confirmed and followed for 60 days. Patient collections were performed approximately 45 days after thyroidectomy. The results demonstrated that hypothyroidism caused a decrease in AChE activity in synaptosomes of cerebral cortex and quercetin treatment maintained this activity decreased. *In vitro* tests confirmed the inhibition of AChE proportional to the quercetin's dose tested, suggesting that quercetin could be used as adjuvant in the treatment of neurological disorders. NTPDase activity was not altered in hypothyroidism, but the hydrolysis of AMP by ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) increased. Treatment with quercetin caused a decrease in the activities of NTPDase, E-5'-NT and adenosine deaminase (ADA), which could contribute to moderately increased levels of Ado in the CNS. As Ado acts as a neuroprotective molecule this may be one of the mechanisms by which quercetin exerts its beneficial effects on the CNS. The results found in platelets showed a decrease in the activities of NTPDase and E-5'-NT and an increase in ATP, ADP and AMP levels in animals with hyperthyroidism. However, Ado levels were lower, which can be attributed to the reduced 5'-NT and increased ADA activities. Animals with hypothyroidism showed only a decrease in E-5'-NT activity and an increase in AMP levels, which may be due to the greater hydrolysis of ATP to AMP by ectonucleotidase/phosphodiesterase (NPP), which increased in both groups. In the third work of this thesis, the results showed an increase in the activities of the enzymes of the purinergic system in patients with hypothyroidism. In addition, the expression of NTPDase 1 (CD39) was also higher, indicating that the impact of thyroid removal may cause important changes at the molecular level. Ado levels were lower in patients and ADA activity was increased. We also observed changes in redox parameters such as: increased ROS production, lipid peroxidation, protein carbonylation, T-SH, NPSH and ascorbic acid levels, as well as decreased GST activity. We suggest with these results that the oxidative stress presented by patients is related to the increase in the activity of the ectonucleotidases and the ADA, which was demonstrated by the positive correlation between the ROS production and the enzymatic activities. Finally, the presented results can help to understand the metabolic alterations that occur in thyroid disorders, with the involvement of the purinergic and cholinergic system and of the oxidative stress, and to seek therapies that prevent the aggravation of the diseases.

Keywords: hypothyroidism; hyperthyroidism, ectonucleotidases, oxidative stress, quercetin

“Aprendi que a vida, apesar de bruta, é meio mágica. Dá sempre para tirar um coelho da cartola. E lá vou eu, nas minhas tentativas, às vezes meio cegas, às vezes meio burras, tentar acertar os passos. Sem me preocupar se a próxima etapa será o tombo ou o voo. Eu sei que vou. Insisto na caminhada. O que não dá é para ficar parado. Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da cartola. E refaço. Colo. Pinto e bordo. Porque a força de dentro é maior. Maior que todo mal que existe no mundo. Maior que todos os ventos contrários. É maior porque é do bem.
E nisso, sim, acredito até o fim...”

Caio Fernando Abreu

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Localização da glândula tireoide	19
Figura 2 - Esquema da produção dos hormônios tireoidianos T3 e T4	20
Figura 3 - Estrutura química dos hormônios da tireoide	21
Figura 4 - Mecanismo de regulação dos hormônios	22
Figura 5 - Acetilcolina: Produção, liberação, degradação e interação com receptores colinérgicos	26
Figura 6 – Visão geral do sistema purinérgico	30
Figura 7 - Membros da família das enzimas NTPDases	31
Figura 8 - Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e seus alvos biológicos	35
Figura 9 - Estrutura química geral dos flavonoides	38
Figura 10 - Estrutura do flavonoide quercetina	39

ARTIGO

Figure 1. Effects of hypothyroidism on NTPDase using ATP (A) and ADP (B) as substrate, 5'-nucleotidase using AMP (C), adenosine deaminase (D) and acetylcholinesterase (E) activities in the first month of the treatment. The data are presented as the means \pm SEM ($P < 0.05$; $n=5$).....	66
Figure 2. Effects of quercetin on NTPDase using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase using AMP (C) as substrate in the synaptosomes of rats with MMI-induced hypothyroidism. The data are presented as the means \pm SEM. * and *** represent a significant difference with the CT/W group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively; $n=8$). # and ### represent a significant difference with the MMI/W group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$; $n=8$).....	67
Figure 3. <i>In vitro</i> effects of quercetin on ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in the synaptosomes of the rat cerebral cortex. The first bars represent the control. The other bars represent different concentrations of quercetin (μM). Each column represents a mean \pm SEM. The results are expressed as $\text{nmol/Pi/min/mg protein}$. Different letters indicate significant differences from the control ($P < 0.05$; $n=5$).....	68
Figure 4. Effects of quercetin on ADA activity in the synaptosomes of rats with MMI-induced hypothyroidism. The bars represent the means \pm SEM. *** represents a significant difference with the CT/W group and ### represents a significant difference with the MMI/W group ($P < 0.001$; $n=8$).....	69
Figure 5. Effects of quercetin on AChE activity in the synaptosomes of rats with MMI-induced hypothyroidism. The bars represent the means \pm SEM. * and *** represent a significant difference with the CT/W group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively; $n=8$).....	69

Figure 6. *In vitro* effects of quercetin on the AChE activity in the synaptosomes of the rat cerebral cortex. The first bar represents the control. The other bars represent different concentrations of quercetin (μM). Each column represents a mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences from the control ($P < 0.05$; $n=5$)..... 70

MANUSCRITO 1

Figure 1. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on NTPDase, using ATP (A) and ADP (B) as substrate and ecto-5'-nucleotidase using AMP (C) as substrate in platelets of rats. Data are presented as means \pm SEM. *** Indicates a significant difference between the control group and the group with hypothyroidism or hyperthyroidism ($P < 0.05$; $n=5$)..... 93

Figure 2. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on ADA and NPP activities in platelets of rats. Data are presented as means \pm SEM. *** Indicates a significant difference between the control group and the group with hypothyroidism or hyperthyroidism. ($P < 0.05$; $n=10$) 94

Figure 3. Levels of reactive oxygen species (ROS) in serum of MMI-induced hypothyroidism and T4-induced and hyperthyroidism. Data are expressed as means \pm SEM. * Indicates a significant difference between the control group and the group with hypothyroidism or hyperthyroidism. ($P < 0.05$, $n= 5$) 94

Figure 4. Pearson's correlation analysis between Ado concentration and ADA activity (A) ($P < 0.05$) or between Ado concentration and ROS levels (B) ($P < 0.05$), or between ROS levels and ADA activity (C). ($P < 0.05$); ($n=4$) 95

MANUSCRITO 2

Figure 1. NTPDase activity using ATP (A) or ADP (B) as substrate and ecto-5'-nucleotidase using AMP (C) as substrate in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; $n=45$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism 131

Figure 2. NTPDase (CD39) and 5'-nucleotidase (CD73) expression by flow cytometry in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. A) Representative 3D-dot-plot for CD61 FITC (platelet-specific antibody), forward (FSC) and side (SSC) light scatter. Gates were set to select the platelet population. B) Representative flow cytometry histograms show staining with CD39 APC and CD73 PE antibodies in platelets of healthy subjects and patients. Data are expressed as mean percentages \pm SEM (C) or mean expression levels \pm SEM (D) of these ectonucleotidases estimated by mean fluorescence intensity (MFI) for each sample ($P < 0.05$; $n=20$). *Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism 132

Figure 3. ADA activity in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; $n=45$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism	132
Figure 4. Levels of reactive oxygen species (ROS) in serum of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; $n=45$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism	133
Figure 5. Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in platelets and proteic carbonylation in serum of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; $n=35$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism	133
Figure 6. Ascorbic acid levels and GST activity in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.01$; $n=40$) and ($P < 0.05$; $n=35$) respectively. ** And *indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism	133
Figure 7. T-SH and NPSH levels in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; $n=35$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.....	134
Figure 8. Pearson's correlation analysis between ROS levels and NTPDase activity for ATP (A) ($P < 0.01$) or ADP (B) ($P < 0.05$) hydrolysis, ecto-5'-nucleotidase (C) ($P < 0.01$) and ADA (D) activities ($P < 0.001$), or between ROS levels and TBARS levels (E) ($P < 0.05$) and protein carbonylation (F) ($P < 0.01$) ($n=12$)	134

LISTA DE ABREVIACOES

ACh - acetilcolina
AChE - acetilcolinesterase
ADA - adenosina desaminase
Ado - adenosina
ADP - adenosina difosfato
AMP - adenosina monofosfato
ANOVA - análise de variância
ATP - adenosina trifosfato
CAT - catalase
EDTA - cido etilenodiaminotetracético
ERO - espécies reativas de oxigênio
E-5'-NT - ecto-5'- nucleotidase
NTPDase - nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
NPP - Nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
NPSH - tióis não-proteicos
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HTs - hormônios tireoidianos
MDA - malondialdeído
MMI - metimazol
PRP - plasma rico em plaquetas
SNP - sistema nervoso periférico
SNC - sistema nervoso central
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPO - tireoperoxidase
TRH - hormônio liberador de tireotrofina
TSH - hormônio estimulante da tireoide
T-SH - tióis totais
T3 - triiodotireonina
T4 - tiroxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 CAPÍTULO I	43
4.2 CAPÍTULO II	75
4.3 CAPÍTULO III	103
5. DISCUSSÃO	135
6. CONCLUSÕES	141
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
8. ANEXO I	154
9. ANEXO II	156

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo científico e dois manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo. Os itens Discussão e Conclusões encontram-se no final desta tese e apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos contidos neste trabalho. As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica e discussão. Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para a quais serão submetidos.

Descrição dos objetivos específicos e produtos obtidos mediante a execução dos experimentos:

Objetivo específico	Produto	Situação
Avaliar o efeito da quercetina na atividade das enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos com hipotireoidismo.	Artigo: “Hypothyroidism enhanced ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in rat synaptosomes can be prevented by the naturally occurring polyphenol quercetin”	Publicado na revista Cellular and Molecular Neurobiology, V 37, 1:53-63, 2017.
Investigar a hidrólise dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em plaquetas, seus níveis no soro e sua relação com a produção de ERO em ratos com hipertireoidismo e hipotireoidismo	Manuscrito 1: “Hypothyroidism and hyperthyroidism change the ectoenzymes activities in platelets of rats”	A ser submetido.
Investigar a expressão e a atividade de enzimas do sistema purinérgico e a relação desse sistema com parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo pós-tireoidectomia.	Manuscrito 2: “Post-thyroidectomy hypothyroidism increases expression and activity of ectonucleotidases in platelets: possible involvement of reactive oxygen species.”	Em revisão na revista Platelets.

1. INTRODUÇÃO

A tireoide é uma das maiores glândulas do corpo humano, que atua na produção de hormônios tireoidianos e na regulação do metabolismo. A síntese dos hormônios ocorre com o iodeto proveniente da dieta, o qual é concentrado na tireoide, e oxidado simultaneamente com resíduos da tireoglobulina, resultando na formação de monoiodotirosina e diiodotirosina, que ao se unirem darão origem à tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) (RHOADES E TANNER, 2005). A secreção dos hormônios a partir da tireoglobulina será regulada pelo hormônio estimulante da tireoide (TSH), através de um mecanismo de retroalimentação negativa (STATHATOS, 2012). A maior parte dos hormônios secretados é T4, enquanto que T3 corresponde à uma parcela pequena. Contudo, nos tecidos periféricos, aproximadamente 40% de T4 é convertida em T3 (MEYER, 2007).

Os hormônios tireoidianos apresentam muitas funções fisiológicas e modulam todas as rotas metabólicas através de alterações no consumo de oxigênio e mudanças no metabolismo das proteínas, lipídios e carboidratos, além de afetar a síntese e a degradação de outros hormônios e estarem relacionados a muitas doenças envolvendo o Sistema Nervoso Central (SNC). A produção ou distribuição alteradas dos hormônios tireoidianos podem levar a significantes distúrbios endócrinos, tais como o hipotireoidismo e o hipertireoidismo (SILVA, et al., 2011; VANDERPUMP, 2011). O hipotireoidismo resulta da produção ou secreção diminuída dos hormônios tireoidianos, e leva a manifestações clínicas características de insuficiência da glândula, tais como baixo índice metabólico, intolerância ao frio, fraqueza muscular, fadiga, alterações cardiovasculares, depressão e déficit cognitivo (JONES, et al., 2010; CAMACHO, 2011). Já o hipertireoidismo se refere ao aumento da produção ou secreção de hormônios devido à hiperfunção da tireoide (SILVA, et al., 2011; WU, et al., 2013) e é caracterizado pela presença de um estado hipermetabólico, com perda de peso, fraqueza muscular, sudorese excessiva, irritabilidade, ansiedade, aumento de apetite, taquicardia, tremores, distúrbios do sono, fadiga e depressão (FARWELL E BRAVERMAN, 2006; BOELAERT, et al., 2010).

Estima-se que a prevalência do hipotireoidismo varia entre 1 a 2% em áreas com suprimento suficiente de iodo e 4 a 5% em áreas com deficiência de iodo (VANDERPUMP et al., 2009), acometendo cerca de 8 vezes mais o sexo feminino do que o masculino, iniciando com maior frequência entre os 20 e 50 anos de idade (CENCI et al., 2006; CAMACHO, 2011). Já o hipertireoidismo apresenta uma prevalência aproximada de 2 a 3% das mulheres,

podendo ser alterada também de acordo com a ingestão de iodo e a idade (SILVA, et al., 2011). Os pacientes com ambas as disfunções necessitam de tratamento para reestabelecer os hormônios a valores normais, o que é possível com monitoramento frequente dos níveis desses no organismo. Contudo, devido à variação da resposta alguns pacientes podem não responder bem ao tratamento ou apresentar efeitos indesejáveis (LONGMORE, 2007; TYERNEY, et al., 2009).

Além de estudos realizados com pacientes, modelos experimentais também têm sido utilizados com o objetivo de contribuir para o estabelecimento dos mecanismos envolvidos nas desordens da tireoide. O Metimazol (MTZ) e o Propiltiouracil (PTU) são agentes antitireoidianos que reproduzem nos animais um quadro de hipotireoidismo (JENA, et al., 2012; BALDISSARELLI, et al., 2016), enquanto o hormônio sintético L-Tiroxina reproduz um quadro de hipertireoidismo (BRUNO, et al., 2005). Nesse contexto, os sistemas purinérgico e colinérgico destacam-se por sua grande importância nos mecanismos de resposta de várias doenças, e agora também vêm sendo estudados nas alterações dos sistemas nervoso central (VASILOPOULOU, et al., 2016) e periférico (SNP) que ocorrem nos distúrbios da tireoide (BRUNO, et al. 2011; BALDISSARELLI, et al., 2016).

A acetilcolina (ACh), o primeiro neurotransmissor identificado nas sinapses cerebrais é um dos principais representantes do sistema colinérgico. É sintetizada na junção neuroefetora a partir de acetil-Coa e colina e transportada para o interior das vesículas pré-sinápticas até que ocorra sua liberação. Ao ser liberada ativa receptores específicos na células pós-sinápticas, que irão efetivar seus efeitos. Após exercer sua ação a ACh é hidrolisada na fenda sináptica pelas colinesterases, as quais desempenham um papel muito importante na neurotransmissão colinérgica, além de interferirem também em outras funções fisiológicas. A Acetilcolinesterase (AChE) é a principal responsável por esta hidrólise, já que está presente principalmente nas sinapses do SNC e junção neuromuscular (COKUGRAS, 2003) e alterações na sua atividade podem ser relacionadas à disponibilidade de ACh e consequentemente distúrbios no SNC (GUTIERRES, et al., 2014; DA COSTA, et al., 2015);

Em adição ao sistema colinérgico a sinalização intercelular mediada por purinas como os nucleotídeos ATP, ADP, AMP e o nucleosídeo adenosina também constitui um importante alvo de estudos devido ao seu papel em modular uma variedade de processos biológicos (DI VIRGILIO, 2007; SCHETINGER, et al., 2007). No sistema vascular a sinalização purinérgica tem o potencial de influenciar funções cardíacas, participar de respostas vasomotoras e controlar as funções plaquetárias (BURNSTOCK E RALEVIC, 2014). Além disso, no SNC pode modular a produção e diferenciação neuronal, sendo o ATP liberado nas sinapses como

co-transmissor juntamente com outros neurotransmissores como a acetilcolina e o glutamato. As ectonucleotidases são uma classe de enzimas que incluem as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases/CD39), as nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases (E-NPPs), e a E-5'-nucleotidase (5'-NT/CD73) (ROBSON, et al., 2006; ZIMMERMANN, et al., 2012) responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares dessas moléculas. A atividade destas enzimas já foi encontrada alterada em doenças como esclerose múltipla, diabetes mellitus, hipertensão e câncer (SPANVELLO, et al., 2010; CARDOSO, et al., 2012; ZANINI, et al., 2012; SCHMATZ, et al., 2013), o que as torna de considerável importância no estudo das alterações apresentadas pelos pacientes ou em modelos experimentais de distúrbios tireoidianos.

Além do SNC, os hormônios da tireoide podem atuar no sistema cardiovascular, causando alterações como hipertensão, hipercolesterolemia, variações na taxa metabólica, as quais podem estar associadas à maior incidência de doenças cardiovasculares (DCV) (SANTI, et al., 2010). As plaquetas são componentes essenciais associadas à alterações vasculares e desempenham importantes funções no processo hemostático, através de mecanismos de adesão, agregação e formação de trombos em locais de lesão vascular (MEIKLE, et al., 2016), além de participarem da liberação de nucleotídeos, o que as torna intensamente envolvidas nesses processos.

Os radicais livres liberados no sistema vascular também podem causar ativação plaquetária e conseqüentemente a interrupção na hemostasia, favorecendo a formação de trombos (FARACI E LENTZ, 2004). Durante o processo de oxidação das moléculas espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas naturalmente em quantidades controladas (BARREIROS E DAVID, 2006). Quando há alguma disfunção biológica essas ERO podem iniciar a peroxidação lipídica na superfície das células endoteliais, além de causar danos a proteínas e ao DNA (HALLIWELL, 2006).

Para equilibrar e neutralizar os efeitos das espécies reativas de oxigênio o organismo dispõe da ação de um sistema antioxidante. Essas defesas antioxidantes são extremamente importantes, pois promovem a supressão direta das ERO fornecendo a proteção máxima para os sítios biológicos (KLAUNIG E KAMENDULIS, 2004). Dentre esses agentes antioxidantes estão o ácido ascórbico, os tióis proteicos (T-SH) e não-proteicos (NPSH) e a enzima glutatona S- transferase (GST). Ambos atuam no combate às espécies reativas com mecanismos de ação diversos, podendo incluir inibição da formação ou a varredura destas e seus precursores (MAY, 2012; AQUILANO, et al., 2014). O desequilíbrio dos sistemas

oxidantes e antioxidantes resulta em um quadro de estresse oxidativo, gerando danos que, se não forem reparados, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (BARREIROS E DAVID, 2006). Assim, o estresse oxidativo possui estreita ligação com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e complicações vasculares (ZHU, et al., 2007).

O interesse em torno dos produtos naturais e dos nutrientes presentes nos alimentos para uso no tratamento e prevenção de doenças vem aumentando consideravelmente. Grande parte deste interesse é devido à presença de antioxidantes naturais, os quais possuem numerosos efeitos benéficos para o organismo. Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis pela maior capacidade antioxidante, sendo representados entre outros pelos flavonoides (RAZAVI, et al., 2008). Muitos estudos têm sugerido a existência de uma correlação entre ingestão de alimentos ricos em polifenóis e a redução de mortalidade por DCV (GIOVANNINI, et al., 2008; KAWAI, et al., 2008).

Os flavonoides são um importante grupo desses antioxidantes cuja atividade sequestradora de radicais livres pode ser prevista devido à sua estrutura química, que engloba os grupos hidroxila presentes na estrutura da maioria dos flavonoides e que possibilita sua ação quelante de espécies reativas (QUIDEAU, et al., 2011). Dentre os flavonoides, a quercetina destaca-se em quantidade e potencial antioxidante, além da capacidade de se unir a polímeros biológicos, catalisar transporte de elétrons e depurar radicais livres (DA SILVA, et al., 2006).

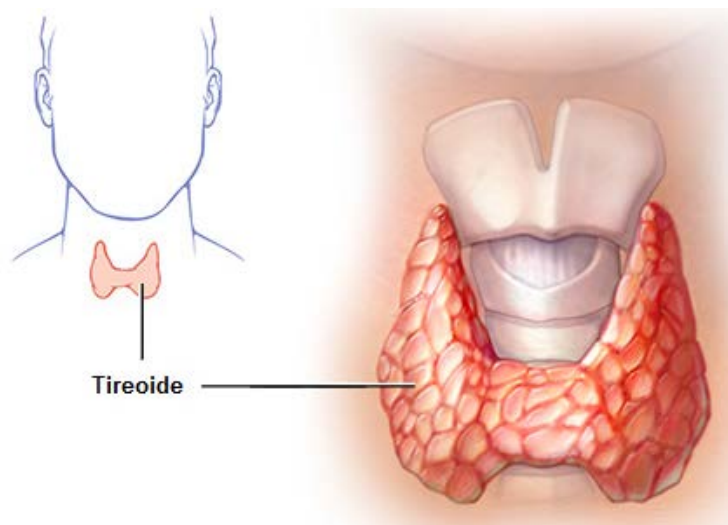
Deste modo, considerando-se a elevada incidência de hipotireoidismo e hipertireoidismo na população e pelo fato dos sistemas purinérgico e colinérgico estarem envolvidos em muitos dos mecanismos das alterações fisiológicas apresentadas por pacientes com desordens tireoidianas, torna-se relevante um estudo da atividade e expressão das enzimas que hidrolisam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, sua relação com o estresse oxidativo e seus marcadores, e a atividade da enzima acetilcolinesterase em pacientes e modelos experimentais. Além disso, devido à busca de alternativas que auxiliem no tratamento e atenuação dos sintomas causados por essas desordens, a avaliação do tratamento com o flavonoide quercetina em modelo experimental de ratos com hipotireoidismo também pode auxiliar a esclarecer os mecanismos envolvidos e beneficiar pacientes com esta endocrinopatia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A tireoide é uma glândula em formato de borboleta, situada na região inferior do pescoço, anterior à traqueia, possuindo dois lobos laterais ligados por uma camada fina de tecido denominada istmo. É uma glândula rica em vasos sanguíneos, que pesa, em adultos normais, cerca de 10 a 25 gramas e possui nervos importantes para a qualidade da voz passando através dela (Figura 1). Além disso, a tireoide possui um papel essencial no controle do metabolismo do organismo, uma vez que os hormônios produzidos, armazenados e liberados pela glândula agem em quase todas as células do corpo auxiliando no controle de suas funções (GUYTON E HALL, 2006). A variação na concentração destes hormônios, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), no organismo, está, portanto, envolvida em muitas desordens metabólicas (MAYER, et al., 2006).

O processo de síntese dos hormônios da tireoide (HTs) ocorre dentro das células foliculares da glândula e o hormônio estimulante da tireoide (TSH) age estimulando a liberação destes na circulação sistêmica. A tireoglobulina é uma glicoproteína iodada de alto peso molecular presente nos folículos que funciona como um suporte para a produção dos HTs, consistindo, portanto, em uma forma de armazenamento destes e de seus precursores (STATHATOS, 2012). A biossíntese dos hormônios tireoidianos requer a presença do iodeto proveniente da dieta. A Organização Mundial de Saúde recomenda para adultos a ingestão diária de 150 μg de iodo.

Figura 1 – Localização da tireoide

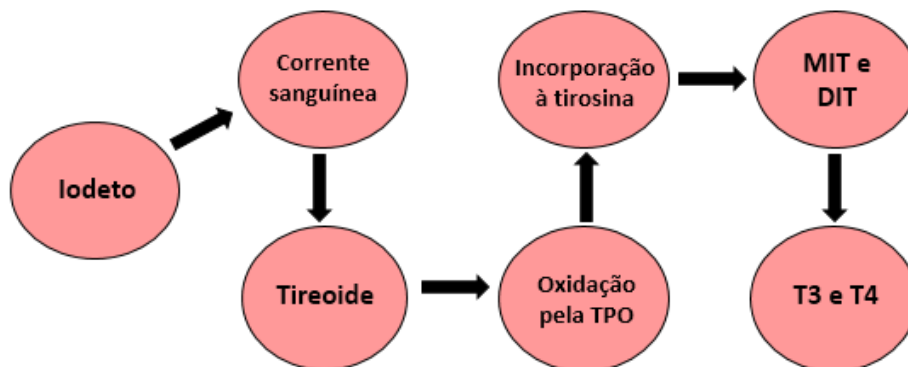


Adaptado de Fundação Mayo para a educação médica e pesquisa.

O iodeto é captado e concentrado na tireoide através de um mecanismo de bombeamento próprio ativado pelo TSH. Após atravessar a célula, ocorre a oxidação do iodeto a iodo elementar pela tireoperoxidase (TPO), assim, o iodo está presente nos tireócitos em concentrações 20 a 40 vezes maior do que no soro. A TPO é uma hemoglicoproteína que se encontra na membrana plasmática apical da célula folicular e que simultaneamente oxida os resíduos tirosil da tireoglobulina. A oxidação ocorre na presença de peróxido de hidrogênio e esse processo é chamado organificação do iodo (STATHATOS, 2012).

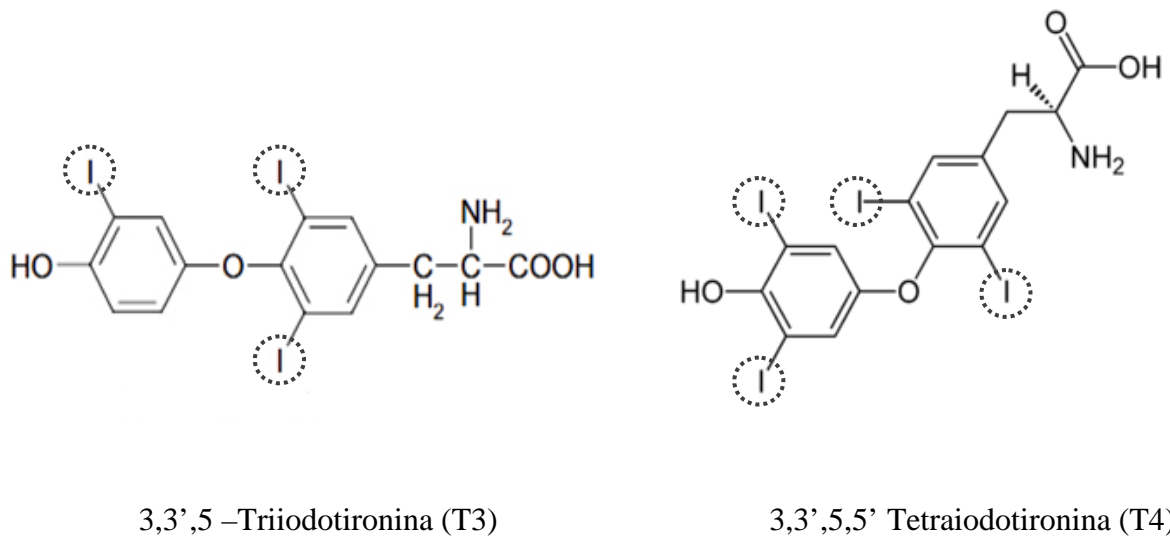
A iodetação dos resíduos de tirosina resulta na formação de monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT), iodotirosinas que armazenam aproximadamente 70% do iodo na tireoglobulina, enquanto os resíduos iodotironil, T3 e T4, armazenam aproximadamente 30%. A T4 é formada pelo acoplamento de dois resíduos DIT, enquanto que o acoplamento de um resíduo DIT com um resíduo MIT forma a T3 (RHOADES E TANNER, 2005) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema representativo da produção dos hormônios tireoidianos T3 e T4.



A tiroxina (T4) constitui a maior parte dos hormônios secretados pela tireoide, enquanto que apenas cerca de 10% secretados são T3 (Figura 3). A T3 é cerca de quatro vezes mais potente que a T4, porém, além de estar em menor concentração, também permanece no sangue por menor tempo. Entretanto, pela ação da enzima deiodinase 2 uma grande porção de T4 é convertida em T3 nos tecidos periféricos, permitindo assim que exerça sua ação (GUYTON E HALL, 2006; BURCH, 2009). Os hormônios são transportados na circulação ligados às proteínas plasmáticas, sendo que apenas uma pequena quantidade está na sua forma livre, a qual produz os efeitos biológicos. Assim, a forma ligada é considerada como um reservatório hormonal que supre a fração livre à medida que ela é consumida pelos tecidos (BIANCO, et al., 2002).

Figura 3 - Estrutura química dos hormônios da tireoide



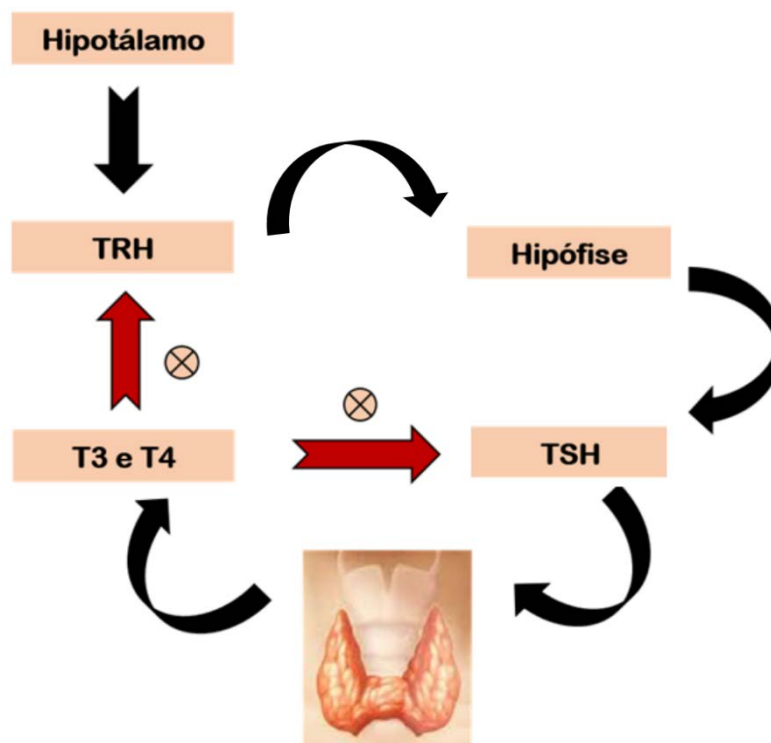
Fonte: (MURRAY, 2003).

A síntese e secreção dos hormônios da tireoide são reguladas pelo hormônio estimulador da tireoide (TSH) em um sistema de retroalimentação negativa que envolve o hipotálamo, a hipófise e a glândula tireoide. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) é sintetizado pelo hipotálamo e em seguida transportado para a hipófise, onde liga-se a seus receptores, estimulando a secreção do TSH, o qual estimula a produção e secreção de T3 e T4 pela tireoide. Tanto o TRH, quanto o TSH são regulados pelos níveis circulantes dos hormônios da tireoide (NOGUEIRA, et al., 2011; STATHATOS, 2012). Assim, quando os níveis de T4 caem, aumenta a secreção do TSH pela hipófise. O TSH liga-se a receptores específicos na membrana basal dos tireócitos, estimulando a síntese de AMPc, que atua como segundo mensageiro, causando múltiplas fosforilações por toda a célula, o que resulta em aumento na captação de iodo e secreção de T3 e T4 (RHOADES E TANNER, 2005) (Figura 4).

Os hormônios da tireoide são importantes no desenvolvimento, homeostase e crescimento do organismo (WHITE, 2010). Além disso, possuem efeitos em vários órgãos e vias metabólicas, tais como regulação da temperatura corporal e o desenvolvimento de tecidos, como o do sistema nervoso central, onde são essenciais para a maturação e função normais. Além disso também influenciam na frequência cardíaca e no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, podendo regular outras vias endócrinas através da alteração

das taxas de síntese e degradação de outros hormônios e fatores de crescimento (BARRA, et al., 2004; HAMPL, et al., 2006; LARSEN, 2008; ABBRACCHIO, et al., 2009). E ainda, os hormônios tireoidianos são os maiores reguladores dos processos metabólicos oxidativos, sendo que o metabolismo oxidativo total em repouso medido pelo consumo de oxigênio, é altamente sensível ao status dos hormônios tireoidianos (HAMPL, et al., 2006).

Figura 4 - Mecanismo de regulação dos hormônios da tireoide.



Alterações na produção ou distribuição dos hormônios tireoidianos podem levar a significantes distúrbios endócrinos. Dentre eles, o hipotireoidismo e o hipertireoidismo. O hipotireoidismo é a patologia endócrina mais comum cuja prevalência varia dependendo da região geográfica, alterada por fatores como idade e sexo. A prevalência estimada é entre 1 a 2% em áreas com suprimento suficiente de iodo e 4 a 5% em áreas com deficiência de iodo (VANDERPUMP, 2011) e as mulheres são aproximadamente 8 vezes mais acometidas (CAMACHO, 2011). O hipertireoidismo afeta aproximadamente 2% das mulheres e 0,2% dos homens a nível mundial e também no Brasil, sendo que a prevalência pode ser alterada de acordo com a idade e a ingestão de iodo (CAMARGO, 2006; KAHALY et al., 2011).

O hipotireoidismo pode se desenvolver devido a várias etiologias, como deficiência de iodo, doença autoimune da tireoide, redução do tecido tireoideano por iodo radioativo, uso de

alguns medicamentos como o carbonato de lítio (que inibe a síntese dos hormônios tireoidianos), ou após tireoidectomia (WOEBER, 2000). Ele pode ser classificado em hipotireoidismo primário, o qual é o mais comumente observado e tem origem na própria tireoide, sendo acompanhado de níveis séricos elevados de TSH, ou hipotireoidismo secundário, quando a origem da disfunção provém da hipófise, e os níveis séricos de TSH podem estar normais ou baixos (GUSSO E LOPES, 2012).

O indivíduo com hipotireoidismo apresenta manifestações em diversos sistemas e tecidos, os quais inicialmente são pouco específicos, como fadiga, letargia, intolerância ao frio, dores de cabeça e fraqueza. Já quando acentuado, os sintomas são mais evidentes, tais como: ganho de peso, pele seca e pálida, unhas fracas e quebradiças, rouquidão, irregularidades menstruais, constipação, bradicardia, além de sonolência, lentidão no processamento de informação, reflexos lentos, problemas de memória, depressão, demência ou mudanças de personalidade (LARSEN, 2008; JONES, et al., 2010; WHITE, 2010; CAMACHO, 2011).

Por outro lado, o hipertireoidismo se refere ao aumento da produção de hormônios pela tireoide e o termo tireotoxicose ao quadro clínico decorrente da exposição dos tecidos-alvo ao excesso desses hormônios, secundários à hiperfunção da glândula ou não (ABBRACCHIO, et al., 2009; SILVA, et al., 2011; WU, et al., 2013). A tireotoxicose por hipertireoidismo, em sua maioria possui três etiologias principais: doença de Graves, bócio multinodular e adenoma tóxico, com uma pequena contribuição das tireoidites. Cerca de 60% a 90% dos casos de hipertireoidismo tem como causa a doença de Graves, uma doença autoimune resultante da produção de anticorpos que estimulam os receptores de TSH e assim, o aumento de volume e função da tireoide, a qual secreta hormônios excessivamente (FARWELL E BRAVERMAN, 2006). Dentre as manifestações clínicas do hipertireoidismo as mais comuns são relacionadas à presença de um estado hipermetabólico, tais como perda de peso, fraqueza muscular, sudorese excessiva, alterações oculares, irritabilidade, ansiedade, aumento de apetite, pele quente e úmida, taquicardia, tremores, distúrbios do sono, fadiga, paranoia e depressão (FARWELL E BRAVERMAN, 2006; BOELAERT, et al., 2010).

Um número crescente de estudos tem indicado que os HTs possuem importantes funções fisiológicas no cérebro, tanto durante o desenvolvimento (REID, et al., 2007) quanto na fase adulta (ANDERSON, 2001). Além disso, o envolvimento dos sistemas purinérgico e colinérgico nas alterações dos SNC (BRUNO, et al., 2005; VASILOPOULOU, et al., 2016) e SNP vem sendo estudado (BALDISSARELLI, et al., 2016). Os pacientes com

hipotireoidismo são geralmente tratados através de administração de levotiroxina (T4), sendo que a maior parte desta irá se transformar em triiodotironina (T3) para exercer seus efeitos nos receptores nucleares. O tratamento é geralmente necessário durante toda a vida e a dose deve ser individualizada e periodicamente avaliada através de exames clínicos e análises hormonais, pois as necessidades podem variar com o decorrer do tempo (LONGMORE, 2007). Para o tratamento de hipertireoidismo existem três opções terapêuticas: medicamentos antitireoide como o metimazol, cirurgia e radioisótopos. Nenhuma delas é considerada ideal, já que cada um tem suas vantagens e desvantagens e frequentemente uma combinação de terapias é feita. Além disso, alguns sintomas mais graves como frequência cardíaca acelerada, tremores e ansiedade podem ser controlados com o uso de betabloqueadores (FARWELL E BRAVERMAN, 2006; MAIA, et al., 2013).

De encontro à crescente incidência das desordens da tireoide, além de estudos com pacientes, modelos experimentais têm sido utilizados a fim de contribuir para melhorar o entendimento das causas, consequências e tratamento destas desordens metabólicas (BRUNO, et al., 2011; DIAS, et al., 2014; BALDISSARELLI, et al., 2016). Para a prática desses modelos são utilizados agentes antitireoidianos como o Metimazol (MTZ) e o Propiltiouracil (PTU), os quais reproduzem nos animais o quadro de alterações metabólicas e sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem no hipotireoidismo ou o hormônio L-Tiroxina, o qual reproduz o quadro de hipertireoidismo. Tais fármacos caracterizam-se por seu efeito de inibição da síntese dos hormônios tireoidianos T3 e T4 ou elevação dos níveis destes na circulação (RANG, et al., 2012).

O MTZ faz parte de um grupo de fármacos usados no controle do hipertireoidismo. Eles são denominados tiourelenos e se relacionam quimicamente com a tioureia, sendo o grupo tiocarbamida (S-C-N) essencial para a atividade antitireoidiana. Na prática clínica dentre os medicamentos existentes, seu uso é mais indicado devido ao efeito prolongado e, assim, a facilidade de dose única diária e hepatotoxicidade menos grave, podendo ser utilizado em tratamentos mais prolongados (ANDRADE, 2001). Sua ação reduz a liberação de hormônios tireoidianos e, embora o mecanismo de ação não seja completamente compreendido, há evidências de que inibem a iodetação dos resíduos de tirosil na tireoglobulina. Sendo assim, eles interrompem as reações de oxidação catalisadas pela tireoperoxidase por atuarem como substratos para o suposto complexo iodo-peroxidase, inibindo a interação com a tirosina e por consequência a formação de T4 e T3 (RANG, et al., 2012).

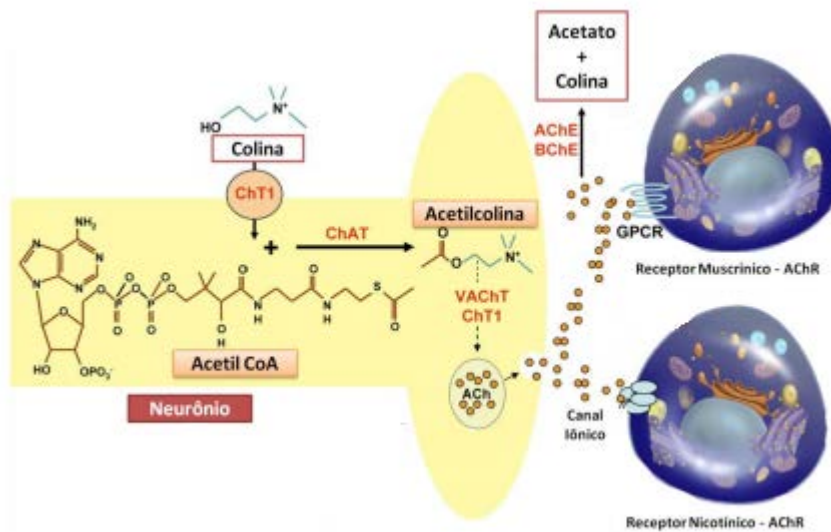
Desta forma, similarmente a pacientes com hipotireoidismo, os animais tratados com MTZ podem desenvolver danos em diversos tecidos e órgãos, como no cérebro e no sistema vascular, constituindo assim um importante modelo para o estudo de complicações causadas pelo hipotireoidismo (DIAS, et al., 2012). Da mesma maneira, os animais tratados com L-Tiroxina, ao reproduzirem o quadro de hipertireoidismo apresentam comportamento e transtornos semelhantes aos pacientes acometidos pelo distúrbio, o que nos permite avaliar os danos e alterações ocasionados (BRUNO, et al., 2005; ARAUJO, et al., 2006).

Os hormônios tireoidianos possuem papel fundamental no processo de neurotransmissão por promoverem um aumento na síntese e sensibilidade dos receptores centrais de catecolaminas e também modular o transporte de adenosina e seus receptores em cérebros adultos (SILVEIRA, et al., 2013). ATP e acetilcolina (ACh) são importantes moléculas de sinalização extracelular que fazem parte do sistema colinérgico e purinérgico e atuam no sistema nervoso e outros tecidos. Eles podem ser co-armazenados em vesículas e co-liberados na fenda sináptica (BURNSTOCK, 2004).

O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias modulatórias do SNC e possui papel fundamental em várias funções vitais, sendo a ACh a molécula neurotransmissora mais importante e amplamente estudada nas sinapses do SNC. A ACh desempenha um papel fundamental no SNC e está relacionada ao comportamento, aprendizado e controle do fluxo sanguíneo cerebral (LENDVAI E VIZI, 2008). Além de sua ação neurotransmissora também possui função neuromoduladora, sendo que seus níveis podem regular a concentração de outros neurotransmissores no cérebro (HUT E VAN DER ZEE, 2011).

A ACh é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase a partir da colina e Acetil-Coa. Após a síntese é carregada para as vesículas sinápticas, onde fica armazenada até sua liberação. Esse processo inicia após um potencial de ação que desencadeia sua liberação por exocitose em um mecanismo Ca^{2+} -dependente (SOREQ E SEIDMAN, 2001). Depois de liberada se difunde na fenda sináptica e ativa seus receptores específicos nas células pós-sinápticas, que podem ser do tipo muscarínicos ou nicotínicos (RANG, et al., 2012). A ação da ACh é finalizada através da hidrólise em acetato e colina pela ação das colinesterases. A colina é recaptada pelo transportador de colina para o terminal pré-sináptico e poderá ser reutilizada para formação de novas moléculas de ACh (MESULAM, GUILLOZET et al., 2002) (Figura 5).

Figura 5 - Acetilcolina: Produção, liberação, degradação e interação com receptores colinérgicos.



Adaptada de SHAH (2008).

Ao hidrolisarem a ACh na fenda sináptica, as colinesterases desempenham um papel muito importante na neurotransmissão colinérgica, além de interferirem também em outras funções fisiológicas. São classificadas em: Acetilcolinesterase (AChE), a qual hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, estando presente principalmente nas sinapses do SNC e junção neuromuscular; e a butirilcolinesterase (BuChE), a qual hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina e possui uma distribuição neuronal mais restrita em relação à AChE (COKUGRAS, 2003).

A AChE é uma glicoproteína que ocorre na forma globular ou assimétrica e possui a capacidade de catalisar até 6×10^5 moléculas de ACh por molécula de enzima a cada minuto (PETRONILHO, et al., 2011). A forma globular é composta por monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) da subunidade catalítica. A forma G1 está ligada ao citosol, enquanto que G4 à membrana da célula, sendo a forma mais observada no sistema nervoso e muscular (XIE, et al., 2007). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente para a exportação, ou se apresentam associadas à membrana celular externa através de uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípido acoplado. As formas assimétricas da AChE estão associadas à lâmina basal externa por proteínas que consistem de um (A4), dois (A8) e três (A12) tetrâmeros catalíticos ligados ao colágeno Q (ColQ) e que determinam sua localização sináptica, que é predominante nas junções musculares (ZIMMERMAN E SOREQ, 2006).

Os níveis de AChE parecem ser controlados pela interação da ACh com seus receptores, sendo que quando a interação é acentuada, aumentam os níveis da enzima. No entanto, a AChE pode ser usada como um marcador da função colinérgica, e mudanças na sua atividade podem indicar alterações na disponibilidade de ACh e dos níveis de seus receptores (ANGLADE E LARABI-GODINOT, 2010). Sabe-se que inibidores da AChE vem sendo utilizados na prática clínica para o tratamento da doença de Alzheimer, Miastenia Gravis, e que, a intoxicação por organofosforados causa a inibição irreversível da atividade da enzima (SIKORA, 2011; MEHTA, et al., 2012). Além disso, alterações na atividade da enzima já foram observadas em doenças, dentre elas o hipotireoidismo e o hipertireoidismo (CARAGEORGIOU, et al., 2007; VASILOPOULOU, et al., 2016).

Outro neurotransmissor de grande importância no sistema nervoso central, o ATP possui concentração intracelular alta (3-10 mM), enquanto que a concentração fisiológica extracelular é muito baixa (400-700 nM) (BOURS, et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que o ATP além de ser liberado por exocitose como um co-transmissor juntamente com outros neurotransmissores como a acetilcolina e o glutamato pode ser liberado através de panexinas (canais proteicos transmembrana, que conectam o espaço intracelular com o extracelular) ou pelas conexinas (originalmente descritas como proteínas de junções gap, consistindo de dois hemicanais. Estes hemicanais isoladamente funcionam como condutores entre o citoplasma e o espaço extracelular, controlando a liberação de ATP das células (JUNGER, 2011; ELTZSCHIG, et al., 2012; IDZKO, et al., 2014).

O ATP faz parte do sistema purinérgico, o qual compreende também outros nucleotídeos e nucleosídeo de adenina, como o ADP, AMP e adenosina (Ado), conhecidos por serem moléculas sinalizadoras capazes de modular uma variedade de processos biológicos (SCHETINGER, et al., 2007; FUENTES E PALOMO, 2015). Essas moléculas são secretadas nos fluidos extracelulares e têm sua concentração influenciada por fatores como a lise celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática, exocitose das vesículas secretoras e atividade catalítica das enzimas que realizam sua hidrólise (MALMSJO, et al., 2000). Os nucleotídeos e nucleosídeos derivados de purinas exercem seu papel de moléculas sinalizadoras extracelulares em vários tecidos, através dos receptores purinérgicos, localizados na superfície celular (BURNSTOCK, 2004; ABBRACCHIO, et al., 2009). Sendo assim, os nucleotídeos ATP, ADP, AMP e seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, possuem uma multiplicidade de funções teciduais incluindo neurotransmissão, contração

muscular, fluxo sanguíneo, secreção, inflamação e tromborregulação (ROBSON, et al., 2006; ABBRACCHIO, et al., 2009; FUENTES E PALOMO, 2015).

Os receptores purinérgicos são divididos em P1 e P2, ativados por Ado e ATP respectivamente, sendo que os receptores P2 classificam-se ainda em duas classes: receptores ionotrópicos P2X e receptores metabotrópicos P2Y (ILLES, et al., 2000). Já foram identificados sete subtipos de receptores P2X (P2X1-P2X7), e o ATP é o principal agonista, já que os outros nucleotídeos ou não possuem afinidade ou possuem muito pouca por esses receptores. Assim, no SNC, o ATP exerce seus efeitos através de muitos desses receptores. Para os receptores P2Y já foram identificados oito subtipos diferentes (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) que diferem entre si pela afinidade aos seus agonistas (WHITE E BURNSTOCK, 2006).

Além de ser uma molécula altamente energética e um neurotransmissor excitatório nas sinapses purinérgicas, o ATP, juntamente com o ADP, atua como substância ativadora e reguladora dos processos tromboembólicos desencadeados pelas plaquetas. O ATP atua sobre o sistema vascular e pode mediar vasoconstrição via receptores do subtipo P2X1, promovendo proliferação de células musculares lisas e células endoteliais (RALEVIC E BURNSTOCK, 2003). O ADP é reconhecidamente o principal agente indutor da agregação plaquetária, recrutando mais plaquetas para o local da lesão e atuando nestas através dos receptores P2Y1 e P2Y12 (HECHLER, et al., 2005).

O nucleosídeo adenosina, um dos produtos resultantes da hidrólise extracelular dos nucleotídeos pode ser considerada outra molécula sinalizadora de dano celular, sendo um potente inibidor da agregação plaquetária e atuando como modulador do tônus vascular (BURNSTOCK E RALEVIC, 2014). Já foi demonstrado que a vasodilatação coronária mediada por este nucleosídeo durante a hipóxia é uma tentativa de aumentar o fluxo sanguíneo e restaurar o suprimento de oxigênio ao tecido cardíaco (RALEVIC E BURNSTOCK, 2003). Além disso, já foram comprovadas ações protetoras da adenosina em outros tecidos, como o cérebro e os rins (CUNHA, 2005; OYARZUN, et al., 2017).

A Ado exerce sua ação pela ligação aos receptores de superfície celular: os receptores A1 e A2a são ativados por concentrações basais de Ado, já os receptores A2b e A3 tornam-se ativos somente quando os níveis extracelulares de Ado são abundantes (HAM E EVANS, 2012). Os receptores A1 possuem uma ampla distribuição no cérebro e são mediadores dos efeitos neuroprotetores da Ado, além de estarem presentes no coração e na medula espinhal. Os receptores A2a estão localizados nas células endoteliais e plaquetas, musculatura lisa e neurônios, principalmente na região do estriado. Os receptores A2b são encontrados em

pequenas quantidades na maioria das células do SNC, além de intestino e bexiga, enquanto os receptores A₃, além de serem encontrados no cérebro, também estão presentes nos macrófagos, pulmão e coração (BURNSTOCK, 2007).

Além de serem liberados no meio extracelular por células sanguíneas e vasculares, como eritrócitos, plaquetas, e células endoteliais (BURNSTOCK, 2015), os nucleotídeos podem também ser liberados frente ao dano celular nos sítios inflamatórios ou pelo estresse oxidativo, onde há um aumento da liberação de nucleotídeos. Já a Ado pode ser liberada no meio extracelular como resultado da degradação do ATP e ADP por enzimas específicas (YEGUTKIN, 2008) ou através de transportadores na membrana das células que transportam a Ado de dentro das células para o meio extracelular (BOROWIEC, et al., 2006). Sendo assim, no sistema vascular a sinalização purinérgica tem o potencial de influenciar funções cardíacas, participar de respostas vasomotoras e controlar as funções plaquetárias e os processos inflamatórios (BURNSTOCK E RALEVIC, 2014).

Os hormônios tireoidianos podem atuar no sistema cardiovascular, causando alterações que podem estar associadas à maior incidência de doenças cardiovasculares, como aterosclerose e insuficiência cardíaca. No hipotireoidismo pode ocorrer hipertensão, hipercolesterolemia, aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de apolipoproteína (KLEIN E DANZI, 2007; SANTI, et al., 2010), fatores que favorecem um acentuado estado pró-trombótico. Já o hipertireoidismo causa um estado cardiovascular hiperdinâmico, incluindo uma maior taxa metabólica do coração e diminuição da resistência vascular periférica, podendo levar a arritmias cardíacas (TIERNEY, et al., 2009).

Apesar de estudos sugerirem associação do hipotireoidismo com a aterogênese (ICHIKI, 2015; ALTAY, et al., 2017) outros estudos clínicos já realizados mostraram relação entre hipertireoidismo e aumento do risco de eventos trombóticos (SQUIZZATO, et al., 2007). Estas controvérsias indicam a necessidade de mais estudos para estabelecer o papel destes hormônios nas doenças cardiovasculares. Nesse contexto, as plaquetas possuem fundamental importância ao desempenhar importantes funções no processo hemostático, através de mecanismos de adesão, agregação e formação de trombos em locais de dano vascular (SEMPLE, et al., 2011; MEIKLE, et al., 2016).

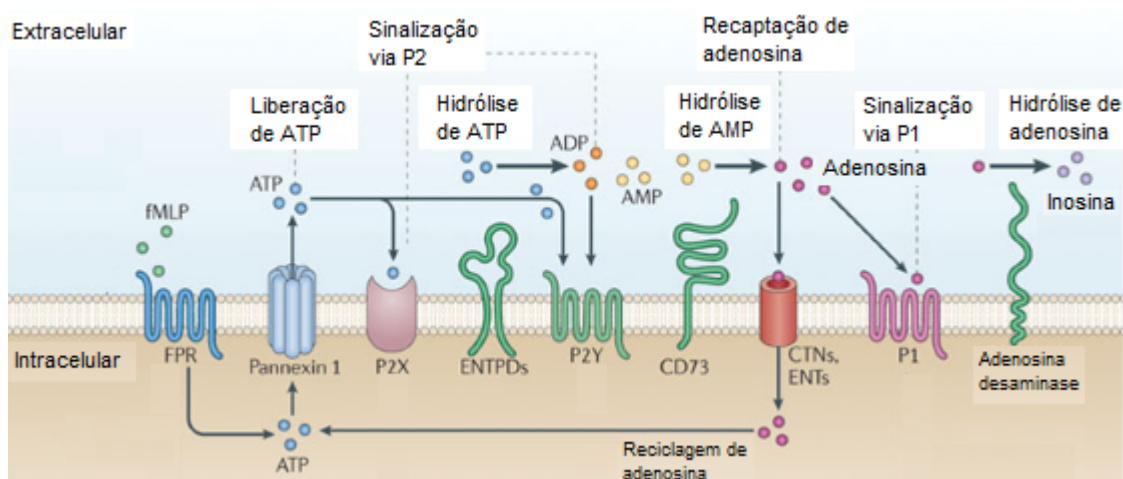
As plaquetas circulam em estreito contato com a mucosa das células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos e, no momento em que ocorre algum dano, elas aderem ao local lesionado (SALLES, et al., 2008). A adesão plaquetária é mediada por receptores específicos, os quais se ligam aos seus agonistas, gerando uma propagação do fluxo de íons Ca⁺ do

exterior para o interior da célula. Assim que o agonista se liga, a agregação plaquetária é estimulada, ocorrendo a fase de secreção, sendo liberadas substâncias contidas nos grânulos densos (ADP, ATP, cálcio e serotonina), além de enzimas e fatores de coagulação presentes nos grânulos alfa (BIRK, et al., 2002; DIAMOND, et al., 2013).

As concentrações de ATP, ADP, AMP e Ado são influenciadas por vários fatores, tais como: secreção e/ou lise celulares, efeito da diluição no espaço extracelular e pela ação catalítica de uma variedade de enzimas ancoradas na membrana celular ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel. Dentre estas enzimas podem-se destacar as NTPDases (Nucleotídeo trifosfato difosfoidrolase, EC 3.6.1.5), a família das NPPs (Nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases), a ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT; E.C. 3.1.3.5) e a adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4) (YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN, et al., 2012).

Juntas estas enzimas compõe uma cadeia enzimática cuja atuação tem início com a ação da NTPDase e da NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP formando AMP. Em seguida a enzima E-5'-NT hidrolisa a molécula do AMP formando Ado, que por fim é degradada pela ADA gerando inosina (GODING, 2000; ZIMMERMANN, et al., 2012) (Figura 6).

Figura 6 – Visão geral do sistema purinérgico.

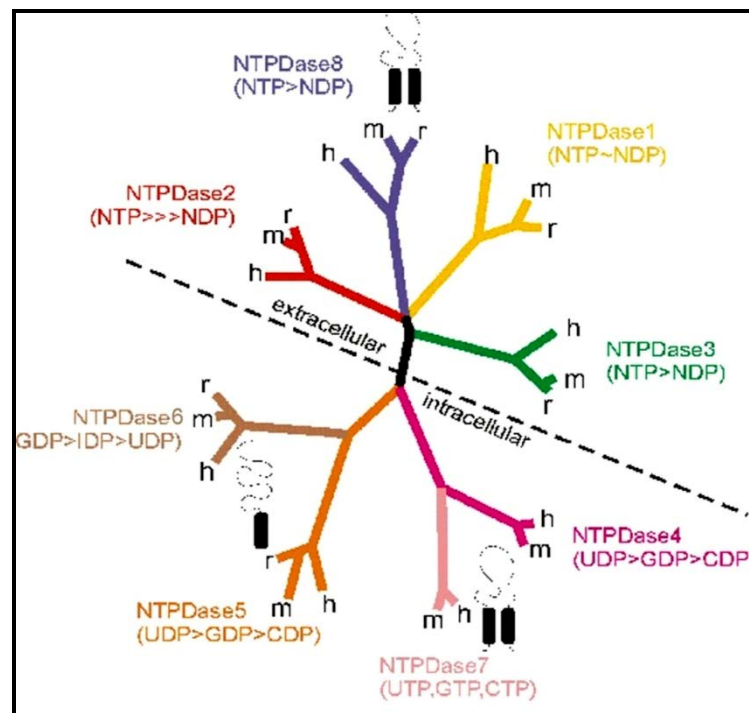


Adaptado de Junger (2011).

As NTPDases formam uma família de enzimas presentes na membrana plasmática de diversos tecidos, que catalisam a hidrólise de nucleotídeos difosfato e trifosfatos até suas formas monofosfato (ZIMMERMANN, et al., 2012). Atualmente, oito membros da família das NTPDases já foram identificadas, as quais são denominadas NTPDases 1-8. Elas diferem

entre si quanto à especificidade ao substrato e quanto à dependência de cátions divalentes e também quanto à localização celular. Quatro das NTPDases são enzimas tipicamente localizadas na membrana celular com um sítio catalítico voltado para a face extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8) e quatro delas exibem localização intracelular (NTPDases 4, 5, 6 e 7) (ROBSON, et al., 2006) (Figura 7).

Figura 7 - Membros da família das enzimas NTPDases



(Adaptado de ROBSON et al., 2006).

A NTPDase-1 (CD39), a qual hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , foi a primeira enzima da família das NTPDases a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembrana, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, et al., 2012) Uma expressão abundante foi encontrada no endotélio vascular, nas células da musculatura lisa, no pâncreas, nas células dendríticas e em células sanguíneas como linfócitos, plaquetas e eritrócitos, bem como no plasma (YEGUTKIN, 2008; KAUFFENSTEIN, et al., 2010; ZIMMERMANN, et al., 2012) Sabe-se que a NTPDase-1 de plaquetas humanas intactas pode estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular (KAUFFENSTEIN, et al., 2010). Estudos demonstraram que ela inibe a agregação plaquetária

por participar da cascata de liberação dos nucleotídeos ATP e ADP e, juntamente, com a E-5'-NT promover a formação de Ado (ZIMMERMANN, et al., 2012).

A NTPDase-2 é associada particularmente com o SNC e SNP e a enzima presente no sistema vascular pode regular ou inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP ou ATP (YEGUTKIN, 2008). A NTPDase-3 está associada com estruturas neuronais, onde ela pode atuar regulando os níveis de ATP nos locais pré-sinápticos e coordenar a homeostase de processos como a fome e o sono. As NTPDases 5 e 6 têm uma localização intracelular e podem ser clivadas formando uma proteína solúvel. As NTPDases 4 e 7 estão completamente localizadas no meio intracelular com face para o lúmen de organelas citoplasmáticas (ZIMMERMANN, et al., 2012). A NTPDase-8, última a ser caracterizada, mostrou uma grande expressão no fígado com níveis menores da enzima detectados nos rins e jejuno. A enzima também demonstrou envolvimento na regulação da secreção da bile (YEGUTKIN, 2008).

A família das NPPs (nucleotídeo pirofosfatase/fofosdiesterases) é constituída por sete enzimas nomeadas de NPP1 até NPP7, sendo numeradas de acordo com sua ordem de descoberta (YEGUTKIN, 2008). A NPP2 é a única secretada no meio extracelular, sendo as demais ligadas à membrana por um único domínio transmembrana (STEFAN, et al., 2006). Estas enzimas possuem uma ampla especificidade por substratos e uma ampla distribuição tecidual o que lhe confere múltiplos papéis biológicos, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização purinérgica, regulação dos níveis de pirofosfato extracelular, resistência à insulina no Diabetes tipo II, proliferação e motilidade celular (STEFAN, et al., 2005; 2006). Entretanto somente as NPP1, 2 e 3 são capazes de hidrolisar nucleotídeos e são, portanto relevantes no contexto da cascata de sinalização purinérgica (STEFAN, et al., 2006; YEGUTKIN, 2008).

A E-5'-NT é uma glicoproteína ligada a membrana via um glicosilfosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular que catalisa a hidrólise éster fosfórica do 5'-ribonucleotídeo para o correspondente nucleosídeo e fosfato. Geralmente o nucleotídeo mais susceptível à hidrólise é o AMP, o qual formará a Ado (ZIMMERMANN, et al., 2012). O ancoramento da enzima pode ser clivado por uma fosfolipase C específica para GPI dando origem às formas solúveis da enzima. Sete membros dessa família já foram caracterizados, apresentando diferentes localizações: cinco no citosol, um na matriz mitocondrial e um ancorado na membrana plasmática. Os sete membros diferem entre si através das suas propriedades moleculares e cinéticas, bem como de sua especificidade pelo substrato (BOROWIEC, et al., 2006). Variadas funções já foram atribuídas à E-5'-NT de

acordo com sua expressão tecidual e celular. O seu principal papel fisiológico é a formação de Ado a partir do AMP extracelular (ROBSON, et al., 2006). No sistema nervoso, ativação dos receptores P1 resulta principalmente na inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios, enquanto que em sistema vascular, resulta em vasodilatação e na inibição da agregação plaquetária (BURNSTOCK, 2007).

A adenosina desaminase catalisa a desaminação irreversível de adenosina e 2'-deoxiadenosina para inosina e 2'-deoxiinosina, respectivamente. Desta forma é responsável por regular as concentrações extracelulares de Ado (YEGUTKIN, 2008). Em humanos, três formas moleculares da ADA já foram encontradas: a ADA1, a ADA1+CP, a qual é formada por duas moléculas de ADA1 combinadas por uma proteína de ligação (CP), e a ADA2 codificada por um gene separado de posição ainda desconhecida. Essas formas da enzima diferem entre si através de características como peso molecular, propriedades cinéticas e distribuição tecidual (SHAROYAN, et al., 2006). A ADA1 está presente em todos os tecidos humanos e representa a maior parte da atividade da ADA total, enquanto que a ADA2 é a isoenzima predominante no soro (IWAKI-EGAWA, et al., 2004; ZAVIALOV, et al., 2010).

A importância das ectoenzimas NTPDase, NPP, E-5'-NT e ADA no processo de regulação da formação de trombos e homeostasia sanguínea em diversas condições patológicas tem sido alvo de estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa. Dentre estes, o papel das enzimas foi avaliado no câncer (MALDONADO, et al., 2010; ZANINI, et al., 2012), esclerose múltipla (SPANVELLO, et al., 2010), artrite reumatoide (BECKER, et al., 2010), infarto agudo do miocárdio (BAGATINI, et al., 2008) e diabetes (LUNKES, et al., 2004; STEFANELLO, et al., 2016).

Do mesmo modo, estudos envolvendo a atividade das ectonucleotidases no hipotireoidismo e no hipertireoidismo também vêm sendo realizados e seus resultados demonstram alterações enzimáticas, evidenciando a suscetibilidade destas enzimas a variações nos níveis dos hormônios tireoidianos (BRUNO, et al., 2011; COTOMACCI, et al., 2012; BALDISSARELLI, et al., 2016). Considerando-se tais trabalhos que sugerem uma possível participação do sistema purinérgico na fisiopatologia de várias doenças, entre elas patologias endócrinas, como é o caso do hipotireoidismo, torna-se extremamente interessante elucidar as possíveis relações entre o sistema purinérgico e as patologias associadas aos distúrbios da tireoide decorrentes de alterações plaquetárias.

Cabe ressaltar que alguns estudos têm sugerido que o estresse oxidativo que acompanha as doenças tireoidianas pode induzir disfunção endotelial e aumentar a reatividade

plaquetária através de efeitos diretos sobre as plaquetas, tais como um aumento da peroxidação lipídica e depleção de sistemas de defesa antioxidantes (SANTI, et al., 2014; BALDISSARELLI, et al., 2016). Em conjunto, estes mecanismos podem contribuir para o aumento do potencial trombótico evidenciado no hipotireoidismo (COLWELL E NESTO, 2003; GRANT, 2007).

A oxidação das moléculas faz parte da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, as espécies reativas são produzidas naturalmente em quantidades controladas ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS E DAVID, 2006). Os radicais derivados do oxigênio e nitrogênio, mais conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), são moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e, quimicamente, muito reativas, pois apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos (HALLIWELL, 2011). Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicais geradas nos sistemas vivos. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), é a ERO primária, resultante da redução monovalente do O_2 até H_2O e pode reagir com outras moléculas para gerar ERO secundárias (VALKO, et al., 2007). O ($O_2^{\cdot-}$) é considerado um radical pouco reativo, entretanto, pode estar associado a lesões biológicas secundárias (HALLIWELL, 2011).

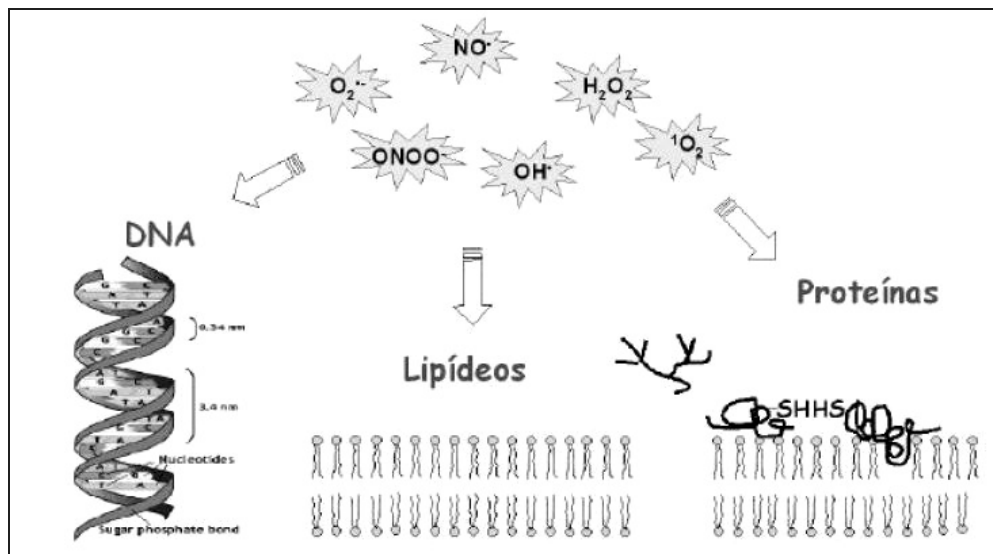
O radical hidroxil (OH^{\cdot}) tem uma alta reatividade, com uma meia vida bem curta de aproximadamente 10^{-9} s. Outra ERO, gerada nos sistemas vivos, é o radical peroxil (ROO^{\cdot}). Os peroxissomos são conhecidos por produzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sob condições fisiológicas, onde o consumo de oxigênio leva à produção de H_2O_2 , o qual participa da oxidação de uma variedade de moléculas (VALKO, et al., 2007).

As espécies reativas, quando presentes em quantidades exageradas e em desequilíbrio com os antioxidantes causam um quadro de estresse oxidativo, que leva a danos a lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (REDON, et al., 2003) (Figura 8). Se esses danos não forem reparados, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos, podendo levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e complicações vasculares (HALLIWELL, 2006; ZHU, et al., 2007; ZANINI, et al., 2013).

A membrana celular é o componente mais susceptível à ação deletéria das espécies reativas, devido à peroxidação lipídica que ocorre quando essas reagem com lipídeos insaturados. A reação causa alterações na estrutura, permeabilidade e fluidez da membrana celular, afetando as proteínas transmembrana como enzimas, receptores e canais iônicos, com consequente perda de seletividade nas trocas iônicas e liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos (DMITRIEV E TITOV, 2010). Um dos produtos

da lipoperoxidação bem conhecidos é o malondialdeído (MDA), que é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados (CHERUBINI, et al., 2005). Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da lipoperoxidação (KASHYAP, et al., 2005).

Figura 8 – Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e seus alvos biológicos.



As moléculas proteicas também são alvos biológicos e podem sofrer alterações por meio da ação danosa das espécies reativas, desencadeando o processo de oxidação dos seus aminoácidos, além de fragmentação, modificações na hidrofobicidade e formação de novos grupos reativos, como os grupos carbonil, alterando, assim, a sua capacidade funcional (DONNE et al., 2003; MORAES, 2013). A produção dos grupos carbonil se dá pela oxidação das cadeias laterais das proteínas ou através de uma reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas dos aminoácidos cisteína, histidina e lisina com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (STADTMAN, 2004). Os níveis de proteína carbonil e de peroxidação lipídica são frequentemente utilizados como marcadores de dano oxidativo. Alguns estudos já relataram o aumento desses biomarcadores tanto em pacientes quanto em animais com distúrbios tireoidianos (SANTI, et al., 2014).

Para equilibrar e neutralizar os efeitos das espécies reativas de oxigênio o organismo dispõe da ação de um sistema antioxidante, formado por defesas enzimáticas e não enzimáticas, que atuam concomitantemente desempenhando seu papel na proteção celular.

Essas defesas antioxidantes são extremamente importantes, pois promovem a supressão direta de ERO, fornecendo a proteção máxima para os sítios biológicos. Assim, na maioria dos casos, há um decréscimo das defesas antioxidantes na tentativa de recuperar o balanço oxidativo celular e compensar o excesso de ERO lançados na circulação (KLAUNIG E KAMENDULIS, 2004).

A defesa enzimática envolve a ação cooperativa de enzimas intracelulares que agem juntas na neutralização das ERO (NORDBERG E ARNER, 2001). A glutathione S-transferase (GST) é parte importante dessa defesa, está entre as enzimas detoxificantes mais estudadas em diferentes organismos e pertence a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas neutralizando-as e tornando-as mais hidrossolúveis e de fácil excreção (AQUILANO, et al., 2014).

Em adição, a defesa não enzimática inclui antioxidantes como o ácido ascórbico, tocoferol, vitamina A e glutathione. Seus mecanismos de ação são diversos, podendo incluir inibição da formação de ERO e varredura destas e seus precursores (HALLIWELL, 2006). O ácido ascórbico (vitamina C) é um nutriente hidrossolúvel e termolábil encontrado primariamente em frutas e vegetais e exerce ação protetora sobre componentes hidrossolúveis do organismo (MAYNE, 2003). Ele inclui compostos com atividade antioxidante como o ácido L-ascórbico e ácido L-dehidroascórbico, os quais são absorvidos pelo trato gastrointestinal. (HALLIWELL, 2011).

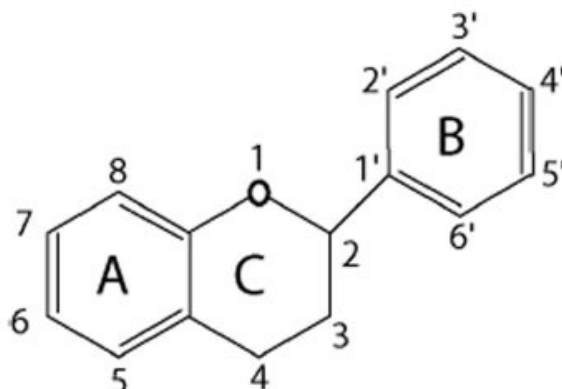
Os tióis proteicos (T-SH) e não-proteicos (NPSH) são outros exemplos de antioxidantes com importante função na defesa contra ERO. A glutathione reduzida (GSH) é o tiol não-proteico mais abundante presente nas células animais e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína, um de seus aminoácidos componentes. A GSH possui a capacidade de transformar a vitamina C e a vitamina E oxidadas, em suas formas originais e também desempenha um papel protetor frente às proteínas. Além disso, tem um papel importante na síntese e reparo da molécula do DNA e é usada pelo fígado na desintoxicação de compostos tóxicos (TOWNSEND E TEW, 2003).

A ação da GSH envolve a decomposição do H_2O_2 , que é convertido em água em uma reação catalisada pela GPx, às custas da GSH; a glutathione oxidada resultante é reciclada à sua forma reduzida pela glutathione reductase e NADPH (Figura 4). Dessa forma, este processo de reciclagem e consequente manutenção de níveis adequados de GSH podem prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (GIUSTARINI, et al., 2011). Em situações de estresse oxidativo muito intenso a GSH pode ser perdida de maneira irreversível, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (GUL, et al., 2000).

A melhora dos sintomas de algumas doenças e diversos efeitos benéficos vem sendo cada vez mais atribuída aos compostos presentes nos alimentos, os quais além da função nutricional e do apelo sensorial, podem estar relacionados à respostas fisiológicas específicas nos organismos. Os alimentos e seus antioxidantes naturais têm sido então amplamente estudados na tentativa de serem descobertas novas funções e propriedades dos mesmos, que possam auxiliar no tratamento e prevenção das doenças (SCHMATZ, et al., 2009; DA COSTA, et al., 2015). Dentre esses estudos, o uso de compostos naturais como os flavonoides tem sido foco de grande interesse (IRITI E FAORO, 2009) e sustentam a hipótese de que as propriedades antioxidantes desses compostos podem reduzir as reações de peroxidação lipídica e os demais danos oxidativos e possíveis complicações causados por doenças (SCHMATZ, et al., 2012; ANWAR, et al., 2013).

Os flavonoides são uma extensa classe de produtos naturais distribuída no reino vegetal, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Eles são universalmente encontrados em uma grande variedade de frutas, vegetais e algumas bebidas, incluindo chá e vinho, e por isso, são largamente consumidos na dieta humana (ARABBI, et al., 2004; KIM, et al., 2007) A ingestão regular desses compostos tem sido relacionada a diversos efeitos benéficos, devido, além de seu potencial antioxidante, às suas propriedades farmacológicas já reconhecidas, tais como propriedades anticarcinogênica, vasodilatadora, antiagregante, anti-inflamatória, imunostimulante, antialérgica, vasoprotetora, neuroprotetora, entre outras (CHO, et al., 2003; Prior, 2003; ANWAR, et al., 2013).

A estrutura básica dos flavonoides consiste em um núcleo fundamental, constituído por 15 átomos de carbono, com estrutura básica $C_6C_3C_6$ (Figura 9), onde os dois anéis C_6 são necessariamente aromáticos (A e B) conectados por uma ponte de 3 carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C). São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato sendo precursores de outros grupos como aminoácidos alifáticos e terpenoides (QUIDEAU, et al., 2011). Possuem características particulares na sua estrutura química que os diferem entre si, como os tipos de ligações, as quantidades de grupamentos hidroxilas e a presença ou não de grupos cetonas (NIJVELDT, et al., 2001). Devido à ampla diversidade estrutural, os flavonoides são classificados em diferentes classes, tais como flavonas, flavononas, flavanóis, flavonóis, diidroflavonóis e antocianidinas (QUIDEAU, et al., 2011).

Figura 9 – Estrutura química geral dos flavonoides

(Adaptado de DI CARLO et al., 1999).

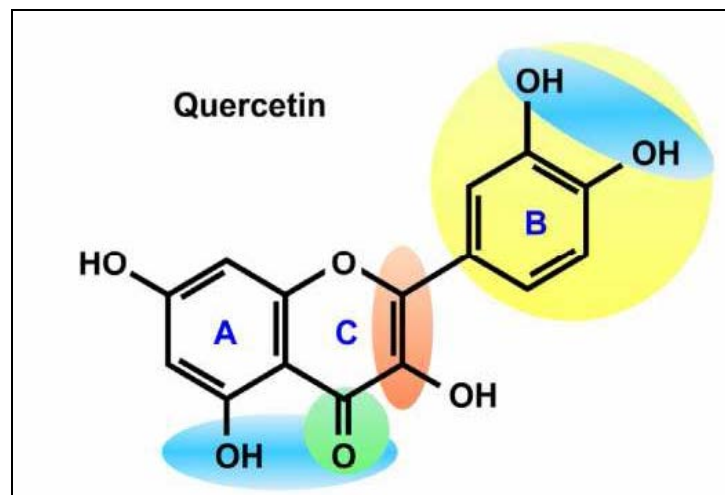
A atividade sequestradora de radicais livres dos flavonoides pode ser prevista devido à sua estrutura química. Assim eles podem neutralizar as espécies reativas através de vários mecanismos, sendo o mais provável a elevada reatividade do grupo hidroxila presente na estrutura da maioria dos flavonoides, o que possibilita sua ação de quelar espécies reativas e estabilizá-las quimicamente. A atividade antioxidante geralmente aumenta com o aumento dos grupos hidroxilas e diminui com as glicosilações (PROCHAZKOVA, et al., 2011).

Os flavonoides podem ser encontrados em duas formas: livres (agliconas) ou ligados a açúcares (glicosídeos). Possuem propriedades químicas dos fenóis e são considerados substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis, sendo que a forma intacta glicosilada é dificilmente absorvida no intestino delgado devido ao favorecimento da sua hidrofiliabilidade. As formas livres de açúcares são então consideradas mais apolares, e as formas glicosiladas, mais polares (YAO, et al., 2004).

A quercetina é um flavonoide aglicona que representa aproximadamente 95% do total de flavonoides ingeridos na dieta humana, e possui um dos mais altos potenciais antioxidantes. Suas principais fontes são a cebola, a maçã, a couve e o brócolis (MUROTA E TERAQ, 2003). É classificada como um flavonol típico e a sua denominação científica é 2-(3,4 diidroxifenil)-3,5,7-triidroxil-4H-1-benzo-piran-4-ona, ou também denominada de 3,5,7,3',4'- pentahidroxiflavona pela Organização Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). A estimativa de ingestão diária média da população é de aproximadamente 25mg/dia (CHOI et al., 2003), o que proporciona uma baixa disponibilidade desse flavonoide no organismo. Assim, a administração de suplemento por via oral pode ser uma alternativa para disponibilizar maior quantidade de quercetina (SILVA, 2011).

A quercetina possui excelente potencial antioxidante devido às suas propriedades de eliminar radicais livres, especialmente radicais hidroxil e superóxido (ZIZKOVA, et al., 2017). Essa atividade antioxidante e farmacológica é possível devido à presença de insaturação em sua estrutura (Figura 10), função 4-oxo no anel C, e o mais importante, o grupamento catecol (QUIDEAU, et al., 2011). Além, disso, foi observada a capacidade da quercetina de unir-se a polímeros biológicos como enzimas, transportadores de hormônios e DNA, podendo quelar íons metálicos de transição, tais como Fe^{2+} e Cu^{2+} , e catalisar transporte de elétrons e depurar radicais livres (DA SILVA, et al., 2006). Sua ação antioxidante pode ser explicada também por sua participação em inibir as enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase e xantina oxidase que estão envolvidas na citotoxicidade oxidativa.

Figura 10 - Estrutura do flavonoide quercetina. Em destaque: O grupamento catecol que é o mais importante (amarelo), presença de insaturação no anel C (vermelho), presença de função 4-oxo no anel C (verde). O grupo catecol e os grupos hidroxil (azul) possuem a habilidade em quelar metais de transição como o cobre e o ferro.



(Adaptado de SPENCER et al., 2003).

Apesar de ser aglicona, a quercetina pode ser encontrada ligada a vários glicosídeos e a digestão da maior parte desses inicia na cavidade oral com a clivagem dos glicosídeos catalisada por β -glicosidases. Uma vez aglicosilada torna-se um composto facilmente absorvido por pequenas células intestinais onde sofre hidrólise para posteriormente entrar na corrente sanguínea (MUROTA E TERAU, 2003). Assim que atinge a corrente sanguínea a

quercetina é metabolizada no fígado e distribuída através da circulação sanguínea para todos os tecidos, podendo então realizar uma gama de efeitos, em sua grande maioria, benéficos (ABDALLA, et al., 2013; MARUNAKA, et al., 2017; ZIZKOVA, et al., 2017).

O consumo diário da quercetina pode estar associado com um risco diminuído de desenvolvimento de várias doenças, entre elas: alterações cardiovasculares, tumores, doenças neurodegenerativas e acidente vascular cerebral (SOLEAS, et al., 2002; PASHEVIN, et al., 2011). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a quercetina protege contra danos oxidativos ao DNA (FAROMBI, et al., 2005), peroxidação de lipídios (YAMAMOTO E OUE, 2006) e liberação da inibição de mediadores inflamatórios (VALERIO, et al., 2009), além de possuir conhecida propriedade neuroprotetora com estudos que demonstraram sua ação no SNC e relataram proteção em testes de memória espacial e redução da morte neuronal em ratos (LU et al., 2006; ABDALLA et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar as ações dos hormônios da tireoide sobre parâmetros oxidativos e de sinalização purinérgica em modelos experimentais e pacientes, além de avaliar o efeito do tratamento com quercetina no SNC de animais com hipotireoidismo.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o efeito do tratamento com quercetina na atividade de enzimas do sistema purinérgico em sinaptossomas cerebrais de ratos com hipotireoidismo.
- Determinar o efeito do tratamento com quercetina na atividade da enzima acetilcolinesterase em sinaptossomas de ratos com hipotireoidismo.
- Determinar a atividade das enzimas do sistema purinérgico em plaquetas de ratos com hipotireoidismo e hipertireoidismo.
- Quantificar os níveis dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em soro de ratos com hipotireoidismo e hipertireoidismo.
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo em soro de ratos com hipotireoidismo e hipertireoidismo.
- Determinar a atividade e expressão das enzimas nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase) e ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) e a atividade da adenosina desaminase (ADA) em plaquetas de pacientes com hipotireoidismo pós tireoidectomia.
- Quantificar os níveis dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em soro dos referidos pacientes.
- Avaliar indicadores do perfil redox em soro ou plaquetas dos referidos pacientes.

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO I

ARTIGO: publicado na Revista “Cellular and Molecular Neurobiology”.

Hypothyroidism enhanced ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in rat synaptosomes can be prevented by the naturally occurring polyphenol quercetin

O trabalho teve como objetivo verificar os efeitos do hipotireoidismo no funcionamento do sistema nervoso central. A extensão dos danos que podem ser causados pelas alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos ainda não está completamente esclarecida. Neste artigo foram avaliadas as atividades de enzimas do sistema colinérgico e purinérgico, as quais possuem amplo envolvimento na função cerebral, em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. O hipotireoidismo foi induzido pela administração de metimazol e comprovado por dosagens hormonais. Além disso, buscou-se testar o possível efeito protetor do polifenol quercetina nesse modelo experimental.

A atividade da enzima 5'-nucleotidase mostrou-se aumentada nos animais com hipotireoidismo e a atividade da enzima acetilcolinesterase diminuída, o que corrobora com a hipótese de alteração em ambos os sistemas purinérgico e colinérgico. O tratamento com quercetina reverteu a atividade aumentada da 5'-nucleotidase, além de diminuir a atividade de ambas as enzimas purinérgicas e também da acetilcolinesterase, o que também aconteceu nos testes *in vitro* e confirmou seu efeito inibidor. Assim é possível sugerir que a quercetina possui ações importantes no SNC, as quais devem ser melhor avaliadas, para comprovar seus efeitos protetores.

Espera-se com esse trabalho auxiliar no entendimento das alterações causadas pelo hipotireoidismo na neurotransmissão purinérgica e colinérgica. Além disso, demonstrar os efeitos da quercetina a fim de que aumente o interesse pelo seu uso como possível adjuvante terapêutico e, assim possa ser utilizada, principalmente em casos onde as doenças levam a alterações nesses sistemas.

Hypothyroidism enhanced ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in rat synaptosomes can be prevented by the naturally occurring polyphenol quercetin

Jucimara Baldissarelli^{1*}, Adriana Santi², Roberta Schmatz³, Fátima Husein Abdalla¹, Andréia Machado Cardoso⁴, Caroline Curry Martins¹, Glaecir R. Mundstock Dias⁵, Nicéia Spanholi Calgaroto¹, Luana Paula Pelinson¹, Karine Paula Reichert¹, Vania Lucia Loro¹, Vera M. Melchiors Morsch¹, Maria R. Chitolina Schetinger^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

² Universidade Federal de Mato Grosso, Conselho de Ensino e Pesquisa, Curso de Medicina. Parque Sagrada Família, Rondonópolis, MT, Brazil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Ibirubá, RS, Brazil.

⁴ Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, Chapecó, SC, Brazil.

⁵ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária Galeão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author. Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55-55-32209557

E-mail addresses: jucimarabaldissarelli@gmail.com (J. Baldissarelli)

mariachitolina@gmail.com (M. R. C. Schetinger)

Abstract

Thyroid hormones have influence on the functioning of the central nervous system. Furthermore, the cholinergic and purinergic systems also are extensively involved in brain function. In this context, quercetin is a polyphenol with antioxidant and neuroprotective properties. This study investigated the effects of (MMI)-induced hypothyroidism on the NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA) and acetylcholinesterase (AChE) activities in synaptosomes of rats and whether the quercetin can prevent it. MMI at a concentration of 20 mg/100mL was administered for 90 days in the drinking water. The animals were divided into six groups: control/water (CT/W), control/quercetin 10mg/kg (CT/Q10), control/quercetin 25mg/kg (CT/Q25), methimazole/water (MMI/W), methimazole/quercetin 10mg/kg (MMI/Q10) and methimazole/quercetin 25mg/kg (MMI/Q25). On the 30th day, hormonal dosing was performed to confirm hypothyroidism, and the animals were subsequently treated with 10 or 25mg/kg quercetin for 60 days. NTPDase activity was not altered in the MMI/W group. However, treatment with quercetin decreased ATP and ADP hydrolysis in the MMI/Q10 and MMI/Q25 groups. 5'-nucleotidase activity increased in the MMI/W group, but treatments with 10 or 25mg/kg quercetin decreased 5'-nucleotidase activity. ADA activity decreased in the CT/25 and MMI/Q25 groups. Furthermore, AChE activity was reduced in all groups with hypothyroidism. *In vitro* tests also demonstrated that quercetin *per se* decreased NTPDase, 5'-nucleotidase and AChE activities. This study demonstrated changes in the 5'-nucleotidase and AChE activities indicating that purinergic and cholinergic neurotransmission are altered in this condition. In addition, quercetin can alter these parameters and may be a promising natural compound with important neuroprotective actions in hypothyroidism.

Keywords: hypothyroidism, synaptosomes, ectonucleotidases, acetylcholinesterase, quercetin

1. Introduction

Triiodothyronine (T3) and tetraiodothyronine (T4) are thyroid hormones that are recognized as key metabolic hormones of the body, which have important effects on the normal functioning of the central nervous system (CNS). The reduction in the synthesis of T3 and T4 leads to hypothyroidism, a relatively common disease resulting in the reduced action of these hormones in the peripheral tissues (Devdhar et al., 2007). Hypothyroidism can lead to an ample range of behavioral and neurological clinical symptoms, including fatigue, drowsiness, loss of concentration and memory, depression, and others (Smith et al., 2002). In rats, thyroid hormone deficiency causes a number of abnormalities in the CNS, including the migration of abnormal cells and demyelination (Bernal et al., 2003; Stoica et al., 2007). However, the relationship between thyroid hormones and psychiatric disorders and cognitive impairments is still uncertain and should be better studied.

Engstrom et al. (1974) established the fundamental role of thyroid hormones in the process of neurotransmission by promoting an increase in the synthesis and sensitivity of central catecholamine receptors in adult brains. Furthermore, adenosine transport and A1 adenosine receptors, which are involved in neurotransmission control, can also be modulated by the thyroid hormones in rat brains (Fideu et al., 1994). Investigations have highlighted a very close association between these hormones and brain cholinergic function (Smith et al., 2002).

ATP and acetylcholine (ACh) are extracellular signaling molecules in the nervous system and other tissues. They can be co-stored in synaptic vesicles and co-released from cholinergic nerves (Burnstock, 2004). ACh and ATP cannot be directly recycled and must first be degraded to either choline or adenosine, respectively, which are then transported back into cells (Zimmermann, 2008).

ATP and the other extracellular nucleoside tri- and diphosphates can be hydrolyzed by NTPDases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase). NTPDases are membrane-bound enzymes that hydrolyze ATP and ADP to AMP, which is subsequently converted to adenosine by 5'-nucleotidase (Spanevello, Mazzanti, Schmatz, et al., 2010). These ectoenzymes are present in the CNS of several species and are involved in the control of nucleotide and nucleoside levels in the synaptic cleft and in the control of purinergic neuromodulation and neurotransmission (Yegutkin, 2008). Because these enzymes contribute to the maintenance of physiological levels of extracellular ATP, ADP, AMP, and adenosine, they could constitute a considerable point of regulation in several pathophysiological conditions, such as the hypothyroidism (Schetinger et al., 2007; Bruno et al., 2011; Zanini et al., 2012; Polachini, Spanevello, Zanini, et al., 2014).

Conversely, studies in experimental models of hypothyroidism have found alterations in the activity of acetylcholinesterase (AChE), indicating modifications to cholinergic neurotransmission in this disease. However, these studies are sometimes unconcluded and are need more explanations. AChE is one of the most efficient biological catalysts known and plays a key role in cholinergic neurotransmission by hydrolyzing the transmitter acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft of cholinergic synapses and neuromuscular junctions (Zimmermann, 2008). Thus, this enzyme is essential in the regulation of many vital functions, including learning, memory, and the cortical organization that controls the movement of the cerebral blood flow (Lendvai e Vizi, 2008).

In the same context, several studies from our laboratory have shown that cholinesterases and ectonucleotidases play an important role in neurotransmission and, thus, changes in the activity of these enzymes have been observed in several diseases, suggesting that this could be an important physiological and pathological parameter (Schmatz, Mazzanti, et al., 2009; Abdalla et al., 2013). Accordingly, Bruno, Ricachenevsky, et al. (2005)

demonstrated that a deficiency of these hormones can induce changes in the enzymatic cascade responsible for the hydrolysis of ATP to adenosine in the CNS. Moreover, changes in the levels of these hormones can also alter the AChE activity (Smith et al., 2002; Carageorgiou et al., 2007b). However, this is the first study aiming to analyze the possible alterations that may occur simultaneously on purinergic and cholinergic systems in the synaptosomes of rats with MMI-induced hypothyroidism as well as the possible effects of quercetin treatment in these animals.

Usually, treatment for hypothyroidism is conducted through the intake of levothyroxine (T4). However, there is a growing interest in natural products such as polyphenols to prevent and improve complications observed in this pathology (Smith et al., 2002), or even, possible side effects caused by medication use. The polyphenols are a large group of compounds that can be divided into several subgroups, including the flavonoids, which have relevant effects in both vegetables and animals. Studies have suggested that these compounds are able to cross the blood-brain barrier (BBB) (Mendez-Armenta e Rios, 2007) and can act as neuroprotective agent, primarily by reducing reactive oxygen species (ROS), by preventing the neurotoxicity of other substances, and by modulating the activities of enzymes such as AChE and ectonucleotidases (Schmatz, Mazzanti, et al., 2009; Goncalves et al., 2010).

One of the most widely and abundantly consumed flavonoids by humans is quercetin, which is primarily found in apples, onions and broccoli (Murota e Terao, 2003). Research has described the various therapeutic properties of quercetin, including antioxidant, anti-inflammatory, antithrombotic, vasoprotective and neuroprotective activities (Dajas, 2012; Seiva et al., 2012; Santi et al., 2014).

Due to the importance of NTPDase, 5'-nucleotidase, adenosine deaminase (ADA) and AChE for CNS functioning, the aim of the present study was to evaluate the activity of these

enzymes in the synaptosomes of the cerebral cortex of rats with MMI-induced hypothyroidism. The animals were treated with quercetin to investigate the potential therapeutic use of this compound in cerebral dysfunction associated with the hypothyroid state.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine and acetylcholine, as well as Trizma base, malachite green, 95% quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxiflavone, $C_{15}H_{10}O_7$, approximately 95% purity), methimazole, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), trichloroacetic acid (TCA), and Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Bovine serum albumin and dibasic anhydrous potassium phosphate (K_2HPO_4) were obtained from Reagen (Colombo, PR, Brazil). Further chemicals used in this experiment were of highest purity.

2.2. Animals

Adult male Wistar rats (50–60 days; 250–300 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria for use in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23 ± 1 °C) on a 12h light/dark cycle with free access to food and water or methimazole solution. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol number 083/2012).

2.3. Experimental induction of hypothyroidism

In order to induce hypothyroidism, the antithyroid drug, MMI, was administered ad libitum in the drinking water at a concentration of 20 mg/100 mL during 90 days of treatment. During this period, the control group animals, CT/W, CT/Q10 e CT/Q25, received only pure water. After 1 month of treatment some animals (two per group) were euthanized and the whole blood collected by cardiac puncture for measurement of the total levels of thyroid hormones (tT3 and tT4) and the synaptosomes of cortex were isolated for enzymatic assay. The induction of hypothyroidism by MMI was confirmed by an enzyme immunoassay (AxSYM ®) (Dias et al., 2012). Only after this confirmation, the remaining animals (8 rats per group) started to receive the quercetin. At the end of the treatment (3 months) the same analysis were performed for assessed the hormone levels. tT3 concentration is expressed as ng/mL plasma and tT4 as µg/mL plasma (Dias et al., 2012). The values are expressed as the means ± SEM (P< 0.05, n=5).

2.4. Treatment with quercetin (C₁₅H₁₀O₇)

The animals were randomly divided into six groups (10 rats per group): Control/water (CT/W); control/quercetin 10 mg/kg (CT/Q10); control/quercetin 25 mg/kg (CT/Q25); methimazole/water (MMI/W); methimazole/quercetin 10 (MMI/Q10); and methimazole/quercetin 25 (MMI/Q25). The animals of the CT/W, CT/Q10 e CT/Q25 groups received only water for drinking during the three months of treatment. In addition, from the second month the animals of the CT/Q10 and CT/Q25 groups received quercetin 10 or 25 mg/kg orally by gavage respectively until the end of treatment. On the other hand, to induce hypothyroidism, the animals of the MMI/W, MMI/Q10 and MMI/Q25 groups received for drinking a 20 mg/100mL solution of MMI during the three months of treatment. Moreover, from the second month until the end of treatment, the remaining animals of the MMI/Q10 and

MMI/Q25 groups received the MMI solution present in the drinking water and quercetin 10 or 25 mg/Kg orally by gavage, respectively.

Quercetin was freshly prepared in 25% ethanol and was administered orally, by gavage, between 10 a.m. and 11 a.m. once a day for 60 days. The administered volume did not exceed 0.1 mL/100g rat weight. The choice of 10 or 25 mg/kg doses of quercetin was made based on previous works of our research group and also in some studies that used these same concentrations of quercetin and observed beneficial results (Punithavathi e Prince, 2010) (Abdalla *et al.*, 2014).

It is important to note that controls were performed in order to correct the vehicle (ethanol 25%) interference and no differences between vehicle and control enzyme activities were observed (data not shown), then they were grouped into one group named Control/water (CT/W).

2.5. Synaptosomes preparation

Cerebral cortex was diluted 1:10 with an ice-cold medium (medium I) that consisted of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, pH 7.5, and then homogenized in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated using a discontinuous Percoll gradient as previously described (Nagy e Delgado-Escueta, 1984). The pellet was suspended in an isoosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4–0.6 mg/mL. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0–4°C throughout the procedure, and used for the enzymatic assays.

2.6. NTPDase and 5'-nucleotidase activities assays

The assay to detect NTPDase enzymatic activity in the synaptosomes was carried out in a reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose,

225 mM sucrose and 45 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The final volume was 200 μ L, as described in previous works from our laboratory (Mazzanti et al., 2009; Spanevello et al., 2009). Twenty microliters of enzyme preparation (8–12 μ g of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM. Incubation proceeded for 20 min in both cases. 5'-nucleotidase activity was determined in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 μ L. Twenty microliters of enzyme preparation (8–12 μ g of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of AMP, bringing the final concentration to 2.0mM, and proceeded for 20 min. In all cases, the reactions were stopped by the addition of 200 μ l of 10% TCA to obtain a final concentration of 5%. The released inorganic phosphate (Pi) was assayed using the method of Chan et al. (Chan et al., 1986), in which malachite green was used as a colorimetric reagent and KH₂PO₄ was used as a standard. Controls were carried out by adding the synaptosomal fraction after the addition of TCA to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate. The enzymatic activities were reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.7. Adenosine deaminase (ADA) activity

The ADA activity in synaptosomes was determined according to a previously described method (Giusti, 1984) based on the Bertholet reaction. In this assay, ammonia is released from adenosine to form a colored indophenol complex, which is quantified spectrophotometrically. Briefly, 25 μ L of synaptosome was reacted with 21 mmol/L of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37 °C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in an excess of adenosine. The protein content used

for the platelet experiment was adjusted to a range of 0.7 to 0.9 mg/mL. The results were expressed in U/mg protein.

2.8. AChE activity assay

The AChE enzymatic assay was determined using a modification of the spectrophotometric method developed by Ellman et al. (1961) as previously described by Rocha et al. (1993). The reaction mixture (2 mL final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid-nitrobenzoic, which is measured by the absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25°C. The enzyme (40–50 µg of protein) was pre-incubated for 2 min and the reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide. All samples were run in triplicate and the enzymatic activities were expressed in µmol AcSCh/h/mg of protein.

2.9. *In vitro* experiments

For these experiments were utilized healthy rats. To evaluate the effect of quercetin in nucleotide hydrolysis in the synaptosomes of the cerebral cortex, *in vitro* experiments were performed using different concentrations of quercetin (in 1, 5, 10, 25, 50 µM) diluted in methanol in the presence of ATP, ADP, and AMP as substrates and the incubation medium described above. The same concentrations of quercetin used in assessing ADA activity were used here. To evaluate the effect of quercetin on the AChE activity in synaptosomes from the cerebral cortex, the *in vitro* experiments were performed using 10, 25, 50, 75, 100, and 200 µM of quercetin diluted in methanol. The final concentrations of methanol, when tested alone in the incubation media, did not affect the enzymatic activity. All the other procedures for enzymatic assays were the same as those described above.

2.10. Protein determination

The protein content was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976). Serum albumin was used as a standard.

2.11. Statistical analysis

The statistical analysis used for *in vitro* assays was one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests. For hormone levels and *ex vivo* assays after one month of MMI administration T test was utilized and, for analyzed the other *ex vivo* assays two-way ANOVA was used, followed by Bonferroni post-test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference for both analyses used. All data were expressed as the means \pm S.E.M.

3. Results

3.1. Body weight, plasma tT3 and tT4 levels

Initially, it was necessary to confirm the hypothyroidism induction in the group of animals used in this work. For this, the analysis of plasma tT3 and tT4 levels in the first and third months of the experimental period was performed. T test revealed that MMI significantly reduced the levels of tT3 and tT4 levels after 1 month of administration. In addition, MMI kept this significant effect on tT3 and tT4 levels, which remained diminished after 3 months and was not altered with quercetin treatment. Furthermore, the MMI administration caused a significant reduction in the body weight of animals at the end of experiment when compared with control group. The treatment with quercetin (MMI/Q25) prevent this effect. (Table1).

3.2. NTPDase and 5'-nucleotidase activities

Hypothyroidism can result in neurodegenerative disorders (31), and the role of the purinergic ecto-enzymes in SNC is well known (10). Thus, the present study assessed whether rats with MMI - induced hypothyroidism present changes in activity of these enzymes in cortex synaptosomes. The figure 1 shows the results obtained after one month of MMI administration. As it is shown in figure 1A and 1B, the results obtained for NTPDase activity using ATP or ADP as substrate was not altered in the hypothyroid (MMI) group compared to the control (CT) group. Moreover, in the figure 2A (ATP) and 2B (ADP), it is possible observe that in the third month of treatment the NTPDase activity in MMI/W group kept the same conduct of the first month when it presented no difference compared to the CT/W group.

Meantime, interestingly, the results obtained for the 5'-nucleotidase activity in the first month revealed that AMP hydrolysis was increased in rats with hypothyroidism (MMI/W) when compared to the control group (CT/W) (Fig. 1C, $P<0.01$). Similarly, in the third month of the treatment, the 5'-nucleotidase activity (AMP hydrolysis) was also enhanced in MMI/W group compared to CT/W group (Fig. 2C, $P<0.05$).

On the other hand, since it is known that quercetin has neuroprotective properties, the current study assessed whether the treatment with 10 or 25 mg of this flavonoid interfere in the enzymatic activities in the synaptosomes of the cerebral cortex of rats with hypothyroidism. Thus, the results showed that when quercetin was administered to the control rats ATP hydrolysis was significantly decreased in the CT/Q10 and CT/Q25 groups compared to the CT/W group. Moreover, post hoc comparisons revealed that ATP hydrolysis was significantly decreased in the MMI/Q10 and MMI/Q25 groups compared to the CT/W group, but there was no difference when compared to the MMI/W group (Fig. 2A, $P<0.05$). In addition, the treatment with quercetin decreased ADP hydrolysis in the MMI/Q10 and

MMI/Q25 compared to the CT/W group ($P<0.05$ and $P<0.001$ respectively) and compared to the MMI/W group ($P<0.05$ and $P<0.001$ respectively). Moreover, the administration of quercetin to control rats also decreased ADP hydrolysis in the CT/Q10 and CT/Q25 groups compared to the CT/W group (Fig. 2B, $P<0.05$).

In addition, when 5'-nucleotidase activity was assessed the results showed a significant interaction between hypothyroidism and quercetin ($F_{5,42} = 4,81$; $P < 0.01$). Post hoc comparisons indicated that quercetin treatment decreased AMP hydrolysis in the MMI/Q10 and MMI/Q25 groups compared to the CT/W and MMI/W group (Fig. 2C, $P<0.05$ and $P<0.001$ respectively). When quercetin was given to control rats, the 5'-nucleotidase activity (AMP hydrolysis) was decreased in the CT/Q10 and CT/Q25 groups compared to the CT/W group ($P<0.05$).

Remarkably, our results showed that quercetin can decrease the NTPDase and 5'-nucleotidase activities. Thus, to confirm the *per se* inhibitory effect of this important flavonoid, *in vitro* analysis were performed. It was possible to observe a significant decrease in the ATP hydrolysis *in vitro* in cerebral cortex of groups treated with 25 and 50 μM of quercetin in comparison to the control group (Fig. 3A, $P<0.05$). We also observed a significant decrease in ADP hydrolysis *in vitro* in groups treated with concentrations of 25 and 50 μM of quercetin compared to the control group (Fig. 3B, $P<0.05$). The *in vitro* results obtained for 5'-nucleotidase activity were similar to those found for the NTPDase activity: a significant decrease was observed in AMP hydrolysis in groups treated with 25 and 50 μM of quercetin when compared to the control (Fig. 3C, $P<0.05$).

3.3. Adenosine deaminase (ADA) activity

The results obtained for the ADA activity in the first month (Fig. 1D) showed that there was no difference in hypothyroid group (MMI) compared to the control group. The

same result was observed for this enzyme in the third month of the treatment when there was not significant difference in MMI/W group compared to the CT/W group (Fig. 4).

However, *post hoc* comparisons revealed that the quercetin treatment decreased ADA activity in the MMI/Q25 group compared to the MMI/W group (Fig. 4, $P < 0.001$). When quercetin was given to control rats, the hydrolysis of adenosine was decreased in the CT/Q25 group compared to the CT/W group ($P < 0.001$). No significant alterations in ADA activity were observed in the CT/Q10, MMI/Q10 and MMI/W groups. The *in vitro* results obtained for the ADA activity were not significantly different (data not shown).

3.4. AChE activity

Besides purinergic signaling, other important system broadly involved in the neurotransmission is the cholinergic system. In this context for evaluate the effects of hypothyroidism in this system we assessed AChE assay. In the first month of MMI administration the AChE activity was not altered in hypothyroid (MMI) animals compared to the control group (Fig. 1E). However, interestingly, on the third month, *post hoc* comparisons showed that the AChE activity was significantly decreased in the MMI/W group compared to the CT/W group (Fig. 5, $P < 0.05$).

Furthermore, this study assessed the effects of quercetin on AChE activity in the synaptosomes of the cerebral cortex of rats with hypothyroidism and the quercetin treatment significantly decreased the AChE activity in the MMI/Q25 group compared to the CT/W group (Fig. 5, $P < 0.001$). No difference was observed in the CT/Q10 and CT/Q25 groups compared to the CT/W group.

The *in vitro* results obtained for AChE activity in the synaptosomes of the cerebral cortex are shown in figure 6. As can be observed, the AChE activity was significantly

decreased under treatment with 100 and 200 μM of quercetin relative to the control group ($P < 0.05$).

4. Discussion

Thyroid hormones are essential for the normal development of metabolism and have been associated with brain development, especially in neurotransmission and the maintenance of neuronal system functions (Carageorgiou et al. 2007; Smith et al. 2002). Furthermore, it is well known that the ectonucleotidases are located on the extracellular surface (Tougu and Kesvatera 1996) and also intracellularly (Yegutkin 2008). In addition, the AChE enzyme found in nervous tissue is primarily of type G4, which is connected to the plasma membrane (Zimmermann et al. 2008).

Our results demonstrated that when ATP or ADP were used as substrates, the NTPDase activity showed no significant changes between the group of animals with hypothyroidism and the control groups. This result was observed both in the first as well as in third month of treatment, suggesting that the disease does not affect the activity of this enzyme in the synaptosomes of the cerebral cortex. On the other hand, the AMP hydrolysis by activity of 5'-nucleotidase presented an increase in the group of animals with hypothyroidism in the first and the third months, which could result in an increase in the levels of adenosine since the early stages of disease. It is important to note that this nucleoside has a significant role in regulating neuromodulation and in the release of several neurotransmitters that act both pre- and post-synaptically (Cunha, 2001).

In addition, we observed that there was no difference in the activity of ADA in animals with hypothyroidism in both, first and third month of the treatment. Thus, even with maintenance of the treatment, the enzyme activity was not altered.

On the other hand, when animals with hypothyroidism were treated with quercetin (10 or 25 mg/kg), a decrease in the activity of NTPDase and 5'-nucleotidase was observed. The reduced activities of these enzymes could contribute to a reduction in ATP, ADP and AMP hydrolysis. Moreover, ADA activity also decreased in the groups of animals with hypothyroidism treated with quercetin. This decrease could contribute to moderately increased levels of adenosine, which acts as a neuroprotective molecule. Thus, we suggest that one of mechanisms by which quercetin exerts its beneficial effects in the CNS is through the modulation of ADA activity because inhibiting the activity of this enzyme can contribute to increased adenosine levels, which are known to exert protective effects in the brain (Dajas, 2012; Dong et al., 2014).

In agreement with these findings, the *in vitro* tests showed that quercetin altered the activities of NTPDase and 5'-nucleotidase. There was a decrease in the hydrolysis of the nucleotides ATP and ADP when concentrations of 25 and 50 μ M of quercetin were administered. The *in vitro* results obtained for the 5'-nucleotidase activity were similar to those found for the NTPDase activity. A decrease in AMP hydrolysis was observed when concentrations of 25 and 50 μ M of quercetin, which would generate a decreased amount of adenosine.

The results obtained in our study are in accordance with several other studies that have suggested that the quercetin inhibits the activities of ectonucleotidases. Schmatz et al. (2013) demonstrated that quercetin inhibits the ATP, ADP and AMP hydrolysis *in vitro* in platelets from control and diabetic rats. Furthermore, Abdalla et al. (2013) also noted a decrease in the nucleotide hydrolysis caused by quercetin in the cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. In addition, 5'-nucleotidase was also inhibited by quercetin in the human U138MG glioma cell line (Braganhof et al., 2007). However, more studies are needed to

elucidate the mechanism by which quercetin inhibits the activities of NTPDase and 5'-nucleotidase in the CNS.

In relation to the results obtained for the AChE enzyme, our findings demonstrated that the activity of this enzyme was decreased in the cerebral cortex synaptosomes from rats with hypothyroidism in the third month of the treatment. These results are similar to those found by Carageorgiou et al. (2007b), who also observed a significant reduction in AChE activity in the cerebral cortexes of rats with hypothyroidism. Moreover, Virgili et al. (1991), also reported decreased AChE activity in the prefrontal cortex and the striatum of rats with hypothyroidism. It has been reported that a deficit in thyroid hormones generates cholinergic neurons with small somata and decreased numbers (Gould e Butcher, 1989), thus leading to an insufficient synthesis of the neurotransmitter ACh. Further studies have demonstrated a significant decrease in ACh content in the hippocampus of rats with adult-onset hypothyroidism (Wang et al., 2014). A decrease in ACh content has also been identified in the spinal cords of adult rats with methimazole-induced hypothyroidism (Molinengo et al., 1986).

These findings allowed us to infer that the ACh levels may in fact be diminished in the CNS of rats with MMI-induced hypothyroidism due to a decrease in the synthesis of the neurotransmitter. Based on these results, it is plausible that this decline in AChE activity after MMI administration could be correlated with the disruption of the central homeostatic mechanism and alterations in the neuronal functional state. Thus, the reduced activity of AChE may be a compensatory mechanism for increasing ACh levels and restoring brain function in hypothyroidism.

Interestingly, in animals with hypothyroidism treated with 25 mg/kg quercetin, the AChE activity remained at decreased levels. Based on these results, we suggest that quercetin treatment can increase synaptic transmission by inhibiting AChE, causing reduced hydrolysis of free ACh and an increase in ACh levels in the synapse. It is important to note that ACh is

the main neurotransmitter of the cholinergic system, which plays vital functions in learning, memory, movement control, and the modulation of cerebral blood flow (Kiehn, 2006).

Natural compounds that present AChE inhibitory properties can be important co-therapeutics for the treatment of many neurological diseases, such as Alzheimer's. Thus, we suggest that quercetin can increase the efficiency of cholinergic transmission by inhibiting AChE, thus preventing the hydrolysis of released ACh. This demonstrates that quercetin may consequently improve cognitive dysfunctions.

In addition, *in vitro* tests with quercetin performed in rat cortex synaptosomes demonstrated an inhibition of enzymatic activity that was proportional to the dose tested. These results are in accordance with Khan et al. (2009), who used enzymatic kinetic studies to demonstrate that the quercetin is a competitive, concentration-dependent inhibitor of AChE. In that work, Khan et al. (2009) also showed that quercetin formed several strong hydrogen bonds with several important amino acid residues of the AChE enzyme, which, in addition to hydrophobic interactions, could also explain the potency of the compound as an AChE inhibitor. We observed that the enzymatic activity tended to decrease in the control groups treated with quercetin, which corroborated our *in vitro* results. Previous studies have shown that natural substances such as quercetin (Abdalla et al., 2013) and other dietary components such as resveratrol (Schmatz, Schetinger, et al., 2009), chlorogenic acid (Kwon et al., 2010), caffeic acid (Anwar et al., 2012) and rosmarinic acid (Mushtaq et al., 2014) alter the activity of AChE in the CNS. Therefore, these *in vivo* and *ex vivo* results confirm that quercetin exerts a neuroprotective role by increasing the levels of ACh.

5. Conclusions

The results obtained in the present study demonstrated alterations in the activities of 5'-nucleotidase and AChE in the cerebral cortex synaptosomes from rats with

hypothyroidism, indicating that purinergic and cholinergic neurotransmission are altered in this condition. Furthermore, quercetin treatment decreased the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleosides, suggesting an increase in the production of adenosine in the CNS. This may have an important neuroprotective role in pathophysiological conditions caused by hypothyroidism. Thus, we can suggest that quercetin may be a promising natural polyphenolic compound with important neuroprotective actions. Future studies should therefore investigate the use of quercetin as a better therapy for patients with hypothyroidism-induced purinergic and cholinergic disorders.

6. Acknowledgments

The authors wish to thank 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).

LEGENDS

Fig. 1. Effects of hypothyroidism on NTPDase using ATP (A) and ADP (B) as substrate, 5'-nucleotidase using AMP (C), adenosine deaminase (D) and acetylcholinesterase (E) activities in the first month of the treatment with MMI. The data are presented as the means \pm SEM ($P < 0.05$; $n=5$).

Fig. 2. Effects of quercetin on NTPDase using ATP (A) and ADP (B) as substrate and 5'-nucleotidase using AMP (C) as substrate in the synaptosomes of rats with MMI-induced hypothyroidism. The data are presented as the means \pm SEM. * and *** represent a significant difference with the CT/W group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively; $n=8$). # and ### represent a significant difference with the MMI/W group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$; $n=8$).

Fig. 3. *In vitro* effects of quercetin on ATP (A), ADP (B) and AMP (C) hydrolysis in the synaptosomes of the rat cerebral cortex. The first bars represent the control. The other bars represent different concentrations of quercetin (μM). Each column represents a mean \pm SEM. The results are expressed as nmol/Pi/min/mg protein. Different letters indicate significant differences from the control ($P < 0.05$; $n=5$).

Fig. 4. Effects of quercetin on ADA activity in the synaptosomes of rats with MMI-induced hypothyroidism. The bars represent the means \pm SEM. *** represents a significant difference with the CT/W group and ### represents a significant difference with the MMI/W group ($P < 0.001$; $n=8$).

Fig. 5. Effects of quercetin on AChE activity in the synaptosomes of rats with MMI-induced hypothyroidism. The bars represent the means \pm SEM. * and *** represent a significant difference with the CT/W group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively; $n=8$).

Fig. 6. *In vitro* effects of quercetin on the AChE activity in the synaptosomes of the rat cerebral cortex. The first bar represents the control. The other bars represent different

concentrations of quercetin (μM). Each column represents a mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences from the control ($P < 0.05$; $n=5$).

TABLES

Table 1. Final body weight and plasma tT3 and tT4 levels at the first and third months of assessment.

	CT/W	CT/Q10	CT/Q25	MMI/W	MMI/Q10	MMI/Q25
Final body weight (g)	334,30 ± 17,6	341,5 ± 9,32	370,80 ± 13,18	252,9 ± 8,34*	264,30 ± 12,67*	314,60 ± 17,63
tT3 (1st month)	0.60 ± 0.01	-	-	0.19 ± 0.03***	-	-
tT3 (3rd month)	0.50 ± 0.03	0.53 ± 0.05	0.54 ± 0.03	0.31 ± 0.03*	0.32 ± 0.010**	0.030 ± 0.04*
tT4 (1st month)	3.05 ± 0.15	-	-	0.65 ± 0.07***	-	-
tT4 (3rd month)	2.72 ± 0.15	3,02 ± 0.19	3.03 ± 0.28	0.15 ± 0.07***	0.23 ± 0.03***	0.74 ± 0.11***

tT3 is expressed as ng/mL plasma and tT4 as µg/mL plasma. * and *** show a significant difference from the CT/W group ($P < 0.05$ or $P < 0.001$, $n=5$). The values are expressed as the means ± SEM.

FIGURES

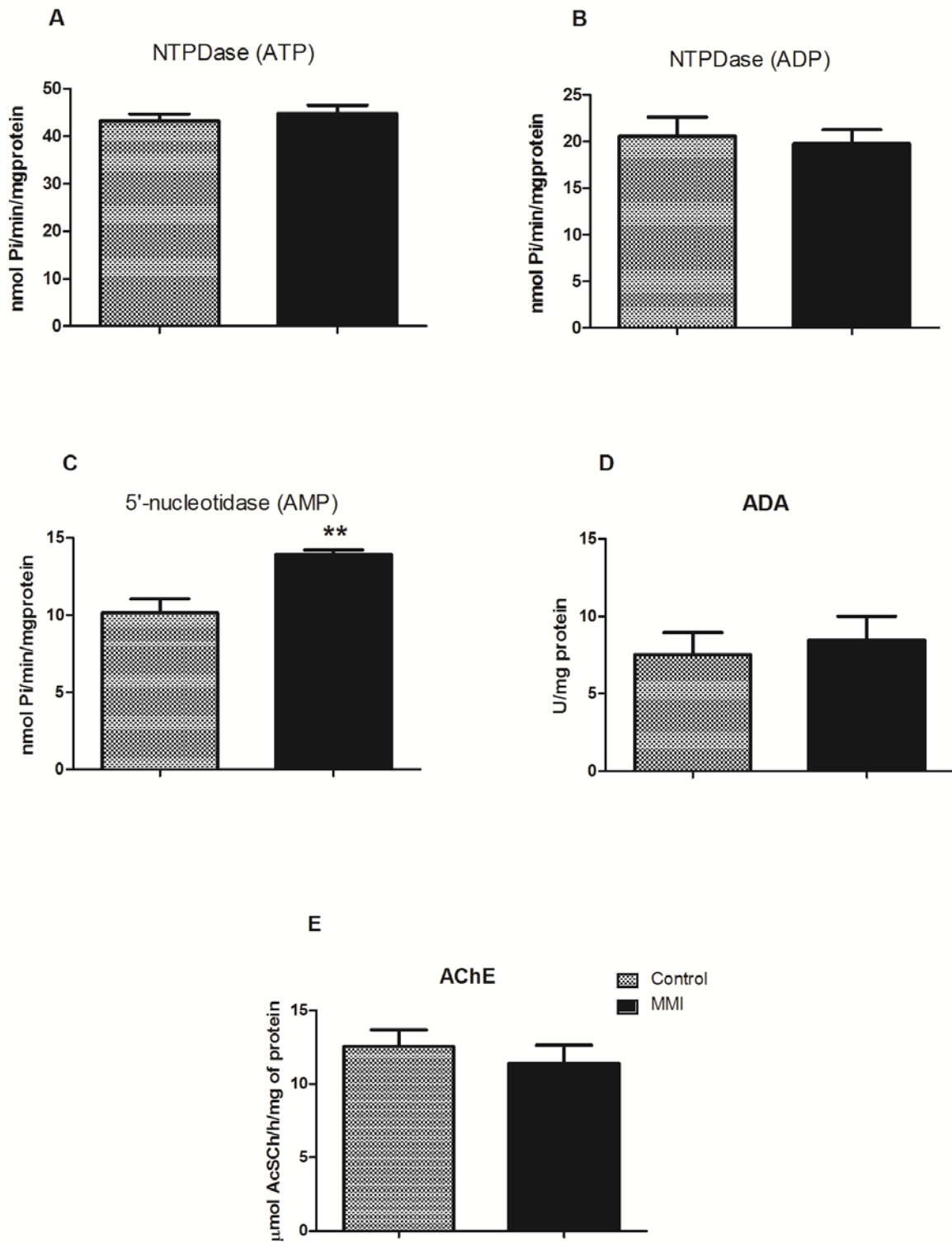


Figure 1

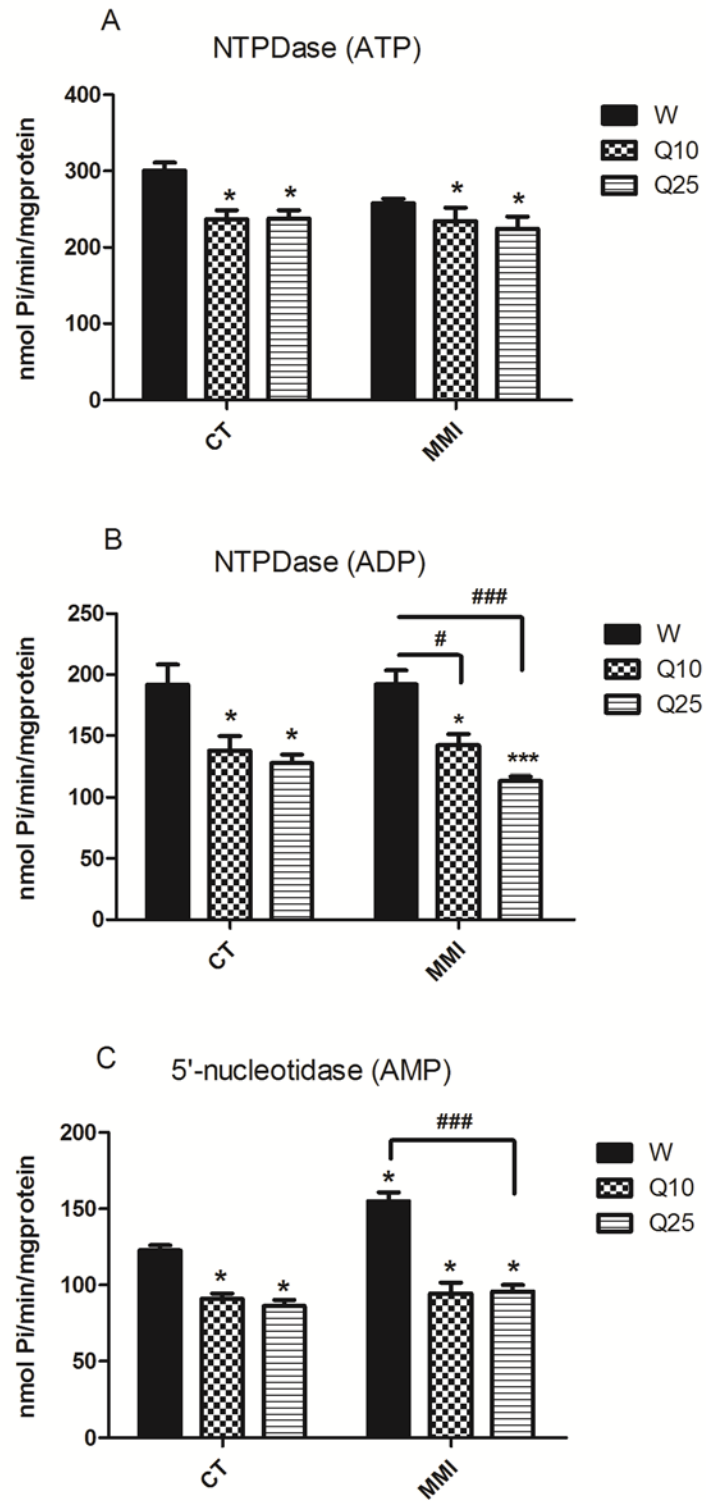


Figure 2

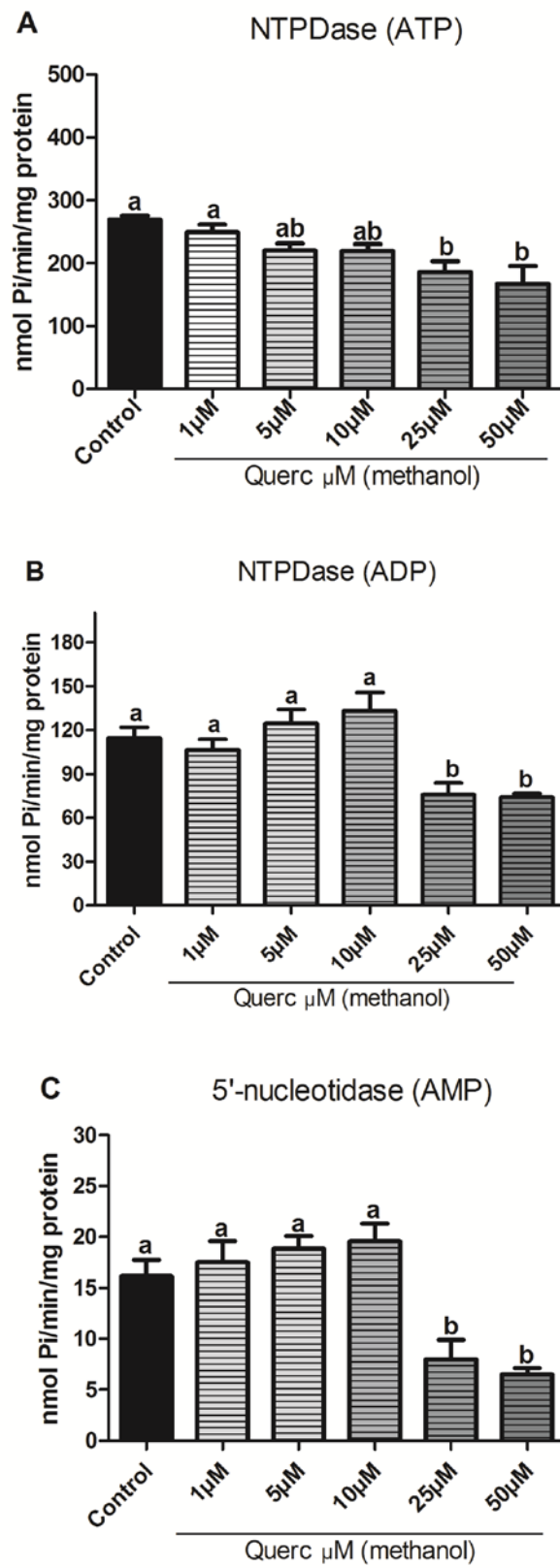


Figure 3

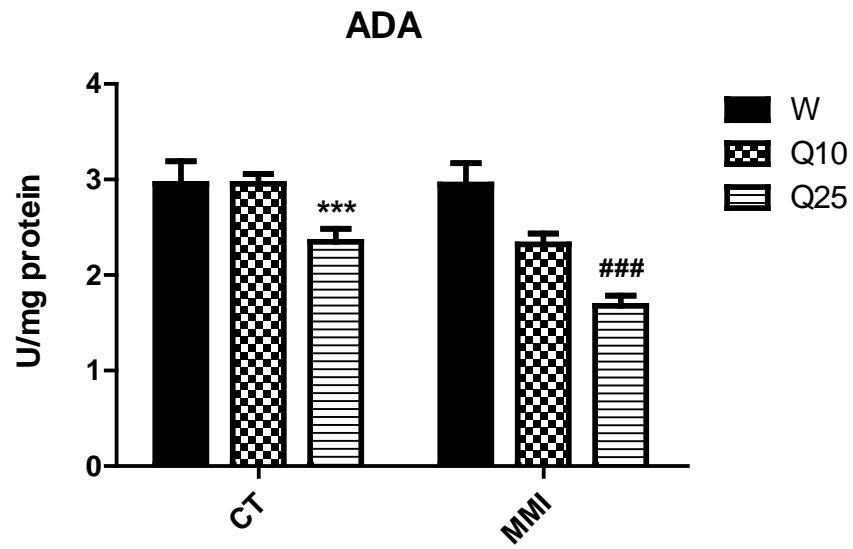


Figure 4

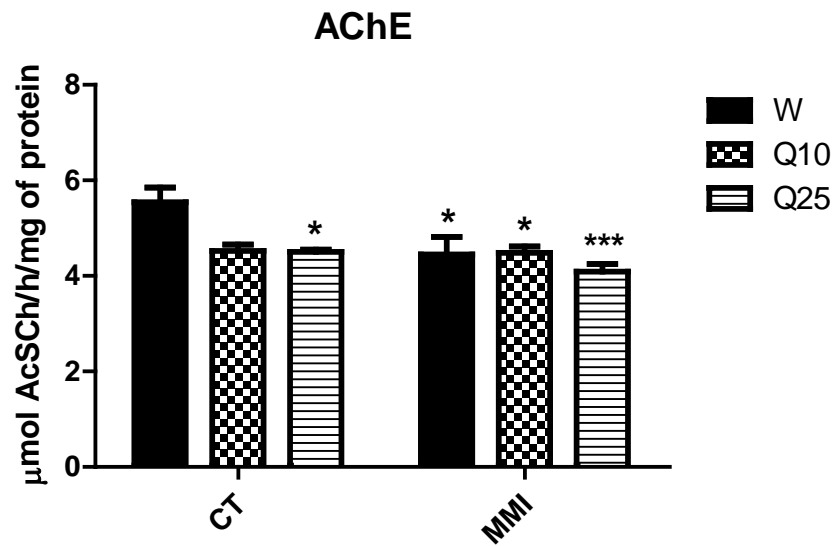


Figure 5

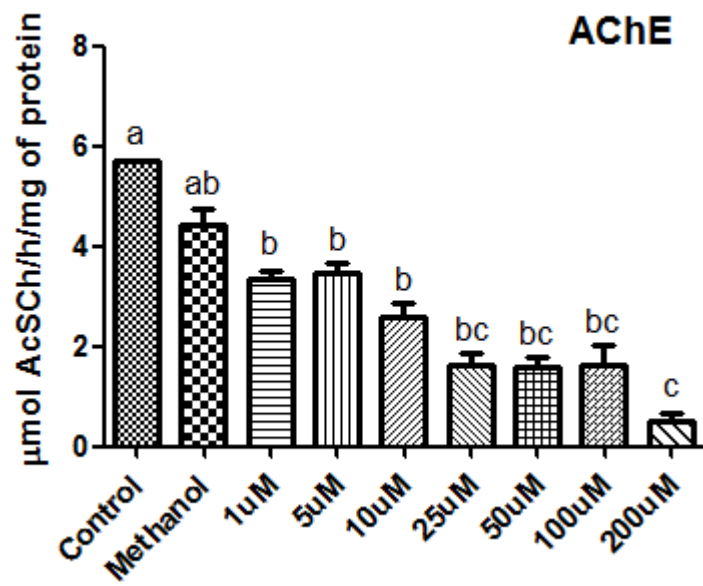


Figure 6

7. References

- Abdalla FH et al. (2013) Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. *Molecular and cellular biochemistry* 381:1-8
- Abdalla FH et al. (2014) Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: Possible involvement of the acetylcholinesterase and Na(+),K(+)-ATPase activities. *Physiology & behavior* 135:152-167
- Anwar J et al. (2012) Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*
- Bernal J, Guadano-Ferraz A, Morte B (2003) Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid* 13:1005-1012
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254
- Braganhol E, Tamajusuku AS, Bernardi A, Wink MR, Battastini AM (2007) Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochimica et biophysica acta* 1770:1352-1359
- Bruno AN, Carneiro-Ramos MS, Buffon A, Pochmann D, Ricachenevsky FK, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ (2011) Thyroid hormones alter the adenine nucleotide hydrolysis in adult rat blood serum. *Biofactors* 37:40-45
- Bruno AN, Ricachenevsky FK, Pochmann D, Bonan CD, Battastini AM, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ (2005) Hypothyroidism changes adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats in different phases of development. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23:37-44
- Burnstock G (2004) Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 4:47-52
- Carageorgiou H, Pantos C, Zarros A, Stolakis V, Mourouzis I, Cokkinos D, Tsakiris S (2007) Effects of hyper- and hypothyroidism on acetylcholinesterase, (Na(+), K (+))- and Mg (2+)-ATPase activities of adult rat hypothalamus and cerebellum. *Metab Brain Dis* 22:31-38
- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Analytical biochemistry* 157:375-380
- Dajas F (2012) Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J Ethnopharmacol* 143:383-396

- Devdhar M, Ousman YH, Burman KD (2007) Hypothyroidism Endocrinology and metabolism clinics of North America 36:595-615
- Dias GR et al. (2012) Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience 30:83-89
- Dong YS et al. (2014) Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress and Brain Edema in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. Int J Med Sci 11:282-290
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7:88-95
- Engstrom G, Svensson TH, Waldeck B (1974) Thyroxine and brain catecholamines: increased transmitter synthesis and increased receptor sensitivity. Brain Res 77:471-483
- Fideu MD, Arce A, Esquifino AI, Miras-Portugal MT (1994) Thyroid hormones modulate both adenosine transport and adenosine A1 receptors in rat brain. Am J Physiol 267:C1651-1656
- Giusti GG, B. (1984) Colorimetric method:315–323
- Goncalves JF et al. (2010) N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. Chemico-biological interactions 186:53-60
- Gould E, Butcher LL (1989) Developing cholinergic basal forebrain neurons are sensitive to thyroid hormone. J Neurosci 9:3347-3358
- Khan MT et al. (2009) Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. Chem Biol Interact 181:383-389
- Kiehn O (2006) Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. Annu Rev Neurosci 29:279-306
- Kwon SH et al. (2010) Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. Eur J Pharmacol 649:210-217
- Lendvai B, Vizi ES (2008) Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. Physiol Rev 88:333-349
- Mazzanti CM et al. (2009) Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. Int J Dev Neurosci 27:73-80
- Mendez-Armenta M, Rios C (2007) Cadmium neurotoxicity. Environmental toxicology and

pharmacology 23:350-358

Molinengo L, Cassone MC, Oggero L (1986) Action of hypo- and hyperthyroidism on the postmortal decay of acetylcholine in the rat spinal cord. *Neuroendocrinology* 42:28-31

Murota K, Terao J (2003) Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics* 417:12-17

Mushtaq N et al. (2014) Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell biochemistry and function* 32:287-293

Nagy A, Delgado-Escueta AV (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J Neurochem* 43:1114-1123

Polachini CR et al. (2014) Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience*

Punithavathi VR, Prince PS (2010) Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats, *Life sciences* 86:178-184

Rocha JB, Emanuelli T, Pereira ME (1993) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 53:431-437

Santi A et al. (2014) Effects of quercetin on oxidative stress biomarkers in methimazole - induced hypothyroid rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 122:533-539

Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31:77-98

Schmatz R et al. (2013) Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Biophys* 65:129-143

Schmatz R et al. (2009a) Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain research bulletin* 80:371-376

Schmatz R et al. (2009b) Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life sciences* 84:345-350

Seiva FR, Chuffa LG, Braga CP, Amorim JP, Fernandes AA (2012) Quercetin ameliorates

glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem Toxicol* 50:3556-3561

Smith JW, Evans AT, Costall B, Smythe JW (2002) Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev* 26:45-60

Spanevello R et al. (2009) Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. *Brain Res Bull* 80:45-51

Spanevello RM et al. (2010) The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 411:210-214

Stoica G, Lungu G, Xie X, Abbott LC, Stoica HM, Jaques JT (2007) Inherited tertiary hypothyroidism in Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 1148:205-216

Virgili M, Saverino O, Vaccari M, Barnabei O, Contestabile A (1991) Temporal, regional and cellular selectivity of neonatal alteration of the thyroid state on neurochemical maturation in the rat. *Exp Brain Res* 83:555-561

Wang N, Cai Y, Wang F, Zeng X, Jia X, Tao F, Zhu D (2014) Effects of thyroxin and donepezil on hippocampal acetylcholine content and syntaxin-1 and munc-18 expression in adult rats with hypothyroidism. *Experimental and therapeutic medicine* 7:529-536

Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta* 1783:673-694

Zanini D et al. (2012) Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomedicine & pharmacotherapy* 66:40-45

Zimmermann H (2008) ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochem Int* 52:634-648

4.2. CAPÍTULO II

MANUSCRITO 1

Hypothyroidism and hyperthyroidism change the ectoenzymes activities in platelets of rats

A regulação das funções vasculares depende de vários fatores e sistemas, dentre eles a atuação do sistema purinérgico possui extrema relevância. Este trabalho teve como objetivo avaliar a interferência dos hormônios tireoidianos nesse sistema e os possíveis efeitos deletérios causados por estas alterações. Para a indução do hipotireoidismo e do hipertireoidismo nos animais, foram administrados Metimazol e L-Tiroxina, respectivamente.

Foram avaliadas as atividades das enzimas purinérgicas em plaquetas e a atividade das enzimas NTPDases diminuiu nos animais com hipertireoidismo, enquanto a atividade da 5'-nucleotidase diminuiu em ambos, hipotireoidismo e hipertireoidismo. Já a atividade da ADA aumentou no hipertireoidismo e a atividade da NPP aumentou em ambos os grupos. Além disso para avaliar se as alterações nas enzimas interferem nos níveis dos nucleotídeos e nucleosídeos em soro, as concentrações desses foram analisadas e mostraram-se modificadas em ambas as desordens tireoidianas.

As mudanças nas atividades enzimáticas foram ainda correlacionadas com a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio. Assim, é possível sugerir com esses resultados que as mudanças no sistema purinérgico causadas por ambos, hipotireoidismo e hipertireoidismo, poderiam estar contribuindo para os efeitos indesejáveis observados, e que se não forem monitorados podem levar a maiores danos cardiovasculares, devido à estreita ligação desse sistema com as plaquetas e a agregação plaquetária.

Espera-se com esse trabalho contribuir para um maior esclarecimento dos sistemas envolvidos nos distúrbios tireoidianos, principalmente o papel do sistema purinérgico, a fim de se iniciarem mais estudos com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos nas doenças tireoidianas e assim prevenir efeitos secundários maiores.

Hypothyroidism and hyperthyroidism change ectoenzyme activities in rat platelets

Jucimara Baldissarelli^{1*}, Roberta Schmatz², Caroline C. Martins¹, Daniela Zanini¹, Karine P. Reichert¹, Pauline da Costa¹, Gustavo R. Tomé¹, Taís Vida Palma¹, Vera M. Morsch¹, Maria R. C. Schetinger^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves, RS, Brasil.

*Corresponding author. Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. Tel.: +55-55-32209557

E-mail addresses: jucimarabaldissarelli@gmail.com (J. Baldissarelli)

mariachitolina@gmail.com (M. R. C. Schetinger)

LIST OF ABBREVIATIONS

ADA - adenosine deaminase

ADP - adenosine diphosphate

AMP - adenosine monophosphate

ANOVA - analysis of variance

ATP - adenosine triphosphate

HTs - thyroid hormones

NPP- nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase

NTPDase - nucleoside triphosphate diphosphohydrolase

PRP - platelet-rich plasma

ROS – reactive oxygen species

TSH - thyroid-stimulating hormone

T3 – triiodothyronine

T4 - thyroxine

Abstract

Purinergic system has an important role in regulation of vascular functions. The interference of thyroid hormones in this system and in cardiovascular events has been studied in recent years. However, there are still some questions and the mechanisms involved in vascular, purinergic and oxidative changes in thyroid disorders are not completely understood. Therefore, the present study aimed to assess purinergic enzyme activities in platelets from rats with hypothyroidism and hyperthyroidism and the involvement of reactive species in this context. Hypothyroidism and hyperthyroidism condition were induced by continuous exposure to methimazole (MMI) at 20 mg/100 mL or L-Thyroxine at 1.2 mg/100 mL, respectively, in the drinking water for one month. Results showed that rats exposed to L-Thyroxine had a significant decrease in NTPDase activities, wherein ATP hydrolysis was 53% lower and ADP hydrolysis was 40% lower, when compared to control. Moreover, ecto-5'-nucleotidase activity was decreased in both groups, 39% in the hypothyroidism and 52% in the hyperthyroidism. On the other hand, the adenosine deaminase (ADA) activity was increased in hyperthyroidism (75%) and nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP) activity was increased in animals with hypothyroidism (127%) and hyperthyroidism (128%). Our findings suggest that changes in purinergic enzymes and purine levels could be contributing to undesirable effects of the thyroid disturbances. Moreover, the oxidative stress, and particularly the high ROS production, showed a causal relation with changes in ectonucleotidases activities and nucleotides and nucleoside levels.

Keywords: Thyroid hormones, platelets, ectonucleotidases, nucleotides, reactive oxygen species

1. Introduction

Thyroid hormones (T4 and T3) are extensively related to homeostasis of cardiovascular system. They are associated to several vascular diseases that involve processes such as platelet aggregation and vascular tone control. Hyperthyroidism or hypothyroidism are developed due to changes in these hormone levels (1). Hyperthyroidism causes a hyperdynamic cardiovascular status including a higher metabolic rate of heart and decrease in peripheral vascular resistance (2). On the other hand, hypothyroidism can lead to development of cardiovascular disorders associated with increased risk of atherosclerosis and ischemic heart disease (3, 4).

Hypothyroidism and hyperthyroidism have been studied in humans and animal models. In animals, hypothyroidism can be induced by ingestion of Methimazole (MMI), an antithyroid drug used for patients for decrease the hormone production (22). Oppositely, hyperthyroidism can be induced by administration of Thyroxin (T4). Thus, in this study the hypothyroidism and hyperthyroidism were induced by addition to the drinking water of MMI or L-Thyroxin, respectively.

Although studies suggest an association of hypothyroidism with atherogenesis (4) other clinical studies already carried out have shown an association between hyperthyroidism and an increased risk of thrombotic events, whereas in hypothyroidism a bleeding tendency is observed (5). These controversies indicate that the relationship between thyroid hormones and cardiovascular events is elusive and that more studies are needed to establish the role of thyroid hormone in atherosclerotic cardiovascular disease.

In the vascular system, the purinergic signaling has the capacity of influence cardiac function, participate in vasomotor responses, control platelet function and inflammatory processes (6). This important system is compound for adenine nucleotides and nucleosides, receptors and purinergic enzymes (7). Extracellular adenine nucleotides and nucleosides

represent an important class of extracellular molecules, they are present in several tissues and cells, such as erythrocytes and platelets and exhibit a multiplicity of functions, including development, blood flow, secretion, inflammation and regulation of thrombus formation (8).

It is known that platelets are cells which play an important role in hemostatic process (9, 10) and their activation results in release of contents stored in alpha granules and dense granules present in cytoplasm (11). The dense granules hold and liberate ATP and ADP. Upon release to extracellular medium, they can contribute to the change of platelet aggregation (12). Similarly, adenosine is involved in this process as a potent inhibitor of the aggregation, besides providing anti-inflammatory properties (9).

The ectoenzymes NTPDases (nucleoside triphosphate phosphohydrolases), ecto-5'-nucleotidase, NPPs (nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase) and ADA (adenosine deaminase) are a complex of enzymes expressed on platelets surface, which constitutes a multiple system for extracellular nucleotide degradation (13). NTPDases hydrolyze ATP to ADP and ADP to AMP (14), while NPPs hydrolyze ATP directly to AMP, which is subsequently hydrolyzed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase (15). In addition, ADA is responsible for the irreversible deamination of adenosine to inosine (16). Together, these enzymes constitute a highly refined system for the regulation of nucleotide mediated signaling, controlling the rate, degradation and nucleoside formation and thus, possessing a very important role in maintaining normal homeostasis and preventing excessive platelet aggregation (7, 8). In this context, due to this important physiological role, ectonucleotidases have been studied in different pathological and experimental conditions (17-21).

Considering the several physiological changes in vascular system caused by hypo and hyperthyroidism and since these processes can be also affected by ATP, ADP and adenosine levels, this study aimed to investigate the hydrolysis of these nucleotides and nucleoside in platelets and their levels in serum from rats with hyperthyroidism and hypothyroidism.

Moreover, oxidative parameters and their relation with purinergic signaling also was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine, p-Nph-5'-TMP, as well as trizma base, sodium azide, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES); malachite green, trichloroacetic acid (TCA), dichlorofluorescein diacetate, Coomassie brilliant blue G, beyond methimazole (MMI) and L-Thyroxine were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA); Bovine serum albumin from Reagen (Colombo, PR, Brazil). Further chemicals used in this experiment were of the highest purity.

2.2. Animals

Adult male Wistar rats (50–70 days; 200–300 g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water or methimazole solution or thyroxin solution. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 083/2012).

2.3. Experimental induction of hypothyroidism and hyperthyroidism in rats

To induction of hypothyroidism the antithyroid drug MTZ was administered to Wistar rats *ad libitum* in the drinking water at a concentration of 20 mg/100 mL during 30 days of treatment (23). On the other hand, to induce hyperthyroidism, L-Thyroxine was administered *ad libitum* in the drinking water at a concentration of 1.2 mg/100 mL during the same

treatment time while the control group received only pure water. After 1 month of treatment the animals were anesthetized and the whole blood collected by cardiac puncture. The induction of hypothyroidism by MTZ and hyperthyroidism by L-Thyroxine was confirmed by enzyme immunoassay (AxSYM ®). tT3 was expressed as ng/mL plasma, tT4 as µg/mL plasma and TSH as µUI/mL plasma. Values were expressed as means ± SEM ($P < 0.05$, $n=5$) (24-26).

2.4. Platelet preparation

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al. (2004) (27) with some modifications. Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120M sodium citrate as anticoagulant. The total blood–citrate system was centrifuged at $160\times g$ during 15 min. After this, PRP was centrifuged at $1400\times g$ for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer (pH 7.0), containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

2.5. NTPDase and 5'-nucleotidase assays

The NTPDase enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 5 mM CaCl_2 , 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 Lunkes et al. Twenty microliters of enzyme preparation (8–12 µg of protein) was added to the reaction mixture and 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 2.0 mM. The incubation was carried out in ELISA plates for 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 150 µL of 15% TCA. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (28) using malachite green as colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. However, some modifications were performed: after to stop the reaction, 30 µL of preparation

were transferred to a new plate and malachite green was added. Controls were carried out to correct non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding enzyme preparation after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.6. Adenosine deaminase and ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase activities

ADA from platelets was determined according to Guisti & Galanti, (29), based on Bertholet reaction. Briefly, 50 μ L of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine pH 6.5 and was incubated at 37°C for 60 min. The protein content used for platelet experiment was adjusted between 0.6 and 0.8 mg/mL. Results were expressed in U/L. One unit (1U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine at standard assay conditions.

NPP activity was assessed using p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (p-Nph-5'-TMP) as substrate as described by Fürstenau et al. (13). Approximately 20 mg of platelet was preincubed with incubation medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, 120 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 6 mM glucose, 5.0 mM CaCl₂ (pH 8.9), for 10 min at 37 °C in a final volume of 200 μ L. The reaction started with the addition of p-Nph- 5'-TMP to a final concentration of 0.5 mM and the time of incubation was 80 min. To stop the reaction 200 μ L NaOH 0.2 N was added to the medium. The amount of p-nitrophenol released from the enzyme activity was measured at 400 nm using a molar extinction coefficient of 18.8×10^{-3} M/cm. Enzyme activity was expressed as nmol of p-nitrophenol released/min/mg of protein.

2.7. Analysis of purine levels in serum by high-pressure liquid chromatography (HPLC)

The denaturation of sample proteins was performed using 0.6 mol/L perchloric acid. All samples were then centrifuged (14,000g for 10 min) and the supernatants were neutralized with 4.0 N KOH and clarified with a second centrifugation. Aliquots of 50 μ L were applied to a reverse-phase HPLC system using a 25-cm C18 Shimadzu column at 260 nm with a mobile phase containing 60 mM KH_2PO_4 , 5.0 mM tetrabutylammonium chloride (pH 6.0), in 30% methanol according to a method previously described by Voelter et al. (30). The peaks of purines were identified by their retention times and quantified by comparison with standards. Results are expressed as nmol/mL of serum.

2.8. Intracellular reactive species (RS) production

For measure the reactive species production by cellular components, the dichlorofluorescein fluorescence assay was used. A 50 μ L aliquot of serum was added to a medium containing Tris-HCl buffer (0.01 mM, pH 7.4) and dichlorofluorescein diacetate (7 mM). After this, the medium was incubated in the dark for 1 h until the fluorescence measurement. The oxidized dichlorofluorescein was determined using a standard curve of oxidized dichlorofluorescein and the results were expressed as nM DCFOxide/mL (31).

2.9. Protein determination

Comassie Blue method was used to measured protein content, using bovine serum albumin as the standard in according to Bradford (32). This assay is based on the binding of the dye Comassie Blue G-250 to protein, and this binding is accompanied by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way ANOVA, followed by Bonferroni test. All data were expressed as mean \pm SEM. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Plasma tT3 and tT4 levels and body weight

To confirm the experimental model effectiveness, plasma hormone tT3, tT4 and TSH levels were measured in the animals at the end of the experiment. As expected, tT3 and tT4 levels were significantly lower (38% and 17% respectively, $P < 0.05$) and TSH was significantly higher (70%, $P < 0.01$) in MTZ group than in control group. On the other hand in L-Thyroxin group the hormone levels were analyzed and tT3 and tT4 levels after 1 month of treatment increased (170% and 370% respectively, $P < 0.001$) and the TSH levels decreased (70%, $P < 0.05$) (Table 1).

Additionally, both groups showed a decrease in the body weight when compared with control group (Table 1).

3.2. NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities

The results of the present study demonstrate that the cascade of ecto-enzymes was altered in thyroid disorders. Fig. 1A shows the results obtained for the NTPDase activity. Post hoc tests revealed that NTPDase activity with ATP or ADP as substrate was significantly decreased in animals with hyperthyroidism (53%, $P < 0.05$ and 40%, $P < 0.01$, respectively) when compared to control group. On the other hand, in the animals with hypothyroidism, no showed difference in the NTPDase activity.

Statistical analysis also revealed significant alterations for the 5'-nucleotidase activity (Fig. 1C). Thus, the AMP hydrolysis was decreased in animals with hypothyroidism (39%, $P<0.01$) and with hyperthyroidism (52%, $P<0.001$) when compared to control group.

3.3. ADA and NPP activities

Since these enzymes also acts in the regulation of nucleotides and adenosine we carried out the enzymatic activity. Fig. 2A shows the results obtained for ADA activity. Post hoc tests revealed that there was no difference between the group of animals with hypothyroidism and the control group. However, there was a significant increase (75%, $P<0,001$) in ADA activity in the group of animals with hyperthyroidism when compared to the control group.

Furthermore, E-NPP activity was significantly increased in the group of animals with hypothyroidism (127%, $P<0,001$) and with hyperthyroidism (128%, $P<0,001$) when compared to the control group (Fig.2B).

3.4. Analysis of purine levels in serum by HPLC

In order to confirm the influence of enzymes in nucleotides and nucleoside levels, the HPLC assay for quantification of ATP, ADP, AMP, adenosine, Ino, Hyp, Xan and uric acid was performed in serum from animals of the control, hypothyroidism and hyperthyroidism groups. The Table 2 shows that ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, xanthine and uric acid levels evaluated by HPLC increased in hyperthyroidism group, while in the hypothyroidism group only AMP and inosine levels presented an increase in serum when compared to control group ($P<0.05$).

3.5. Intracellular reactive species (RS) production

Since adenosine modulates levels of reactive species (33, 34), which participate in the activation of platelets and subsequent thrombus formation, it was assessed whether serum from rats showed changes in RS production as determined by dichlorofluorescein fluorescence assay. The concentration of RS was increased in animals with hyperthyroidism and no change was observed in the group with hypothyroidism when compared with the control group (Figure 3).

3.6. Pearson's correlation

Due to the high concentration of RS in rats with hyperthyroidism and the increase in the activity of adenosine deaminase, and decrease in adenosine levels in the same animals, we consider it essential to investigate the correlation between the production of reactive species and these parameters. Results showed a negative correlation between the concentration of adenosine and adenosine deaminase activity (Figure 4A). Moreover, we observed the same negative correlation between the concentration of adenosine and the RS levels (Figure 4B). Interestingly, RS levels and the activity of adenosine deaminase showed a positive correlation (Figure 4C), which reinforces the connection between RS production and cell injury.

3. Discussion

Thyroid disorders can cause damage to the body because of the lack or excess of thyroid hormones. Several studies related subclinical and clinical hypothyroidism with thrombotic events and indicate that hypothyroidism can be considered a risk factor for cardiovascular diseases because of its association with high levels of total cholesterol and LDL (4, 33, 34). These events increase the risk of atherosclerosis development, platelet aggregation, oxidative stress and leukocyte accumulation in the artery walls (19). On the other

hand some studies have linked hypothyroidism with a tendency to bleeding and suggested that hyperthyroidism is associated with an increase in thrombotic event (35). Due to these controversies, the real role of thyroid hormones is not entirely clear in this condition.

Both bleeding or prothrombotic events are very dependent of the platelets action, which are a major source of purine signaling molecules, such as ATP and ADP, into the blood (36). Therefore, it is relevant evaluating some parameters of the purinergic system and oxidative stress, which may be involved in platelet aggregation processes and thromborregulation in rats with hypothyroidism and hyperthyroidism. We have shown the effects of these disturbances on the NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, adenosine deaminase and nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase activities in platelets and purine levels in serum, as well as on the RS generation in serum of rats.

Opposed to some studies that demonstrate the 5'-NT activity increased in hyperthyroidism (37), we found the ectonucleotidases activities decreased in this group of animals. However, many factors such as the different stages of the disease or different experimental models may be involved in these different responses from the body. The decrease in the NTPDase and 5'-nucleotidase activities observed in animals with L-Thyroxine induced - hyperthyroidism may suggest an increase in the nucleotide levels, due to their low hydrolysis. Therefore, to assessed this, we conducted the HPLC analysis for nucleotides, which confirmed that ATP, ADP and AMP levels were increased in the hyperthyroidism.

On the other hand, the animals with hypothyroidism showed no difference in NTPDase activity, but the 5'-nucleotidase was decrease. Interestingly, in this group, the levels of nucleotides ATP and ADP remained unchanged, whereas the AMP increased. Since the NTPDase activity present no change in this group of animals, the highest amount of AMP can be explained due to the low activity of 5'-NT and the high activity of NPP. The activity of

this enzyme was improved in both groups, hypothyroidism and hyperthyroidism, indicating an increase in the ATP hydrolysis and more AMP being formed.

Some studies have demonstrated that the activity of this enzyme is modified in several diseases (17, 38) and suggest that an increase may be observed as an attempts of the body to compensate the damages and produce more AMP, which would be a molecule with protective function, besides be available for hydrolysis into adenosine (39, 40). Moreover, their altered activity can be an indicator of disease stage or severity (40).

In addition, adenosine levels were lower in the group of animals with hyperthyroidism. Besides it being formed in smaller amounts by reduced activity of ecto-5'nucleotidase, this nucleoside concentration is regulated by the action of the enzyme ADA. Therefore, a higher ADA activity can explain the low adenosine and high inosine concentrations found in rats with hyperthyroidism. ADA activity has been shown to increase in several diseases (17, 41) and this increase can be very adverse since that more adenosine is deaminated and the body beginning more susceptible to the injury, due to the lack of this nucleoside.

Furthermore, studies have reported the correlation between changed ADA activity and oxidative stress (42) and here, interestingly, we observed a negative correlation between ADA activity and adenosine levels (Figure 4A) and a positive correlation between ADA and RS production (Figure 4B) and between RS and Ado levels (Figure 4C). These findings indicate that there is a relation between ADA, Ado and oxidative stress conditions and, the increased ROS production could be one of the responsible for the adenosine levels decreased in the hyperthyroidism.

Concerning the levels of other nucleosides from the purinergic cascade, the inosine levels were higher in both groups and xanthine and uric acid levels showed an increase only

in animals with L-Thyroxin - induced hyperthyroidism. These results should be better analyzed to understand its importance in the pathophysiology of thyroid disorders.

Noteworthy it was shown that the cellular damage caused due to an increased production of reactive oxygen species may lead to an increased nucleotides release (43). In fact, studies have suggested that the level of RS increases during physiologic platelet activation because these cells are capable of generating RS. Furthermore, generation of RS by platelets can be an important mechanism that contribute to atherogenesis. Based in these studies we may suggest that the oxidative deterioration of platelet membrane caused by RS found in our study can contribute to the alterations in activity of the enzymes NTPDase, 5-NT and NPP, since that this ectoenzymes are present in platelet membrane and can suffer modifications in their conformational states and consequently changes in their activities.

Furthermore, this cell damage could cause an increased nucleotides release and thus, it can be suggested that in addition to the low degradation by enzymes, nucleotide levels are increased in rats with hyperthyroidism due to increased release from platelets. Moreover, this increase also could lead to the enhanced oxidative stress observed in this pathology.

4. Conclusion

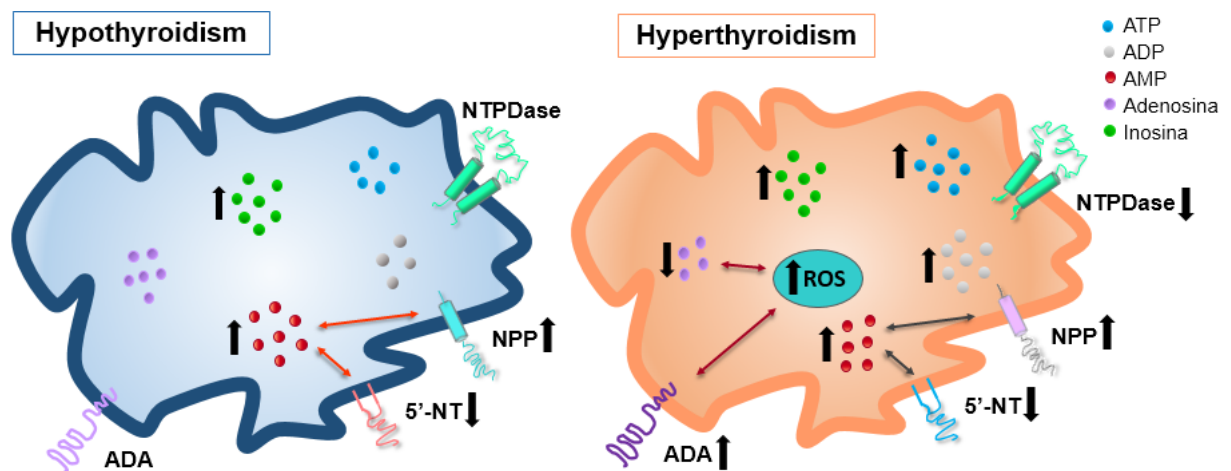
In conclusion, our results contribute to the understanding of changes that occurs in the hypothyroidism and hyperthyroidism related with the purinergic system and oxidative stress. Although additional studies are required to reach definite conclusions, our findings suggest that oxidative stress presented by hypothyroid and hyperthyroid rats, and particularly high ROS production, has a causal relationship with changes in ectonucleotidases activity and nucleotides and nucleoside levels. The changes of purinergic enzymes and purine levels could be one pathway that lead to undesirable effects in these diseases. Furthermore, the results

presented in this study suggest promising ways to help in the monitoring of patients living with these diseases for prevent some events that can harm the health of them.

5. Acknowledgements

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

6. Graphical abstract



7. Tables

Table 1. Plasma tT3 and tT4 levels and final body weight.

	Control	Hypothyroidism	Hyperthyroidism
tT3 (ng/dL)	34,10	13,00*	92,0****
tT4 (µg/dL)	2,400	0,400*	11,47*
TSH (µUI/mL)	0,011	0,017**	0,007*
Final body weight (g)	282,7±8,72	238,6±5,02**	241,2±4,51**

Values are expressed as means ± SEM. *, ** and **** show a significant difference from the Control group ($P < 0.05$ or $P < 0.001$ or $P < 0.0001$, $n=5$).

Table 2. Purine levels in serum of control, hypothyroid and hyperthyroid rats analyzed by HPLC.

	ATP	ADP	AMP	Ado	Ino	Hyp	Xan	Uric acid
Control	3,522	2,872	1,897	52,80	6,957	32,33	258,7	261,4
Hypothyroidism	3,016	2,168	3,305**	49,31	21,13**	50,58	302,2	285,2
Hyperthyroidism	6,394**	5,346*	3,455**	43,86**	22,58**	51,49	373,0*	667,0****

Results are expressed in nmol/mL of serum. * Represents statistical difference from control group (Student's t test, $P < 0.05$).

8. Figures

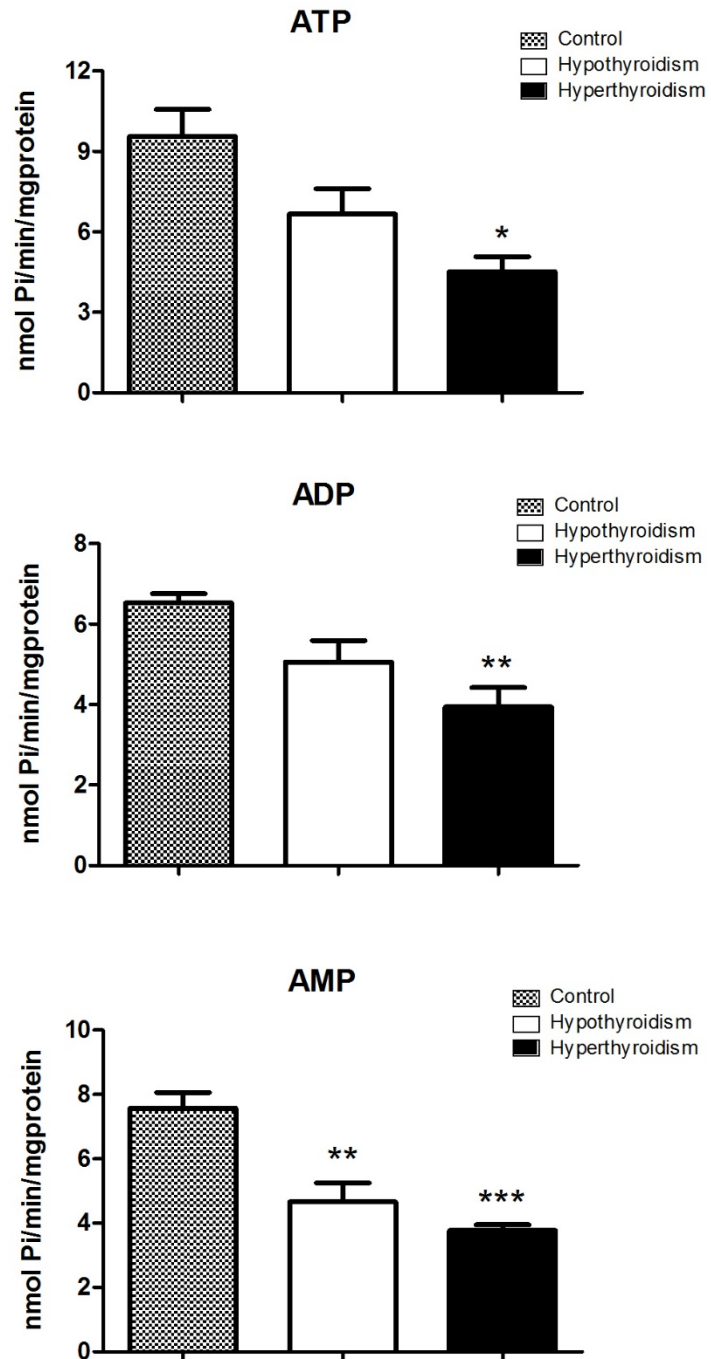


Figure 1

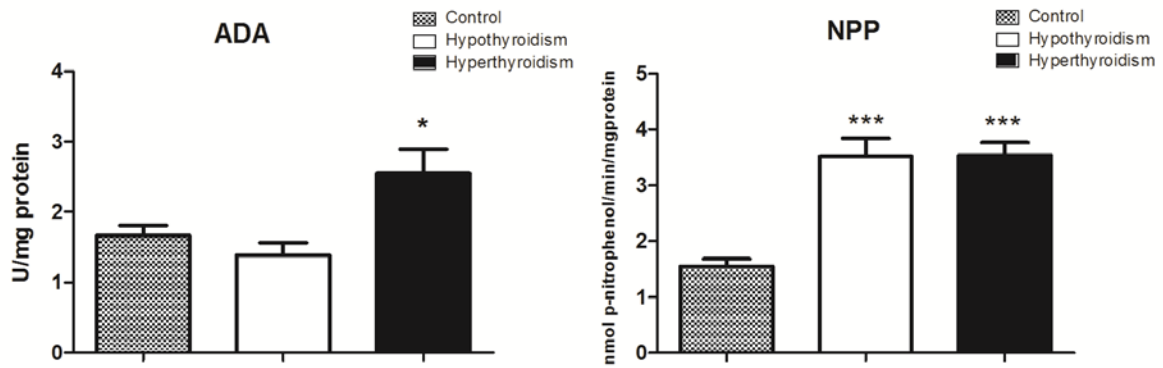


Figure 2

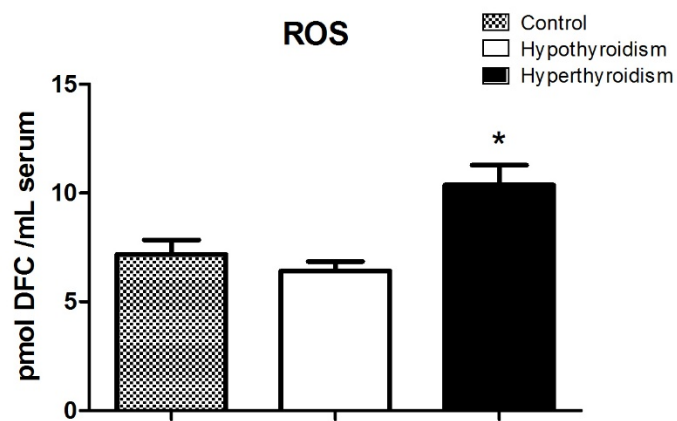


Figure 3

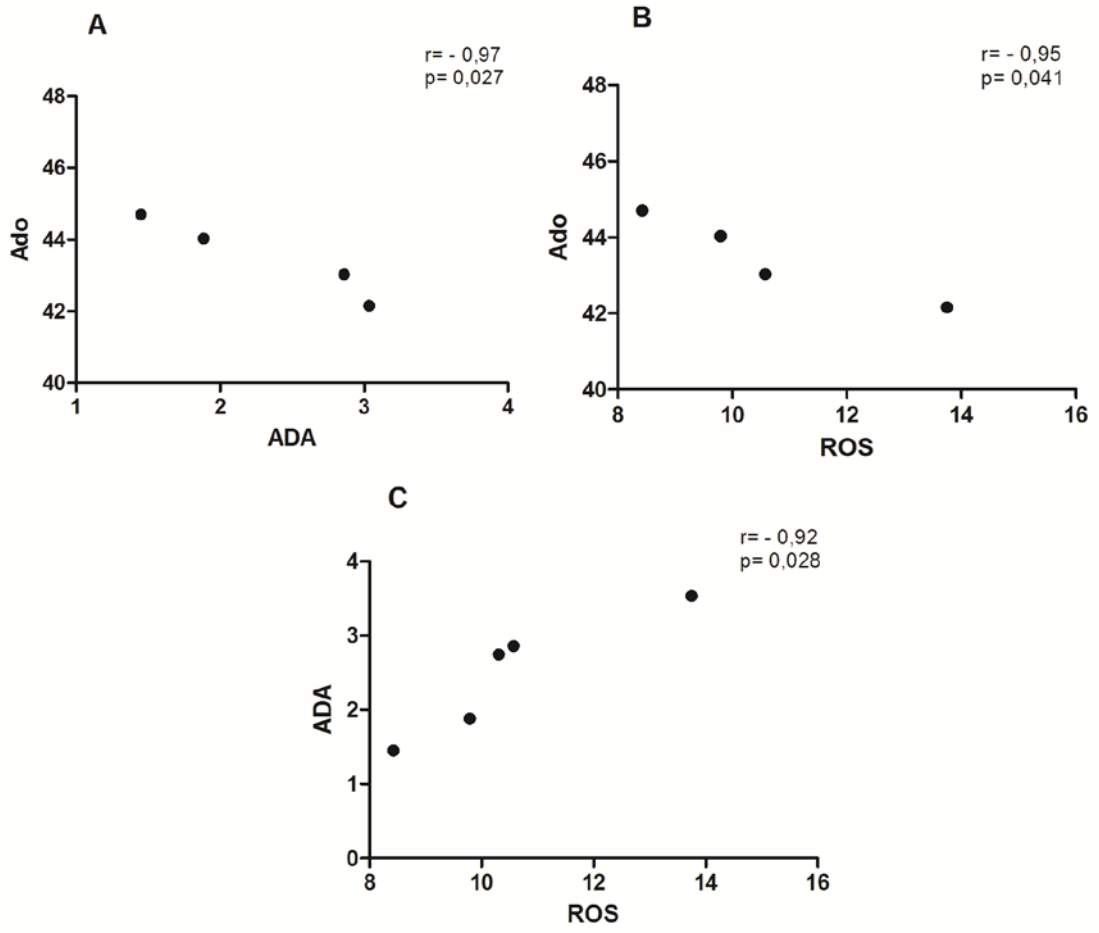


Figure 4

9. Legends

Table 2. Purine levels in serum of control, hypothyroid and hyperthyroid rats analyzed by HPLC. Results are expressed in nmol/mL of serum. Data are represented as mean values \pm SEM. *Indicates a significant difference between the control group and the group with hypothyroidism or hyperthyroidism. ($P < 0.05$; $n=5$).

Figure 1. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on NTPDase, using ATP (A) and ADP (B) as substrate and ecto-5'-nucleotidase using AMP (C) as substrate in platelets of rats. Data are presented as means \pm SEM. *** Indicates a significant difference between the control group and the group with hypothyroidism or hyperthyroidism. ($P < 0.05$; $n=5$).

Figure 2. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on ADA and NPP activities in platelets of rats. Data are presented as means \pm SEM. *** Indicates a significant difference between the control group and the group with hypothyroidism or hyperthyroidism. ($P < 0.05$; $n=10$).

Figure 3. Levels of reactive oxygen species (ROS) in serum of MMI-induced hypothyroidism and T4-induced hyperthyroidism. Data are expressed as means \pm SEM. * Indicates a significant difference between the control group and the group with hypothyroidism or hyperthyroidism. ($P < 0.05$, $n= 5$).

Figure 4. Pearson's correlation analysis between Ado concentration and ADA activity (A) ($P < 0.05$) or between Ado concentration and ROS levels (B) ($P < 0.05$), or between ROS levels and ADA activity (C). ($P < 0.05$); ($n=4$).

10. References

1. Basset A, Blanc J, Messas E, Hagege A, Elghozi JL. Renin-angiotensin system contribution to cardiac hypertrophy in experimental hyperthyroidism: an echocardiographic study. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2001;37(2):163-72.
2. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine reviews*. 2005;26(5):704-28.
3. Cappola AR, Ladenson PW. Hypothyroidism and atherosclerosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(6):2438-44.
4. Ichiki T. Thyroid Hormone and Vascular Remodeling. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2015.
5. Squizzato A, Romualdi E, Buller HR, Gerdes VE. Clinical review: Thyroid dysfunction and effects on coagulation and fibrinolysis: a systematic review. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(7):2415-20.
6. Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacological reviews*. 2014;66(1):102-92.
7. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors*. 2007;31(2):77-98.
8. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1783(5):673-94.
9. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1(12):2497-509.
10. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*. 2003;101(7):2661-6.
11. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *The Lancet Oncology*. 2002;3(7):425-30.
12. Fuentes E, Palomo I. Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. *Vascular pharmacology*. 2015.

13. Furstenau CR, Trentin Dda S, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets*. 2006;17(2):84-91.
14. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling*. 2006;2(2):409-30.
15. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic signalling*. 2006;2(2):351-60.
16. Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in neurobiology*. 1997;52(4):283-94.
17. Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, Gutierrez JM, Maldonado PA, Thome GR, et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2012;66(1):40-5.
18. Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *Journal of neurology*. 2010;257(1):24-30.
19. Duarte MM, Loro VL, Rocha JB, Leal DB, Bem AF, Dorneles A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *The FEBS journal*. 2007;274(11):2707-14.
20. Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D, Schmatz R, et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012;371(1-2):147-56.
21. Martins CC, Bagatini MD, Cardoso AM, Zanini D, Abdalla FH, Baldissarelli J, et al. Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;454:66-71.
22. Dias GR, de Almeida TM, Sudati JH, Dobrachinski F, Pavin S, Soares FA, et al. Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats. *Physiology & behavior*. 2014;124:116-22.
23. Baldissarelli J, Santi A, Schmatz R, Abdalla FH, Cardoso AM, Martins CC, et al. Hypothyroidism Enhanced Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Activities in Rat

Synaptosomes can be Prevented by the Naturally Occurring Polyphenol Quercetin. Cellular and molecular neurobiology. 2016.

24. Subudhi U, Das K, Paital B, Bhanja S, Chainy GB. Alleviation of enhanced oxidative stress and oxygen consumption of L-thyroxine induced hyperthyroid rat liver mitochondria by vitamin E and curcumin. *Chemico-biological interactions*. 2008;173(2):105-14.

25. Ladenson PW, Kieffer JD, Farwell AP, Ridgway EC. Modulation of myocardial L-triiodothyronine receptors in normal, hypothyroid, and hyperthyroid rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 1986;35(1):5-12.

26. Dias GR, Vieira FA, Dobrachinski F, Bridi JC, Balk Rde S, Soares FA, et al. Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2012;30(2):83-9.

27. Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2004;65(1):1-6.

28. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Analytical biochemistry*. 1986;157(2):375-80.

29. Giusti GG, B. Colorimetric method. Verlag Chemie: Weinheim1984. 315–23.

30. Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *Journal of chromatography*. 1980;199:345-54.

31. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992;13(3):637-48.

32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.

33. Kim JS, Diebold BA, Babior BM, Knaus UG, Bokoch GM. Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(48):34787-800.

34. Thakur S, Du J, Hourani S, Ledent C, Li JM. Inactivation of adenosine A2A receptor attenuates basal and angiotensin II-induced ROS production by Nox2 in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(51):40104-13.
35. Jung CH, Rhee EJ, Shin HS, Jo SK, Won JC, Park CY, et al. Higher serum free thyroxine levels are associated with coronary artery disease. *Endocrine journal*. 2008;55(5):819-26.
36. Lupoli R, Di Minno MN, Tortora A, Scaravilli A, Cacciapuoti M, Barba L, et al. Primary and Secondary Hemostasis in Patients With Subclinical Hypothyroidism: Effect of Levothyroxine Treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(7):2659-65.
37. Stuijver DJ, Hooper JM, Orme SM, Van Zaane B, Squizzato A, Piantanida E, et al. Fibrin clot structure and fibrinolysis in hypothyroid individuals: the effects of normalising thyroid hormone levels. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012;10(8):1708-10.
38. Diamond SL, Purvis J, Chatterjee M, Flamm MH. Systems biology of platelet-vessel wall interactions. *Frontiers in physiology*. 2013;4:229.
39. Bruno AN, Pochmann D, Ricachenevsky FK, Bonan CD, Barreto-Chaves ML, Freitas Sarkis JJ. 5'-nucleotidase activity is altered by hypo- and hyperthyroidism in platelets from adult rats. *Platelets*. 2005;16(1):25-30.
40. Calgaroto NS, da Costa P, Cardoso AM, Pereira LB, Vieira JM, Dalenogare D, et al. Vitamin D(3) prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 2015;405(1-2):11-21.
41. Bagatini MD, Martins CC, Gasparetto D, Spanevello RM, Becker LV, Rosa CS, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412(1-2):159-64.
42. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Battisti IE, Belle LP, Santos KF, et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2013;67(3):203-8.
43. Maldonado PA, Negrini LA, Ethur Jda S, Oliveira L, Correa Mde C, Becker LV, et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2010;64(7):499-504.

44. Kose K, Yazici C, Assioglu O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behcet's disease. *Clinical biochemistry*. 2001;34(2):125-9.

45. Lavieri R, Piccioli P, Carta S, Delfino L, Castellani P, Rubartelli A. TLR costimulation causes oxidative stress with unbalance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production. *Journal of immunology*. 2014;192(11):5373-81.

4.3. CAPÍTULO III

Manuscrito 2: Em revisão na revista “Platelets”

Post-thyroidectomy hypothyroidism increases expression and activity of ectonucleotidases in platelets: possible involvement of reactive oxygen species

Após trabalho realizado com animais, este estudo buscou avaliar as possíveis alterações no sistema purinérgico causadas pelo hipotireoidismo em pacientes. Devido ao fato de os pacientes pós-tireoidectomia permanecerem por um determinado período sem receber reposição hormonal, esse grupo de pacientes foi escolhido para fazer parte da pesquisa.

Observou-se que a atividade e a expressão das enzimas purinérgicas apresentaram-se alteradas, assim como os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Os pacientes apresentaram também um elevado quadro de estresse oxidativo, demonstrado pela produção aumentada de ERO, TBARS e proteína carbonil, além de diminuição da atividade da GST. Assim, o estresse oxidativo foi correlacionado com a hidrólise alterada de nucleotídeos e nucleosídeos e pode ser responsável pelo aumento da atividade da ADA, levando à desaminação rápida da adenosina. Concentrações sistêmicas desse nucleosídeo diminuída estão associadas ao desenvolvimento de complicações vasculares.

Com esses resultados espera-se contribuir para a compreensão do hipotireoidismo pós-tireoidectomia e o papel do sistema purinérgico e do estresse oxidativo nessa doença. Estudos adicionais são necessários para se chegar a conclusões definitivas, mas nossos achados suportam a hipótese de que o estresse oxidativo apresentado por pacientes tem uma relação causal com mudanças na expressão e atividade das ectonucleotidases. A sinalização purinérgica está amplamente relacionada com o controle vasomotor do organismo, sendo que alterações nesse sistema podem levar a distúrbios no sistema cardiovascular. Por isso a compreensão das alterações metabólicas que ocorrem é extremamente importante para prevenir episódios que possam agravar a saúde dos pacientes.

Post-thyroidectomy hypothyroidism increases expression and activity of ectonucleotidases in platelets: possible involvement of reactive oxygen species

Running head: Hypothyroidism changes purinergic system

Jucimara Baldissarelli^{1*}, Micheli Mainardi Pillat¹, Roberta Schmatz², Andréia M. Cardoso³, Fátima H. Abdalla¹, Juliana S. de Oliveira¹, Carla R. N. Polachini¹, Emerson Casali⁴, Clarissa Pereira Bornemann⁵, Henning Ulrich⁶, Vera M. Morsch¹, Maria R. C. Schetinger^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves, RS, Brasil.

³ Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, Chapecó, SC, Brasil.

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵ Serviço de Medicina Nuclear de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

⁶ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, Brasil.

*Corresponding author. Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. Tel.: +55-55-32209557

E-mail addresses: jucimarabaldissarelli@gmail.com (J. Baldissarelli)

mariachitolina@gmail.com (M. R. C. Schetinger)

LIST OF ABBREVIATIONS

ADA - adenosine deaminase

ADP - adenosine diphosphate

AMP - adenosine monophosphate

ANOVA - analysis of variance

ATP - adenosine triphosphate

Hyp – Hypoxanthine

Ino - Inosine

MDA - malondialdehyde

NTPDase - nucleoside triphosphate diphosphohydrolase

PRP - platelet-rich plasma

ROS – Reactive oxygen species

TBARS - thiobarbituric acid reactive substances

TSH - thyroid-stimulating hormone

T3 – triiodothyronine

T4 – thyroxine

Xan – Xanthine

Abstract

Signaling mediated by purines is a widespread mechanism of cell–cell communication related to vasomotor responses and the control of platelet function in the vascular system. However, little is known about the involvement of this signaling as well as the role of reactive oxygen species in the development of hypothyroidism. Therefore, the present study investigates changes in the purinergic system, including enzyme activities and expression in platelets, and oxidative profiles in patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. The nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase/CD39) expression in patients increased by 40%, and the adenosine triphosphate (ATP) or adenosine diphosphate (ADP) hydrolyzing activity increased by 82% and 70%, respectively. The activities of ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) also significantly enhanced (39% and 52% respectively), which correlates with a 45% decrease in adenosine concentration. Furthermore, these patients demonstrated an increased production of reactive oxygen species (42%), thiobarbituric acid reactive substances (115%), carbonyl protein (30%) and a decreased Glutathione S-transferase activity (20%). This study demonstrates that hypothyroidism interferes with adenine nucleoside and nucleotide hydrolysis and this is correlated with oxidative stress, which might be responsible for the increase in ADA activity. This increase causes rapid adenosine deamination, which can generate a decrease in their concentration in the systemic circulation, which can be associated with the development of vascular complications.

Keywords: hypothyroidism, platelets, ectonucleotidases, adenosine deaminase, oxidative stress.

1. Introduction

Thyroid cancer is the most common malignant neoplasia of the endocrine system and occurs in all age groups. According to the World Health Organization, thyroid primary carcinomas are the most common form, accounting for about 98% of malignancies. The most common treatment for thyroid cancer is thyroid removal via surgery, which leads to the cessation of thyroid hormone production and consequently, to a state of hypothyroidism¹.

Hypothyroidism leads to several symptoms, including peripheral hypertension, increase in systemic vascular resistance, decrease in tissue perfusion and weight gain^{2 3}. Additionally, hypercholesterolemia and an increase in low-density lipoprotein (LDL) in hypothyroid patients have been reported⁴. This possibly leads to a thrombotic condition, which can modify the functional properties of various cell types, including endothelial cells and platelets, thus causing an increase in the risk of developing atherothrombosis^{5,6}. It is interesting to point out that there are controversial findings related to the relationship between hypothyroidism or hyperthyroidism and the development of prothrombotic state^{7,8}, however, the role of platelets in both bleeding or thrombus formation is crucial.

Platelets play important roles in the hemostatic process, and their activation results in the release of the contents stored in the alpha granules and dense granules present in cytoplasm. The dense granules contain calcium ions, serotonin, and ATP and ADP required for platelet aggregation⁹. Intercellular signaling mediated by purine nucleotides, such as ATP, ADP, AMP and adenosine nucleoside, is a generalized route of cell–cell communication. Currently, this signaling constitutes an important subject of study, due to its role in modulating several biological processes, including inflammation and thrombus formation¹⁰.

Besides releasing adenine nucleotides, platelets express a multienzymatic complex on their surface, which acts on extracellular nucleotides and nucleoside hydrolysis. This complex

includes the ectoenzymes NTPDase 1 (nucleoside triphosphate phosphohydrolase), ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA). NTPDases hydrolyze ATP to ADP and ADP to AMP¹¹, which is subsequently hydrolyzed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase¹². After interacting with specific receptors, adenosine is irreversibly deaminated by ADA, resulting in inosine formation¹³. The association of these enzymes constitutes a highly organized cascade, which plays an extremely important role in maintaining normal homeostasis and preventing excessive platelet aggregation by regulating the concentration of extracellular adenine nucleotides and nucleosides^{10,13}.

Furthermore, thyroid hormones are involved in the regulation of the basal metabolic state and in oxidative metabolism¹⁴. Mitochondrial respiratory chain components can be affected and trigger an increase in generation of reactive oxygen species (ROS). However, although it has been shown that ROS levels are altered in hypothyroidism, few studies have analyzed this parameter and its implications in serum of patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. The increase in ROS production can lead to oxidative damage in cellular macromolecules such as proteins and lipids. Nevertheless, controversy still exists concerning the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl involved in oxidative stress in hypothyroidism^{15,16}. Moreover, ascorbic acid, total (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) and glutathione S-transferase (GST), which are antioxidant defenses, need to be investigated in more detail in patients with post-thyroidectomy hypothyroidism.

In recent years, several studies developed by our research group have shown the importance of the ectoenzymes NTPDase, ecto-5'-nucleotidase and ADA in the thromboregulation process under several pathological conditions, including hypothyroidism¹⁷, cancer¹⁸, multiple sclerosis¹⁹, hypercholesterolemia⁶ and diabetes²⁰. These studies have demonstrated the involvement of the purinergic system in the pathophysiology of several

disorders, including endocrine diseases, which reinforces the importance of evaluation of this system in hypothyroidism patients.

Moreover, the removal of the thyroid in most patients triggers several physiological changes and the treatment can be inadequate to prevent the occurrence of other disorders due to the post thyroidectomy hypothyroidism. Considering the importance of purinergic signaling in modulating platelet functions that are supposedly altered in this pathology and the possible involvement of oxidative stress in this condition, this study is pioneering in investigating the expression and activity of enzymes of the purinergic system, as well as linking this system with oxidative stress parameters in post-thyroidectomy hypothyroidism patients.

2. Experimental procedures

2.1 Study population

The study sample consisted of 45 patients with post-thyroidectomy hypothyroidism and 45 healthy subjects as a control group. Blood was collected from patients about 45 days after surgery. The number of patients was decided after information gathering about how many patients are being treated annually at the Nuclear Medicine Service of Santa Maria, which serves patients from various cities of the central region of the Rio Grande do Sul. The sample of 45 was chosen because it was sufficient to guarantee statistically correct results.

The diagnosis of hypothyroidism was confirmed and the hormonal dosage and reference values used were TSH $> 4.8 \mu\text{IU/mL}$, T4 $< 4.5 \mu\text{g/dL}$ and T3 $< 0.6 \text{ ng/mL}$. The general characteristics of patients are shown in Table 1. All subjects gave written informed consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center of the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 02121712.2.0000.5346. The same procedure was carried out for the control group, which

consisted of volunteers that work or study at the Federal University of Santa Maria. For some analyzes, the number of samples used was lower, because it was considered representative of the group.

2.2 Thyroid Profile

The thyroid profile was assessed by estimating the serum TSH, tT3, and tT4 concentration via a chemiluminescent immunometric assay using an IMMULITE 2000 immunoassay system (Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, USA). The clinical reference ranges were 0.55–4.55 $\mu\text{IU/mL}$ for TSH, 0.6–1.81 ng/mL for T3, and 4.5–12.5 $\mu\text{g/dL}$ for T4.

2.3 Chemicals

Adenosine, ATP, ADP, AMP, Trizma base, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), malachite green, trichloroacetic acid and Coomassie Brilliant Blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), and bovine serum albumin and dibasic anhydrous potassium phosphate (K_2HPO_4) were purchased from Reagen (Colombo, PR, Brazil). Further chemicals used in the experiment were of the highest purity.

2.4 Platelet preparation

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al.²¹ with the following minor modifications. Total blood was collected with 0.120 M sodium citrate as an anticoagulant. The total blood–citrate system was centrifuged at 160 g for 15 min, after which, the PRP was centrifuged at 1,400 g for 30 min and was washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities.

2.5 NTPDase and ecto-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, in a final volume of 200 µL, as described by Lunkes et al.²¹. Although the NTPDases require millimolar concentrations of Ca²⁺, ecto-5'- nucleotidase depends on Mg²⁺ for AMP hydrolysis, thus, the reaction medium for ecto-5'- nucleotidase was as previously described, except that 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂. Twenty microliters of the enzyme preparation (8–12 µg protein) was added to the reaction mixture and 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 or AMP at a final concentration of 2.0 mM. The incubation was carried out in ELISA plates for 60 min. Both enzyme assays were stopped by the addition of 150 µL 15% TCA. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al.²² using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as a standard. However, some modifications were performed: after stopping the reaction, 30 µL of the preparation was transferred to a new plate and malachite green was added. Controls were carried out to correct for non-enzymatic hydrolyses of nucleotides by adding the enzyme preparation after TCA addition. All samples were run in triplicate. Enzyme specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.6 Adenosine deaminase assay

The activity of ADA from platelets was determined according to Guisti and Galanti²³, based on the Bertholet reaction, which involves the formation of a complex from ammonia that is released from adenosine and quantified spectrophotometrically. Briefly, 50 µL of platelets reacted with 21 mmol/L of adenosine, pH 6.5, for 60 min at 37°C. This method is based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of adenosine. The

protein content used for the platelet experiment was adjusted between 0.7 and 0.9 mg/mL. The results were expressed as U/mg protein. One unit (1U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia per minute from adenosine under standard assay conditions.

2.7 Protein determination

Protein content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford²⁴, using bovine serum albumin as the standard. This assay is based on the binding of the dye Coomassie Blue G-250 to protein, and this binding is quantified by measuring the absorbance maximum of the solution at 595 nm.

2.8 NTPDase and ecto-5'-nucleotidase expression

The expression of NTPDase (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cell populations was analyzed using flow cytometric analysis. Whole blood (100 μ L) with EDTA was incubated with 2 mL lysis solution for 15 min in the dark. Then the blood was centrifuged at 120 g for 5 minutes, and cells were incubated with 10 μ L of anti-CD39, anti-CD73 and anti-CD61 (platelets) for 25 min in the dark at room temperature. The cells were then recentrifuged at 120 g for 5 min, the supernatant was discarded and 1 mL PBS supplemented with 0.1% azide and 1% FBS was added to the pellet. This washing process was repeated twice, and ultimately, cells were resuspended in 1 mL of PBS and were analyzed with medium speed on the flow cytometer BD Accuri C6, equipped with a blue and red laser, two light scatter detectors, and four fluorescence detectors with optical filters optimized for the detection of FITC, PE, PerCP, and APC. A negative sample was also analyzed using cells not labeled with antibodies. Data were analyzed using FlowJo V10 software (Ashland, OR).

2.9 Analysis of purine concentration in serum by high-performance liquid chromatography (HPLC)

The denaturation of sample proteins was performed using 0.6 mol/L perchloric acid. All samples of serum were then centrifuged (14,000 g for 10 min) and the supernatants were neutralized with 4.0 N KOH and clarified by a second centrifugation (14,000 g for 15 min). Aliquots of 50 μ L were analyzed on a reversed-phase HPLC system using a 25-cm C18 Shimadzu column (Shimadzu, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan) at 260 nm with a mobile phase containing 60 mM KH_2PO_4 , 5.0 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 30% methanol according to a method previously described by Voelter et al.²⁵. The peaks of purines (ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, hypoxanthine, and uric acid) were identified by their retention times and were quantified by comparison with standards. The results are expressed as the amount of the different compounds/mL serum.

2.10. Lipid peroxidation

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to Olas et al.²⁶ with some modifications. A 50 μ L aliquot of platelets was incubated with an equal volume of water, with the addition of 400 μ L 15% (w/v) TCA in 0.25 M HCl and 400 μ L 0.37% (w/v) thiobarbituric acid (TBA) in 0.25 M HCl at 95°C for 15 min. Following cooling, the absorbance at 535 nm was measured and the results were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.11. Protein carbonyl

The carbonylation of proteins in serum was determined by a modified Levine method²⁷. The method is based on the quantification of protein carbonyl by reaction with 2,4-

dinitrophenylhydrazine in acid medium, at 370 nm, using a molar extinction coefficient (21×10^3 /mol per cm). The results are expressed as nmol protein carbonyl/mg protein.

2.12. Intracellular reactive species (RS) production

The dichlorofluorescein fluorescence assay was used to measure reactive species production by cellular components. A 50 μ L aliquot of serum was added to a medium containing Tris-HCl buffer (0.01 mM, pH 7.4) and dichlorofluorescein diacetate (7 mM). After the addition of dichlorofluorescein diacetate, the medium was incubated in the dark for 1 h until the fluorescence measurement (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, with both slit widths at 1.5 nm). The oxidized dichlorofluorescein was determined using a standard curve of oxidized dichlorofluorescein and the results were expressed as nM DCFOxide/mL²⁸.

2.13. Measurement of ascorbic acid

Ascorbic acid concentration were determined by the method described by Abdalla et al.²⁹. In this technique, 100 μ L of serum is mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), incubated for two hours, and after, sulfuric acid was added, such that forms an orange red compound measured at 520 nm and expressed in mg vit C/mL serum.

2.14. Glutathione S-transferase assay

The activity of GST was measured in the serum using a procedure described by Habig et al.³⁰ that involved 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) as a substrate. The assay mixture contained 1 mM CDNB (in ethanol), 10 mM GSH, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), and 20 μ L of the serum. The enzyme activity was calculated from the changes in absorbance at 340 nm using a molar extinction coefficient of 9.6 mM/cm. The activity was expressed as μ mol GS-DNB min/mg protein.

2.15. Determination of total thiols (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) in platelets

The T-SH groups were assayed in platelets by the method of Boyne and Ellman³¹ with some modifications. This method consists of the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at pH 7.0, measured at 412 nm. The results were expressed as mmol T-SH/mL of platelets. The amount of NPSH was also assayed in platelets by the method of Ellman with some modifications. Aliquots (100 μ L) of platelets were added to 750 μ L 1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4 and the reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM DTNB (50 μ L). Results were expressed as mmol NPSH/mL of platelet.

2.16. Statistical analysis

Data were analyzed statistically using the Student's *t*-test for independent samples. Pearson's correlation was performed between NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, adenosine deaminase, TBARS, carbonyl protein and ROS, $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all analyses used. All data were expressed as the mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Thyroid Profile

Serum TSH, tT3 and tT4 concentration were measured on the day of blood collection to confirm hypothyroidism in the experimental group. As expected, TSH concentration were elevated (106.5 μ IU/mL), where as those of tT3 and tT4 were lower (0.32 ng/mL and 1.50 μ g/dL respectively) than reference values for healthy adults described in the Methods' section.

3.2. Activity and expression of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase

The activity of NTPDase using ATP or ADP as substrate was significantly higher (82% and 70%, respectively) in the group of patients with hypothyroidism than in the control

group (Figure 1A and 1B, $P < 0.001$). Similarly, ecto-5'-nucleotidase activity also was significantly increased (39%) in patients with hypothyroidism (Figure 1C, $P < 0.001$).

As a second step, it was investigated whether the increase in NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities observed in patients with hypothyroidism is due to a change in expression patterns of these enzymes. To assess this question, the frequency of platelets expressing NTPDase (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) was determined by flow cytometry. Initially, gates were set to select the platelet population in 3D plot of CD61 FITC (platelet-specific antibody), forward (FSC) and side (SSC) light scatter (Figure 2A). "After that, we observed an increase in the percentage of CD39+ platelets in patients with hypothyroidism compared with control subjects ($P < 0.05$; Figure 2B and C). However, there was no difference in the percentage of CD73+ platelets (Figure 2B and C). Similarly, the mean expression of NTPDase, estimated by mean fluorescence intensity (MFI), was increased in platelets of patients with hypothyroidism compared with control subjects ($P < 0.05$) and there was no difference in the ecto-5'- nucleotidase expression (Figure 2B and D).

3.3 Adenosine deaminase activity

Since adenosine exerts significant anti-aggregation effects, the enzymatic activity responsible for purine degradation was also investigated. The activity of ADA (Figure 3) was higher (52%) in patients with hypothyroidism than in individuals in the control group ($P < 0.001$), suggesting that adenosine is rapidly degraded in the blood of patients with hypothyroidism.

3.4 Analysis of purine concentration in serum by HPLC

To confirm the impact of enzymes on nucleotide and nucleoside levels, the concentration of ATP, ADP, AMP, adenosine, Inosine (Ino), Hypoxanthine (Hyo), Xanthine (Xan), Uric acid were measured in serum from control individuals and patients with hypothyroidism, using HPLC. Table 2 shows that no differences were observed in the concentration of ATP, ADP and AMP, but adenosine levels were 45% lower in the serum of hypothyroid patients than in the serum of control subjects ($P < 0.05$). No differences were observed in the concentration of inosine and hypoxanthine. The uric acid decreased (60%) in hypothyroid patients compared with the control group (Table 2).

3.5 Oxidative profile

Since adenosine modulates the levels of ROS^{32,33}, which in turn, participates in platelet activation and subsequent thrombus formation³⁴, it was assessed whether serum from post-thyroidectomy patients showed changes in ROS production. The concentration of ROS were higher in the serum from patients with hypothyroidism compared with those in the control group (42%, $P < 0.001$) (Figure 4).

Disorders that affect the oxidant/antioxidant balance and that result in an increased production of ROS, can lead to the oxidative damage of cellular structures and biomolecules. Thus, as a second step, we investigated whether the high levels of ROS might reflect higher protein and lipid damage in patients with hypothyroidism. To assess this question, we performed TBARS and protein carbonyl detection assays. As expected, TBARS in platelets and proteic carbonylation in serum were higher by 125% and 30% respectively, than in control subjects ($P < 0.001$), demonstrating higher levels of lipid and protein damage (Figure 5).

To maintain a balance and counteract the effects of ROS, the body has an antioxidant system, extremely important because it directly suppress ROS levels and provide maximum protection for biological targets³⁵. In this context, ascorbic acid concentration, which are an important component of the non-enzymatic antioxidant defense system increased in the serum from patients with post-thyroidectomy hypothyroidism by 40% ($P < 0.01$). Nevertheless, another antioxidant defense mechanism involving Glutathione S-transferase activity decreased by 20% ($P < 0.05$) in the serum from patients with hypothyroidism patients (Figure 6).

Additionally, total (T-SH) and non-protein thiols (NPSH) are part of the antioxidant system, since they oxidize and deactivate compounds with available sulfhydryl (-SH) groups³⁶. The T-SH and NPSH levels increased (19% and 7%, respectively, $P < 0.001$) in patients with post-thyroidectomy hypothyroidism in comparison to those of control subjects (Figure 7).

3.6 Pearson's correlation

In view of high ROS concentration in post-thyroidectomy patients and the increased lipid and protein damage as well as the increased NTPDase, ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities in the same patients, we considered it essential to investigate the correlation between reactive species production and the other parameters. The results showed a positive correlation between ROS concentration and the activities of NTPDase using ATP (Figure 8A, $P < 0.01$) or ADP as substrate (Figure 8B, $P < 0.05$), ecto-5'-nucleotidase (Figure 8C, $P < 0.01$) or adenosine deaminase (Figure 8D, $P < 0.001$), highlighting the novelty of this study in revealing the involvement of reactive species in the modulation of purinergic enzymes. In addition, the same positive correlation was observed between ROS levels and the parameters of oxidative damage, i.e., the level of TBARS (Figure

8E, $P < 0.05$) and protein carbonyl (Figure 8F, $P < 0.01$), reinforcing the link between ROS production and cell injury.

4. Discussion

Because thyroid cancer affects endocrine glands, when a thyroidectomy is required for treatment, the patient will suffer from hypothyroidism and the lack of thyroid hormones can cause damage to the body. Furthermore, recent studies have demonstrated the relationship between thyroid hormones and diseases involved with the purinergic system^{37,38}. However, in this study, we have shown, specifically, the effects of post-thyroidectomy hypothyroidism on the purinergic system, including the activity and expression of ectoenzymes in platelets of patients, and purine concentration, as well as on the redox profile, including ROS generation, and protein injury in serum, besides lipid injury and non-enzymatic antioxidant levels, in platelets of patients. Importantly, we have shown that an increase in ROS production displayed a positive correlation with ectonucleotidase activities in post-thyroidectomy hypothyroidism.

Adenine nucleotides and nucleosides are widely involved in thromboregulation, as well as in the regulation of the vascular response to endothelial damage, by exerting a variety of effects on platelets³⁹. The nucleotide concentration are regulated by purinergic system enzymes and the role of these enzymes in thrombus formation has been widely studied. Since hypothyroidism can result in thrombotic conditions, it is crucial to assess the activity of NTPDase, ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase in platelets from patients post-thyroidectomy.

Our results show an increase in all purinergic system enzyme activities in hypothyroid patients (Figure 1 and 2). Notably, the expression of NTPDase (CD39) was higher in hypothyroidism patients, indicating that the impact of thyroid removal can also cause

important changes at molecular level, especially regarding ATP and ADP hydrolysis, leading to a major breakdown of these two nucleotides. Consistent with this reasoning, an increase in ATP and ADP hydrolysis can be viewed as a protector effect, since ADP is responsible for many of the abnormal processes, including platelet aggregation.

Regarding AMP hydrolysis, while the ecto-5'-nucleotidase activity was increased in patients, the expression levels of this enzyme did not reveal any alteration in the platelets of patients compared to those in control subjects, indicating non-significant changes in the expression of this enzyme compared to prominent changes in NTPDases. Taken together, increasing enzyme activities and expression might trigger a reduction in nucleotide concentration. However, no changes in the ATP, ADP and AMP levels were observed in hypothyroid patients compared to healthy subjects. Nonetheless, adenosine concentration were lower in hypothyroid patients. Since the concentration of this nucleoside is regulated by the action of the enzyme ADA, it is expected that the low adenosine concentration might be due to a higher ADA enzyme activity, as confirmed in our study. The ADA enzyme is responsible for the deamination of adenosine to inosine and its activity has been shown to increase in several types of cancer and other diseases^{18,40}.

Concerning the concentration of other nucleosides from the purinergic cascade, only uric acid showed significant differences and was lower in patients. These results need to be analyzed in more detail, to understand their importance in the pathophysiology of hypothyroidism.

An important point related to nucleotide release is that besides its release into the extracellular environment via the blood and vascular cells, such as erythrocytes, platelets and endothelium⁴¹, this liberation can also occur in response to cellular injury in cases of increased ROS production⁴². Furthermore, previous studies have shown a negative correlation between the activity of ADA and antioxidant enzymes⁴³ and a positive correlation between

ADA activity and MDA levels in plasma⁴⁴. Thus, to help understand the apparent discrepancy between enzyme activities and nucleotide concentration in the studied patients, the oxidant status of these patients needed to be verified.

In this study, lipid peroxidation levels assessed by the TBARS assay increased, which might be associated with an increase in ADA activity, as already demonstrated in a previous study⁴⁴. This study also showed an increase in protein carbonylation, which together with TBARS levels, is indicative of cell damage. “In addition, we analyzed the activity of GST, one of the best-studied detoxifying enzymes in different organisms. This enzyme belongs to a family of multifunctional enzymes that catalyze the conjugation of glutathione to several other molecules. GSTs have two active sites per dimer. Each active site consists of at least two binding regions, one very specific for GSH, and another binding site with less specificity for the electrophiles⁴⁵. The decrease observed in GST activity in some individuals could be attributed to the decrease in GSH levels⁴⁶.

However, our results showed no decrease in NPSH levels, which suggests that the GST is being negatively modulated in order to maintain high levels of GSH, that can be used by other reactions in the body, in the neutralization of hydroxyl radicals, especially in the presence of oxidative stress⁴⁶. Therefore, a higher generation of reactive oxygen radicals and imbalance in the antioxidant defense system could also cause a decrease in GST activity. These results, together with the increase in lipid peroxidation and carbonyl protein and the increase in ascorbic acid, indicate the presence of oxidative stress in patients with hypothyroidism, which agrees with the findings of other authors^{47,48}. We observed a positive correlation between ADA and ROS production (Figure 8), which confirmed the relationship between ADA and oxidative stress conditions.

Furthermore, our experimental findings suggest that hypothyroidism as a result of oxidative disruption (caused by higher ROS generation) might activate antioxidant defense

systems, involving T-HS, NPSH and ascorbic acid. Indeed, these non-enzymatic antioxidant defenses were higher in hypothyroid patients than in healthy subjects. These are important defense processes in organisms, because they contribute to the protection of normal cell structures and functions. The SH groups are involved in maintaining redox homeostasis, quenching free radicals and participating in detoxification reactions⁴⁹. Moreover, the increased concentration of ascorbic acid observed in patients during this study might represent an attempt by the organism to neutralize the damage caused by the increased production of ROS and the pro-oxidant state, since this vitamin can directly combat ROS, nitric oxide and hypochlorous acid production, which are directly involved in stress processes⁵⁰.

Moreover, it should be highlighted that nucleotides can also be released in response to cellular damage from oxidative injury and thus, the remarkable degree of oxidative stress in patients might be due to the increased release of nucleotides by the body, which also caused an increase in ectonucleotidase activity, demonstrated by the positive correlation between ROS production and enzyme activities, which was confirmed by our results (Figure 8). Thus, we can conclude that enzymatic activity is modulated to offset the pathological release of nucleotides and to maintain homeostasis.

In conclusion, our findings contribute to the understanding of post-thyroidectomy hypothyroidism and the role of the purinergic system and oxidative stress in this disorder. We elucidate here a potential mechanism by which purinergic system enzymes are altered in this disease. Although additional studies are required to reach definite conclusions, our findings clearly support the hypothesis that oxidative stress presented by hypothyroid patients, and particularly high ROS production, has a causal relationship with changes in ectonucleotidase expression and activity levels. The modulation of purinergic enzymes appears to be one pathway that prevents the undesirable effects of high nucleotide concentration, mainly of ADP. Furthermore, the results presented in this study might help to understand the metabolic

changes that occurs in patients after thyroidectomy, and prevent episodes that might pose risks to the health of the patients.

5. Acknowledgements

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The HU's research on purinergic signaling is supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Project No. 2012/50880-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Project No. 486294/2012-9 and 467465/2014-2), Brazil. MMP's postdoctoral research is supported by a fellowship from CNPq.

6. Conflict of interest

All authors have read and agree to the publication of the manuscript and report no declarations of conflict of interest.

7. References

1. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, Garavello W, Bertuccio P, Levi F, Negri E. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *Int J Cancer* 2015;136(9):2187-95.
2. Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med* 1990;88(6):631-7.
3. Jonklaas J, Nsouli-Maktabi H. Weight changes in euthyroid patients undergoing thyroidectomy. *Thyroid* 2011;21(12):1343-51.
4. Ichiki T. Thyroid Hormone and Vascular Remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2015.
5. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001;104(22):2746-53.
6. Duarte MM, Loro VL, Rocha JB, Leal DB, Bem AF, Dorneles A, Morsch VM, Schetinger MR. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS J* 2007;274(11):2707-14.
7. Stuijver DJ, van Zaane B, Romualdi E, Brandjes DP, Gerdes VE, Squizzato A. The effect of hyperthyroidism on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost* 2012;108(6):1077-88.
8. Horacek J, Maly J, Svilius I, Smolej L, Cepkova J, Vizda J, Sadilek P, Fatorova I, Zak P. Prothrombotic changes due to an increase in thyroid hormone levels. *Eur J Endocrinol* 2015;172(5):537-42.
9. Diamond SL, Purvis J, Chatterjee M, Flamm MH. Systems biology of platelet-vessel wall interactions. *Front Physiol* 2013;4:229.
10. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 2007;31(2):77-98.
11. Robson SC, Seigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006;2(2):409-30.
12. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006;2(2):351-60.
13. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(5):673-94.
14. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation* 2007;116(15):1725-35.
15. Konukoglu D, Ercan M, Hatemi H. Plasma viscosity in female patients with hypothyroidism: effects of oxidative stress and cholesterol. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002;27(2):107-13.
16. Torun AN, Kulaksizoglu S, Kulaksizoglu M, Pamuk BO, Isbilen E, Tutuncu NB. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70(3):469-74.

17. Baldissarelli J, Santi A, Schmatz R, Zanini D, Cardoso AM, Abadalla FH, Thome GR, Murussi C, Polachini CR, Delenogare DP and others. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. *Biomed Pharmacother* 2016;84:1849-1857.
18. Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, Gutierrez JM, Maldonado PA, Thome GR, Cardoso AM, Stefanello N, Oliveira L, Chiesa J and others. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. *Biomed Pharmacother* 2012;66(1):40-5.
19. Polachini CR, Spanevello RM, Casali EA, Zanini D, Pereira LB, Martins CC, Baldissarelli J, Cardoso AM, Duarte MF, da Costa P and others. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience* 2014;266:266-74.
20. Schmatz R, Schetinger MR, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PA, Gutierrez J, Correa Mde C, Giroto E, Moretto MB and others. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2009;84(11-12):345-50.
21. Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, Schetinger MR. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2004;65(1):1-6.
22. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157(2):375-80.
23. Giusti GG, B. Colorimetric method. Verlag Chemie: Weinheim 1984. 315–323 p.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
25. Voelter W, Zech K, Arnold P, Ludwig G. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 1980;199:345-54.
26. Olas B, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. D-glucaro 1,4-lactone and resveratrol as antioxidants in blood platelets. *Cell Biol Toxicol* 2008;24(2):189-99.
27. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-78.
28. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992;13(3):637-48.
29. Abdalla FH, Schmatz R, Cardoso AM, Carvalho FB, Baldissarelli J, de Oliveira JS, Rosa MM, Goncalves Nunes MA, Rubin MA, da Cruz IB and others. Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: Possible involvement of the acetylcholinesterase and Na(+),K(+)-ATPase activities. *Physiol Behav* 2014;135:152-67.
30. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249(22):7130-9.
31. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82(1):70-7.

32. Kim JS, Diebold BA, Babior BM, Knaus UG, Bokoch GM. Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 2007;282(48):34787-800.
33. Thakur S, Du J, Hourani S, Ledent C, Li JM. Inactivation of adenosine A2A receptor attenuates basal and angiotensin II-induced ROS production by Nox2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2010;285(51):40104-13.
34. Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(11):1988-96.
35. Masutani H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int J Hematol* 2000;71(1):25-32.
36. Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 2004;27(8):1212-7.
37. Bruno AN, Carneiro-Ramos MS, Buffon A, Pochmann D, Ricachenevsky FK, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ. Thyroid hormones alter the adenosine nucleotide hydrolysis in adult rat blood serum. *Biofactors* 2011;37(1):40-5.
38. Baldissarelli J, Santi A, Schmatz R, Abdalla FH, Cardoso AM, Martins CC, Dias GR, Calgaroto NS, Pelinson LP, Reichert KP and others. Hypothyroidism Enhanced Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Activities in Rat Synaptosomes can be Prevented by the Naturally Occurring Polyphenol Quercetin. *Cell Mol Neurobiol* 2017;37(1):53-63.
39. Birk AV, Broekman MJ, Gladek EM, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, Szeto HH. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J Lab Clin Med* 2002;140(3):166-75.
40. Maldonado PA, Negrini LA, Ethur Jda S, Oliveira L, Correa Mde C, Becker LV, Zanin RF, Morsch VM, Schetinger MR. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. *Biomed Pharmacother* 2010;64(7):499-504.
41. Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993;265(3 Pt 1):C577-606.
42. Lavieri R, Piccioli P, Carta S, Delfino L, Castellani P, Rubartelli A. TLR costimulation causes oxidative stress with unbalance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production. *J Immunol* 2014;192(11):5373-81.
43. Erkilic K, Evereklioglu C, Cekmen M, Ozkiris A, Duygulu F, Dogan H. Adenosine deaminase enzyme activity is increased and negatively correlates with catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in patients with Behcet's disease: original contributions/clinical and laboratory investigations. *Mediators Inflamm* 2003;12(2):107-16.
44. Kose K, Yazici C, Assioglu O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behcet's disease. *Clin Biochem* 2001;34(2):125-9.
45. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001;360(Pt 1):1-16.

46. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 2014;5:196.
47. Morris MS, Bostom AG, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia associated with hypothyroidism in the third US National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2001;155(1):195-200.
48. Nanda N, Bobby Z, Hamide A. Association of thyroid stimulating hormone and coronary lipid risk factors with lipid peroxidation in hypothyroidism. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(5):674-9.
49. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
50. Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71(9):725-31.

LEGENDS

Table 1. General characteristics of hypothyroid patients and healthy subjects.

Table 2. Purine levels in serum of healthy subjects and post-thyroidectomy hypothyroidism patients analyzed by HPLC. Results are expressed in nmol/mL of serum ($n = 5$). Data are represented as mean values \pm SEM ($P < 0.05$). *Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 1. NTPDase activity using ATP (A) or ADP (B) as substrate and ecto-5'-nucleotidase using AMP (C) as substrate in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; $n=45$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 2. NTPDase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) expression by flow cytometry in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. A) Representative 3D-dot-plot for CD61 FITC (platelet-specific antibody), forward (FSC) and side (SSC) light scatter. Gates were set to select the platelet population. B) Representative flow cytometry histograms show staining with CD39 APC and CD73 PE antibodies in platelets of healthy subjects and patients. Data are expressed as mean percentages \pm SEM (C) or mean expression levels \pm SEM (D) of these ectonucleotidases estimated by mean fluorescence intensity (MFI) for each sample ($P < 0.05$; $n=20$). *Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 3. ADA activity in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; $n=45$). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 4. Levels of reactive oxygen species (ROS) in serum of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$;

n=45). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 5. Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in platelets and proteic carbonylation in serum of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; n=35). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 6. Ascorbic acid levels and GST activity in serum of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.01$; n=40) and ($P < 0.05$; n=35) respectively. ** And *indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 7. T-SH and NPSH levels in platelets of healthy subjects and patients with post-thyroidectomy hypothyroidism. Data are expressed as means \pm SEM ($P < 0.001$; n=35). ***Indicates a significant difference between the control and patients with hypothyroidism.

Figure 8. Pearson's correlation analysis between ROS levels and NTPDase activity for ATP (A) ($P < 0.01$) or ADP (B) ($P < 0.05$) hydrolysis, ecto-5'-nucleotidase (C) ($P < 0.01$) and ADA (D) activities ($P < 0.001$), or between ROS levels and TBARS levels (E) ($P < 0.05$) and protein carbonylation (F) ($P < 0.01$) (n=12).

TABLES

Table 1. General characteristics of hypothyroid patients and healthy subjects

	Control	Hypothyroid patients
Women	35	38
Men	10	7
Age of women (median range)	23-71 46.05	20-77 47.02
Age of men (median range)	28-70 54.74	28-76 57.84
Hypertension	10	10
Papillary carcinoma	-	42
Follicular carcinoma	-	3

Table 2: Purine concentrations in serum of healthy subjects and hypothyroid patients analyzed by HPLC.

	ATP	ADP	AMP	Ado	Ino	Hyp	Xan	Uric acid
Controls	4.087	5.053	6.466	40.92	22.31	42.08	37.20	225.1
Patients	5.759	7.874	7.998	22.47*	20.23	33.00	25.77	91.98*

Results are expressed in nmol/mL of serum. * Represents statistical difference from control group (Student's t test, $P < 0.05$).

FIGURES

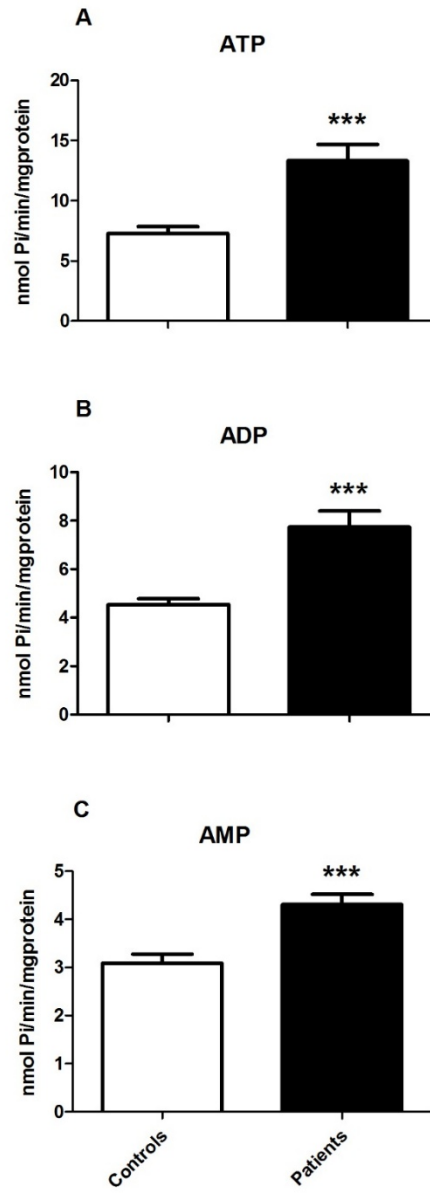


Figure 1

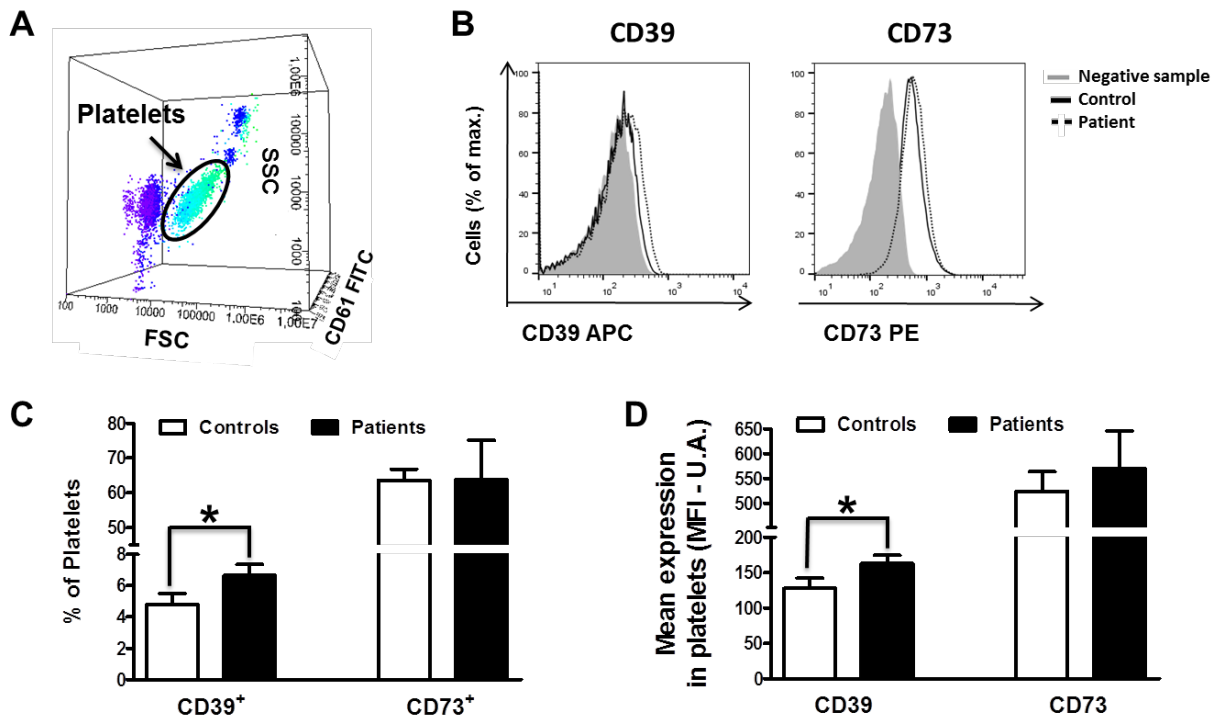


Figure 2

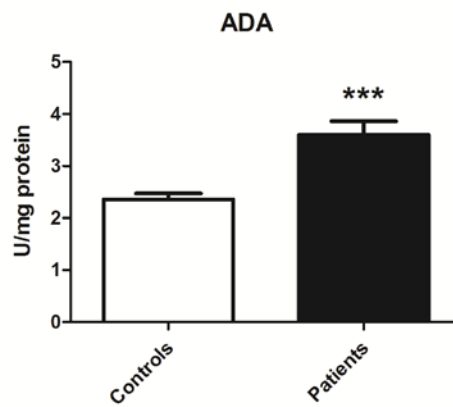


Figure 3

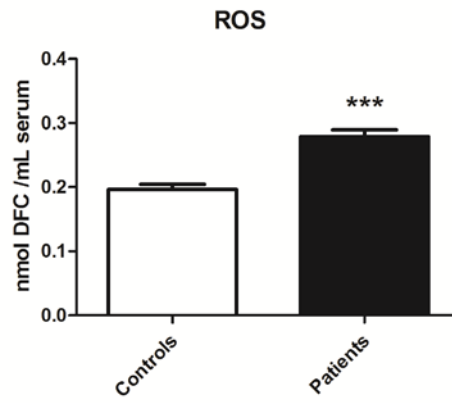


Figure 4

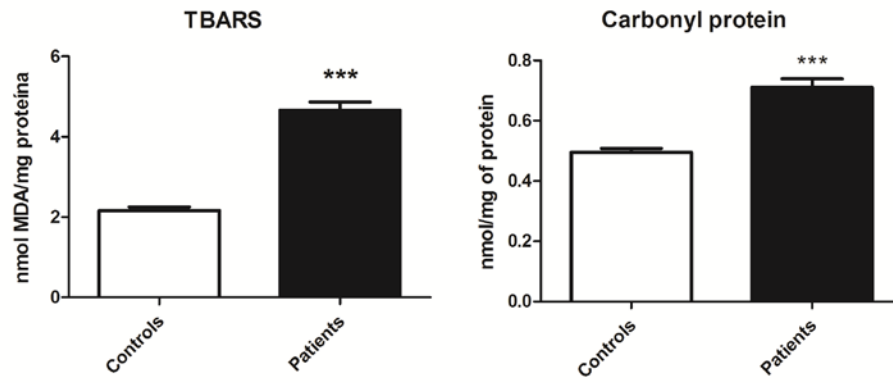


Figure 5

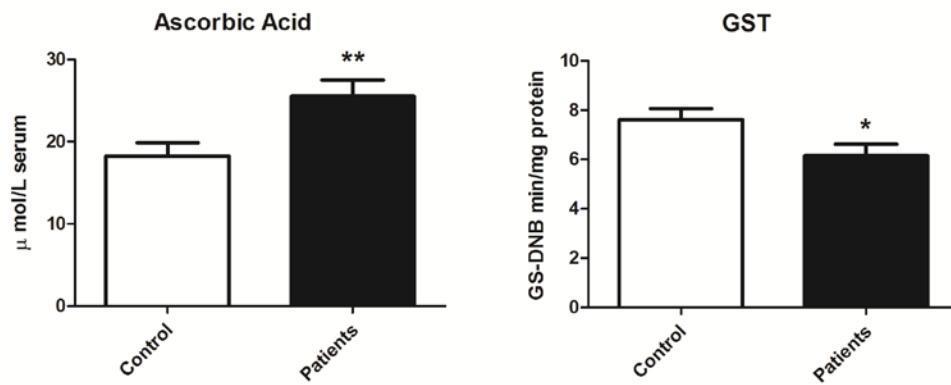


Figure 6

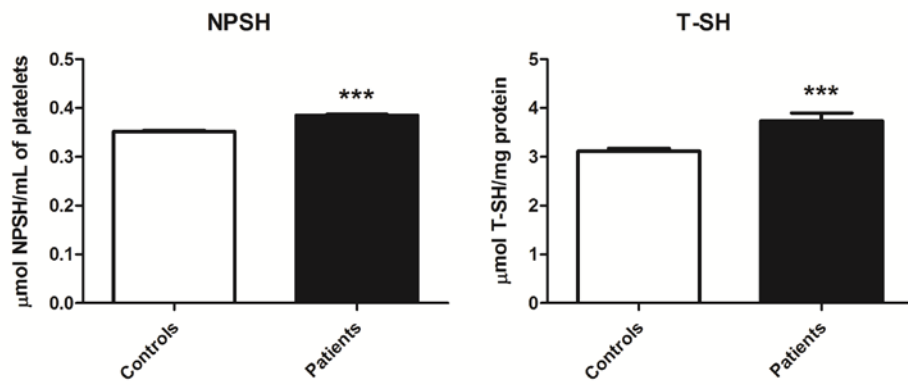


Figure 7

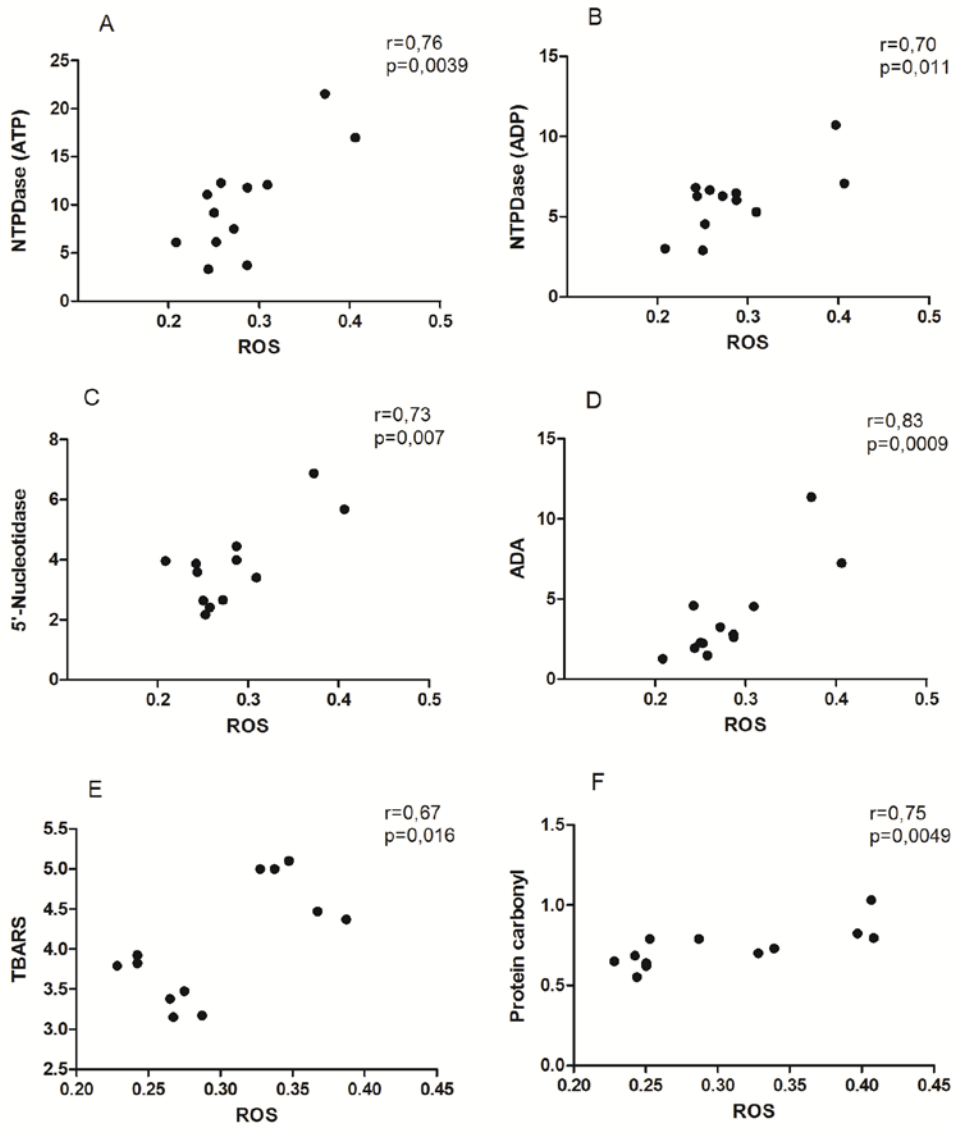


Figure 8

5. DISCUSSÃO

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o funcionamento normal do organismo, com envolvimento no processo de neurotransmissão, modulando o transporte de adenosina e seus receptores e com ação importante no desenvolvimento cerebral (CARAGEORGIOU, et al., 2007). Além disso, vários estudos já relacionaram os distúrbios da tireoide com estresse oxidativo e alterações na hemostasia sanguínea, levando a eventos trombóticos ou tendências a sangramento, podendo o hipotireoidismo ser considerado fator de risco para doenças cardiovasculares (STUIJVER, et al., 2012; ICHIKI, 2015; BALDISSARELLI, et al., 2016).

Sabe-se que ATP e acetilcolina (ACh) são importantes moléculas de sinalização extracelular que atuam no SNC (BURNSTOCK, 2004) e fazem parte do sistema colinérgico e purinérgico respectivamente. Além disso, é conhecido que as enzimas do sistema purinérgico possuem um importante papel na neurotransmissão, neuromodulação, regulação da formação de trombos e nas respostas inflamatórias, sendo que alterações nas suas atividades já foram descritas em várias condições patológicas (SCHMATZ, et al., 2009; ZANINI, et al., 2012; MARTINS, et al., 2016). Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se a sinalização mediada por esses neurotransmissores sofre alterações e está envolvida nas manifestações causadas pelo hipotireoidismo. Além disso, avaliar se o tratamento com a quercetina é capaz de reverter as alterações causadas pelo distúrbio, e se esse flavonoide possui assim, potencial terapêutico para auxiliar no tratamento e recuperação dos pacientes com hipotireoidismo.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o hipotireoidismo causou uma diminuição na atividade da enzima AChE em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos apenas no terceiro mês de tratamento, resultados semelhantes a outros encontrados na literatura (CARAGEORGIOU, et al., 2007). É possível sugerir que após um mês de tratamento o déficit hormonal ainda foi pequeno e o dano causado não foi suficiente para alterar a atividade da enzima, o que aconteceu no terceiro mês.

Nesse contexto, estudos demonstraram uma diminuição significativa no conteúdo de ACh no hipocampo (WANG, et al., 2014) de ratos com hipotireoidismo. Isso nos permite inferir que em animais com hipotireoidismo os níveis de ACh podem de fato estar diminuídos no SNC devido a uma diminuição na síntese do neurotransmissor, o que nos leva acreditar que a diminuição na atividade da AChE após a administração de MMI possa estar relacionada com a necessidade de homeostase e manutenção do estado funcional neuronal. Assim, a

atividade reduzida de AChE pode ser um mecanismo compensatório para aumentar os níveis de ACh e restaurar a função cerebral no hipotireoidismo.

Neste trabalho o tratamento com quercetina manteve a atividade da AChE diminuída, causando uma redução na hidrólise da ACh e, conseqüentemente, um aumento dos níveis de ACh na sinapse. Essa pode ser uma das formas pelas quais a quercetina atua na modulação do SNC, causando aumento da transmissão sináptica, o que está relacionado a aprendizagem, memória, e controle dos movimentos (KIEHN, 2006). Testes *in vitro* confirmaram estes resultados, sendo a inibição enzimática da AChE proporcional à dose de quercetina testada. Sendo assim, sugerimos que a quercetina, um composto natural com propriedades inibidoras da AChE, poderia ser utilizada como um adjuvante no tratamento de muitas doenças neurológicas, melhorando as disfunções cognitivas características dessas.

Além disso, os resultados mostraram que a atividade da enzima NTPDase atuando na hidrólise de ATP e ADP em sinaptossoma de córtex cerebral não foi alterada em animais com hipotireoidismo, corroborando com os achados de BRUNO et al, (2009). Esse resultado se manteve no terceiro mês de tratamento, o que nos mostra que esta enzima não sofre alteração em sua atividade mesmo com a permanência da doença por tempo maior. Por outro lado, a hidrólise de AMP pela E-5'-NT apresentou aumento no grupo de animais com hipotireoidismo no primeiro e terceiro meses, podendo resultar em aumento dos níveis de adenosina desde os estágios iniciais da doença. Esse resultado é de grande relevância, pois a adenosina tem papel fundamental na regulação da neuromodulação e na liberação de vários neurotransmissores (CUNHA, 2005). Por esse motivo avaliamos também a atividade da ADA, e surpreendentemente não houve diferença em animais com hipotireoidismo tanto no primeiro quanto no terceiro mês do tratamento. Assim, mesmo com a manutenção do tratamento, a atividade enzimática não foi alterada, e podemos sugerir que possivelmente os níveis do nucleosídeo estejam aumentados no córtex dos animais com hipotireoidismo devido à maior hidrólise do AMP.

Os animais com hipotireoidismo tratados com quercetina apresentaram uma diminuição na atividade tanto da NTPDase quanto da E-5'-NT, o que causa uma redução da hidrólise de ATP, ADP e AMP. Da mesma forma a atividade da ADA também diminuiu e isso poderia contribuir para níveis moderadamente aumentados de adenosina. Como esse nucleosídeo atua como uma molécula neuroprotetora esse pode ser um dos mecanismos pelos quais a quercetina exerce os seus efeitos benéficos no SNC (DAJAS, 2012; DONG, et al., 2014). Mais uma vez, os testes confirmaram os resultados encontrados e mostraram que a

quercetina inibiu as atividades da NTPDase e E-5'-NT. Contudo, mais estudos são necessários para que se possa esclarecer qual o mecanismo envolvido nessa acentuada inibição.

Da mesma forma que causam alterações na sinalização purinérgica no SNC, os hormônios tireoidianos estão amplamente envolvidos em alterações vasculares e seus níveis alterados podem ser considerados fator de risco para diversas patologias. Levando em conta que eventos que alteram a hemostasia sanguínea são muito dependentes da ação das plaquetas, o segundo trabalho desta tese pretendeu avaliar alguns parâmetros do sistema purinérgico e estresse oxidativo, que podem estar envolvidos nos processos de agregação plaquetária e regulação da homeostase em ratos com hipotireoidismo e hipertireoidismo. Mostramos os efeitos destes distúrbios sobre as atividades da NTPDase, E-5'-NT, ADA e NPP nas plaquetas e sobre os níveis de purinas bem como na geração de ERO no soro desses animais.

Os resultados encontrados mostraram uma diminuição nas atividades da NTPDase e E-5'-NT em animais com hipertireoidismo, o que poderia implicar um aumento nos níveis de nucleotídeos. Ao realizar a análise dos níveis desses por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), confirmou-se que os níveis de ATP, ADP e AMP estavam aumentados no hipertireoidismo. Já os animais com hipotireoidismo apresentaram diminuição apenas na atividade da E-5'-NT. Os resultados da CLAE demonstraram também que os níveis de ATP e ADP permaneceram inalterados, enquanto o AMP aumentou. Uma vez que a atividade de NTPDase não apresenta alteração neste grupo de animais, a maior quantidade de AMP pode ser explicada devido à baixa atividade da E-5'-NT e à elevada atividade da NPP.

A atividade da NPP aumentou tanto no grupo hipotireoidismo, quanto no grupo hipertireoidismo, indicando aumento da hidrólise de ATP e formação de mais AMP, uma molécula protetora e que permaneceria disponível para hidrólise em adenosina (BAGATINI, et al., 2011; BATTISTI, et al., 2013). Contudo, os níveis de adenosina foram menores no grupo de animais com hipertireoidismo, o que pode ser atribuído à atividade reduzida de E-5'-NT e a atividade aumentada da ADA. Sendo assim, essa maior atividade da ADA pode explicar a baixa adenosina e altas concentrações de inosina encontradas em ratos com hipertireoidismo. Esse aumento pode ser muito desfavorável, pois a adenosina é, dessa forma, mais desaminada e o organismo fica mais suscetível a danos e agravos, devido à falta desse nucleosídeo.

Além disso, a presença de estresse oxidativo em distúrbios da tireoide também vem sendo estudada e neste trabalho nós observamos uma correlação positiva entre a produção de

ADA e de ERO e entre os níveis de ERO e os níveis de Ado. Esses achados podem indicar que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio poderia ser um dos responsáveis pelos níveis de adenosina diminuída no hipertireoidismo. Estudos também já demonstraram que o nível de ERO aumenta durante a ativação plaquetária fisiológica porque as plaquetas são capazes de gerá-las.

Com base nesses estudos podemos sugerir que a deterioração oxidativa da membrana plaquetária causada pelas ERO encontrada em nosso estudo pode contribuir para as alterações na atividade das enzimas NTPDase, E-5-NT e NPP, uma vez que estas ectoenzimas estão presentes na membrana plaquetária e podem sofrer modificações em sua estrutura e conseqüentemente mudanças em suas atividades. O dano celular causado pelas ERO pode causar também uma liberação aumentada de nucleotídeos e assim, pode-se sugerir que, além da baixa degradação por enzimas, os níveis de nucleotídeos aumentam em ratos com hipertireoidismo devido a liberação aumentada pelas plaquetas. Sendo assim, as alterações nas enzimas purinérgicas e nos níveis de purina poderiam ser uma via que leva a efeitos indesejáveis nestas doenças.

O câncer de tireoide é outro distúrbio da glândula, o qual necessita de atenção devido aos efeitos causados durante o tratamento. É o mais comum do sistema endócrino e muitas vezes uma tireoidectomia é a terapia de escolha. Nesses casos, especialmente quando tireoidectomia total é realizada o paciente irá apresentar um quadro de hipotireoidismo, devido à ausência de produção dos hormônios. O terceiro trabalho desta tese objetivou então analisar os efeitos do hipotireoidismo pós-tireoidectomia sobre o sistema purinérgico, bem como sobre o perfil redox em plaquetas ou no soro de pacientes.

Nossos resultados mostraram um aumento em todas as atividades das enzimas do sistema purinérgico em pacientes com hipotireoidismo. Além disso, a expressão de NTPDase (CD39) foi maior nos pacientes, indicando que o impacto da remoção da tireoide também pode causar mudanças importantes a nível molecular, especialmente no que se refere à hidrólise de ATP e ADP, levando a uma maior degradação desses dois nucleotídeos. Seguindo esta linha de raciocínio, um aumento na hidrólise de ATP e ADP pode ser visto como um efeito protetor, uma vez que ADP é responsável por muitos dos processos anormais, incluindo a agregação plaquetária.

Ao contrário do verificado nos animais com hipotireoidismo, a hidrólise do AMP pela E-5'-NT também foi aumentada, porém os níveis de expressão dessa enzima não se alteraram nas plaquetas dos pacientes, indicando que apesar de apresentar atividade aumentada, os efeitos da falta de hormônios tireoidianos não foram suficientes para causar alteração a nível

molecular nessa enzima. Esse aumento diferente do que ocorre em modelo animal pode ser explicado pelas diferentes causas da doença, já que nos animais o hipotireoidismo foi induzido através da ingestão de MMI e não por tireoidectomia. A administração de MMI provoca inibição das reações de oxidação catalisadas pela tireoperoxidase, responsável pela iodação dos grupos tirosil da tireoglobulina e pela formação das iodotirosinas (RANG et al., 2012), porém as alterações ocasionadas no organismo podem não ser exatamente as mesmas e ocorrer ao mesmo tempo que as causadas pela remoção cirúrgica da glândula. Essas diferenças podem ser observadas, inclusive no peso final dos animais que foi menor no grupo hipotireoidismo do que os controles, o que não é esperado nos pacientes. Isso pode ser explicado devido ao fato de os animais estarem absorvendo menos nutrientes, necessários para a síntese proteica e devido à pequena hepatotoxicidade apresentada pelo MMI.

A concentração de adenosina, verificada através de CLAE mostrou-se menor nos pacientes com hipotireoidismo e, sendo que a ADA é responsável pela desaminação da adenosina a inosina, espera-se que a baixa concentração de adenosina possa ser resultado de uma elevada atividade enzimática da mesma. Essa enzima tem sido encontrada aumentada em vários tipos de câncer e outras doenças (MALDONADO, et al., 2010; ZANINI, et al., 2012), e, neste trabalho também foi possível observar esse aumento. Como a concentração de inosina não foi alterada mais estudos são necessários para entendermos os mecanismos envolvidos nessas alterações.

Um ponto importante relacionado com a difusão de nucleotídeos é que, além de sua liberação para o ambiente extracelular através de células vasculares, como eritrócitos, plaquetas e endotélio, essa liberação também pode ocorrer em resposta à lesão celular em casos de aumento da produção de ERO (LAVIERI, et al., 2014). Assim, para compreendermos os resultados relativos às atividades enzimáticas e a concentração de nucleotídeos nos pacientes estudados, o estado oxidativo desses foi avaliado. Os resultados mostraram um aumento na peroxidação lipídica, o que poderia estar associado a um aumento da atividade da ADA. Em adição à este resultado, também foi observado um aumento na carbonilação de proteínas, o que juntamente com os níveis de TBARS aumentados, é indicativo de danos celulares.

Além disso, nossos achados experimentais sugerem que o hipotireoidismo pode ativar sistemas de defesa antioxidante, tais como T-SH, NPSH e ácido ascórbico, os quais apresentaram níveis mais elevados em pacientes com hipotireoidismo, além da atividade da GST, uma das enzimas desintoxicantes mais bem estudadas do organismo. Estes são

importantes processos de defesa, porque contribuem para a proteção das estruturas e funções celulares normais (HALLIWELL, 2006; ALFADDA E SALLAM, 2012).

Os grupos SH estão envolvidos na manutenção da homeostase redox, na extinção de radicais livres e na participação em reações de desintoxicação (VALKO, et al., 2007). A diminuição na atividade da GST observada nos nossos resultados indica que a enzima está sendo modulada negativamente na tentativa de manter os níveis de GSH elevados, para que possam então serem utilizados por outras reações no organismo. Além disso, a concentração aumentada de ácido ascórbico pode representar uma tentativa do organismo de neutralizar os danos causados pelo aumento da produção de ERO e o estado pró-oxidante, uma vez que essa vitamina pode combater diretamente a produção de ERO, óxido nítrico e ácido hipocloroso, que estão diretamente envolvidos em processos de estresse (FINAUD, et al., 2006). Sendo assim, esses resultados, juntamente com o aumento da geração de ERO, indicam a presença de estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo, o que concorda com os achados de outros autores (MORRIS, et al., 2001; NANDA, et al., 2008).

Além disso, é importante ressaltar que assim como os nucleotídeos podem ser liberados em resposta ao dano celular causado por lesão oxidativa, o grau notável de estresse oxidativo em pacientes pode, também, ser devido à liberação aumentada de nucleotídeos pelo organismo, o que ainda causou um aumento nas ectonucleotidases, demonstrado pela correlação positiva entre a produção de ERO e as atividades enzimáticas. Observamos também uma correlação positiva entre a produção de ADA e ERO, que confirmou a relação entre ADA e condições de estresse oxidativo. Assim, podemos concluir que a atividade enzimática é modulada para compensar a liberação patológica de nucleotídeos e para manter a homeostase do organismo.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos demonstraram alterações nas atividades da 5'-nucleotidase e AChE em sinaptossomas cerebrais de ratos com hipotireoidismo, indicando que a neurotransmissão purinérgica e colinérgica estão alteradas nessa condição. Em contrapartida, a quercetina atua como inibidora enzimática em ambos os sistemas, e pode ter um importante papel nessa condição, podendo levar a um aumento nas concentrações de adenosina extracelular, possuindo de tal modo ação neuroprotetora. Assim, ela pode ser apontada como um composto polifenólico promissor na terapia coadjuvante para pacientes com hipotireoidismo.
- As atividades das enzimas NTPDase e E-5'-NT diminuíram em animais com hipertireoidismo enquanto que os animais com hipotireoidismo mostraram diferença apenas na atividade da E-5'-NT. Além disso a atividade da NPP foi elevada em ambos os grupos, indicando aumento da hidrólise de ATP e formação de mais AMP. A atividade da ADA também aumentou nos animais com hipertireoidismo, o que pode ser muito desfavorável, pois mais adenosina é desaminada e o organismo torna-se mais suscetível à lesão, devido à falta deste nucleosídeo. Assim, as alterações observadas nas enzimas purinérgicas podem ser um caminho que leva a efeitos indesejáveis nestas doenças.
- A reduzida atividade das ectonucleotidasas pode explicar o aumento nos níveis de nucleotídeos, sendo que ATP, ADP e AMP apresentaram-se elevados no grupo hipertireoidismo e apenas o AMP apresentou aumento no hipotireoidismo. Além disso, os níveis de adenosina foram menores no grupo de animais com hipertireoidismo. Essa menor concentração é explicada devido à sua menor formação pela E-5'-NT e maior desaminação pela ADA, gerando mais inosina.
- Nossos resultados contribuem para a compreensão das mudanças que ocorrem no hipotireoidismo e hipertireoidismo relacionados ao sistema purinérgico e estresse oxidativo. Sugerimos que o estresse oxidativo apresentado por ratos com hipotireoidismo e hipertireoidismo, particularmente a alta produção de ROS, está relacionado com alterações na atividade das ectonucleotidasas e nos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos.
- Concluimos também que houve um aumento nas atividades enzimáticas do sistema purinérgico em pacientes com hipotireoidismo pós-tireoidectomia, além de aumento na expressão da NTPDase (CD39) indicando que o impacto da remoção da tireoide também pode causar mudanças importantes a nível molecular, especialmente no que se refere à hidrólise de ATP e ADP, o que pode ser visto como efeito protetor, uma vez que o ADP é

responsável por muitos dos processos anormais do sistema vascular, incluindo a agregação plaquetária. Os níveis de expressão da E-5'-NT não revelaram alteração nas plaquetas dos pacientes. A modulação de enzimas purinérgicas parece ser uma via que evita os efeitos indesejáveis da concentração elevada de nucleotídeos. Assim, os resultados apresentados nesse estudo podem ajudar a entender as alterações metabólicas que ocorrem após tireoidectomia e prevenir episódios que possam representar riscos para a saúde dos pacientes.

- Não foram observadas alterações nos níveis de ATP, ADP e AMP. É possível que a manutenção de níveis normais desses nucleotídeos, mesmo com elevada liberação pelo organismo seja devida à ação compensatória das ectoenzimas que atuam rapidamente na sua hidrólise. Contudo, a concentração de adenosina foi menor nos pacientes com hipotireoidismo. Uma vez que a sua concentração é regulada pela ação da enzima ADA, espera-se que a baixa concentração de adenosina possa ser devida a uma atividade enzimática de ADA mais elevada, como confirmado no nosso estudo.
- Demonstramos um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas, além da aumentada produção de ERO, o que juntamente com aumento nos níveis de ácido ascórbico, T-SH e NPSH e uma diminuição na atividade da GST indica um quadro de estresse oxidativo presente nos pacientes com hipotireoidismo. Além disso, nós observamos uma correlação positiva entre as atividades das enzimas do sistema purinérgico e a produção de ROS. Nossos achados suportam a hipótese de que a presença de estresse oxidativo possui uma relação causal com mudanças na expressão e níveis de atividade das ectonucleotidasas.

7. REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.
- ABDALLA, F. H. et al. Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. **Mol Cell Biochem**, v. 381, n. 1-2, p. 1-8, 2013.
- ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **J Biomed Biotechnol**, v.1, p. 936486, 2012.
- ALTAY, M., et al. Serum Total Sialic Acid Level is Elevated in Hypothyroid Patients as an Atherosclerotic Risk Factor. **J. Clin. Lab. Anal**, 2017
- ANDERSON, G. W. Thyroid hormones and the brain. **Front Neuroendocrinol**, v. 22, n. 1, p. 1-17, 2001.
- ANGLADE, P.; LARABI-GODINOT, Y. Historical landmarks in the histochemistry of the cholinergic synapse: Perspectives for future researches. **Biomed Res**, v. 31, p. 1-12, 2010.
- ANWAR, J. et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. **Food Chem Toxicol**, v. 56, p. 459-66, 2013.
- AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 196, 2014.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 5, p. 1124-31, 2004.
- ARAÚJO, A. S. et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Mol Cell Endocrinol**, v. 249, n. 1-2, p. 133-9, 2006.
- BAGATINI, M. D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clin Biochem**, v. 41, n. 14-15, p. 1181-5, 2008.
- BAGATINI, M. D. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 1-2, p. 159-64, 2011.
- BALDISSARELLI, J. et al. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 1849-1857, 2016.
- BARRA, G. B. et al. [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

BARREIROS, A.; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BATTISTI, V. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomed Pharmacother**, v. 67, n. 3, p. 203-8, 2013.

BECKER, L. V. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Biochem**, v. 43, n. 13-14, p. 1096-100, 2010.

BIANCO, A. C. et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr Rev**, v. 23, n. 1, p. 38-89, 2002.

BIRK, A. V. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **J Lab Clin Med**, v. 140, n. 3, p. 166-75, 2002.

BOELAERT, K. et al. Older subjects with hyperthyroidism present with a paucity of symptoms and signs: a large cross-sectional study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 6, p. 2715-26, 2010.

BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochim Pol**, v. 53, n. 2, p. 269-78, 2006.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BRUNO, A. N. et al. Thyroid hormones alter the adenine nucleotide hydrolysis in adult rat blood serum. **Biofactors**, v. 37, n. 1, p. 40-5, 2011.

BRUNO, A. N. et al. 5'-nucleotidase activity is altered by hypo- and hyperthyroidism in platelets from adult rats. **Platelets**, v. 16, n. 1, p. 25-30, 2005.

BRUNO, A. N. et al. Hypothyroidism changes adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats in different phases of development. **Int J Dev Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 37-44, 2005.

BURCH, W. M. Basic Information about thyroid gland. In: Burch, W. M. **100 Questions & Answers about Thyroid Disorders**. Jones & Bartlett Publishers, 2009.

BURNSTOCK, G. Cotransmission. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 1, p. 47-52, 2004.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 12, p. 1471-83, 2007.

BURNSTOCK, G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. **Purinergic Signal**, v. 11, n. 4, p. 411-34, 2015.

BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 1, p. 102-92, 2014.

CAMACHO, P. M. Thyroid Disorders. In: Camacho, P. M. **Clinical Endocrinology & Metabolism**. London: Mason Publishing, 2011.

CAMARGO, R.Y.A., et al. Prevalence of chronic autoimmune thyroiditis in the urban area neighboring a petrochemical complex and a control area in Sao Paulo, Brazil. **Clinics**. v. 61, p.307-12, 2007.

CARAGEORGIU, H. et al. Changes in acetylcholinesterase, Na⁺,K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase activities in the frontal cortex and the hippocampus of hyper- and hypothyroid adult rats. **Metabolism**, v. 56, n. 8, p. 1104-10, 2007.

CARDOSO, A. M. et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. **Mol Cell Biochem**, v. 371, n. 1-2, p. 147-56, 2012.

CASTRO, M. R.; GHARIB, H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. **Ann Intern Med**, v. 142, n. 11, p. 926-31, 2005.

CHERUBINI, A. et al. Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 16, p. 2017-32, 2005.

CHO, S. Y. et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases andNF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Mol Cell Biochem**, v. 243, n. 1-2, p. 153-60, 2003.

COKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turkish Journal of Biochemistry**. v. 28, n. 2, 2003.

COLWELL, J. A.; NESTO, R. W. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. **Diabetes Care**, v. 26, n. 7, p. 2181-8, 2003.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. **Purinergic Signal**, v. 1, n. 2, p. 111-34, 2005.

DA COSTA, P. et al. Curcumin attenuates memory deficits and the impairment of cholinergic and purinergic signaling in rats chronically exposed to cadmium. **Environ Toxicol**, 2015.

DA SILVA, A. C. et al. Inhibition of NTPDase, 5'-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 7, p. 509-14, 2006.

DAJAS, F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 2, p. 383-96, 2012.

DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. **Purinergic Signal**, v. 3, n. 1-2, p. 1-3, 2007.

DIAMOND, S. L. et al. Systems biology of platelet-vessel wall interactions. **Front Physiol**, v. 4, p. 229, 2013.

DIAS, G. R. et al. Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats. **Physiol Behav**, v. 124, p. 116-22, 2014.

DIAS, G. R. et al. Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 30, n. 2, p. 83-9, 2012.

DMITRIEV, L. F.; TITOV, V. N. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. **Ageing Res Rev**, v. 9, n. 2, p. 200-10, 2010.

DONG, Y. S. et al. Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 3, p. 282-90, 2014.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. **N Engl J Med**, v. 367, n. 24, p. 2322-33, 2012.

FARACI, F. M.; LENTZ, S. R. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. **Stroke**, v. 35, n. 2, p. 345-7, 2004.

FAROMBI, E. O.; NWANKWO, J. O.; EMEROLE, G. O. The effect of modulation of glutathione levels on markers for aflatoxin B1-induced cell damage. **Afr J Med Med Sci**, v. 34, n. 1, p. 37-43, 2005.

FARWELL, A. P.; BRAVERMAN, L. E. Thyroid and antithyroid drugs. In: **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. v.56, cap. 39, 2006.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Med**, v. 36, n. 4, p. 327-58, 2006.

FUENTES, E.; PALOMO, I. Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. **Vascul Pharmacol**, 2015.

GIOVANNINI, C. et al. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 2, p. 118-28, 2008.

GIUSTARINI, D. et al. Low molecular mass thiols, disulfides and protein mixed disulfides in rat tissues: influence of sample manipulation, oxidative stress and ageing. **Mech Ageing Dev**, v. 132, n. 4, p. 141-8, 2011.

GODING, J. W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **J Leukoc Biol**, v. 67, n. 3, p. 285-311, 2000.

GRANNER, D. K. The diversity of endocrine system. In: MURRAY, R.K. et al., **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26^a. International edition: The McGraw-Hill Companies, 2003.

GRANT, N. The role of triiodothyronine-induced substrate cycles in the hepatic response to overnutrition: thyroid hormone as an antioxidant. **Med Hypotheses**, v. 68, n. 3, p. 641-9, 2007.

GUL, M. et al. Cellular and clinical implications of glutathione. **Indian J Exp Biol**, v. 38, n. 7, p. 625-34, 2000.

GUSSO, G.; LOPES, J. M. C. **Tratado de medicina de família e comunidade: princípios, formação e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

GUTIERRES, J. M. et al. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 33, p. 88-97, 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a. Rio de Janeiro: 2006.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-22, 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 3, p. 125-30, 2011.

HAM, J.; EVANS, B. A. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 3, p. 113, 2012.

HAMPL, R. et al. How short-term transdermal treatment of men with 7-oxo-dehydroepiandrosterone influence thyroid function. **Physiol Res**, v. 55, n. 1, p. 49-54, 2006.

HECHLER, B.; CATTANEO, M.; GACHET, C. The P2 receptors in platelet function. **Semin Thromb Hemost**, v. 31, n. 2, p. 150-61, 2005.

HUT, R. A.; VAN DER ZEE, E. A. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 466-80, 2011.

ICHIKI, T. Thyroid Hormone and Vascular Remodeling. **J Atheroscler Thromb**, 2015.

IDZKO, M. et al. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. **Blood**, v. 124, n. 7, p. 1029-37, 2014.

ILLES, P.; KLOTZ, K. N.; LOHSE, M. J. Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 362, n. 4-5, p. 295-8, 2000.

IRITI, M.; FAORO, F. Bioactivity of grape chemicals for human health. **Nat Prod Commun**, v. 4, n. 5, p. 611-34, 2009.

IWAKI-EGAWA, S.; NAMIKI, C.; WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 137, n. 2, p. 247-54, 2004.

JENA, S. et al. Induction of oxidative stress and inhibition of superoxide dismutase expression in rat cerebral cortex and cerebellum by PTU-induced hypothyroidism and its reversal by curcumin. **Neurol Sci**, v. 33, n. 4, p. 869-73, 2012.

JONES, D. D.; MAY, K. E.; GERACI, S. A. Subclinical thyroid disease. **Am J Med**, v. 123, n. 6, p. 502-4, 2010.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 3, p. 201-12, 2011.

KASHYAP, M. K. et al. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. **Mol Cell Biochem**, v. 277, n. 1-2, p. 89-99, 2005.

KAUFFENSTEIN, G. et al. NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. **Cardiovasc Res**, v. 85, n. 1, p. 204-13, 2010.

KAUFFENSTEIN, G. et al. The ecto-nucleotidase NTPDase1 differentially regulates P2Y1 and P2Y2 receptor-dependent vasorelaxation. **Br J Pharmacol**, v. 159, n. 3, p. 576-85, 2010.

KAWAI, Y. et al. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. **J Biol Chem**, v. 283, n. 14, p. 9424-34, 2008.

KIEHN, O. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 279-306, 2006.

KIM, J. S. et al. Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. **J Biol Chem**, v. 282, n. 48, p. 34787-800, 2007.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 239-67, 2004.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. **Circulation**, v. 116, p. 1725-35, 2007.

LARSEN, P. R. Insights from the 78(th) Annual Meeting of the American Thyroid Association. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v. 4, n. 4, p. 179, 2008.

LAVIERI, R. et al. TLR costimulation causes oxidative stress with unbalance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production. **J Immunol**, v. 192, n. 11, p. 5373-81, 2014.

LENDVAI, B.; VIZI, E. S. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 333-49, 2008.

LONGMORE, M. Endocrinologia. In: (Ed.). Manual Oxford de Medicina Clinica. **7^a Euromédice**. p.188-225, 2007.

LUNKES, G. I. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 65, n. 1, p. 1-6, 2004.

MAIA, A. L. et al. The Brazilian consensus for the diagnosis and treatment of hyperthyroidism: recommendations by the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 57, n. 3, p. 205-32, 2013.

MALDONADO, P. A. et al. Nucleotide degrading enzymes in platelets from uterine cervical neoplasia patients treated with conization or radiotherapy. **Biomed Pharmacother**, v. 64, n.7, p. 499-504, 2010.

MALMSJO, M.; EDVINSSON, L.; ERLINGE, D. P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. **Eur J Pharmacol**, v. 390, n. 1-2, p. 173-80, 2000.

MARTINS, C. C. et al. Regular exercise training reverses ectonucleotidase alterations and reduces hyperaggregation of platelets in metabolic syndrome patients. **Clin Chim Acta**, v. 454, p. 66-71, 2016.

MARUNAKA, Y. et al. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

MAY, J. M. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. **Subcell Biochem**, v. 56, p. 85-103, 2012.

MAYER, O., JR. et al. Hypothyroidism in coronary heart disease and its relation to selected risk factors. **Vasc Health Risk Manag**, v. 2, n. 4, p. 499-506, 2006.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J Nutr**, v. 133 Suppl 3, p. 933S-940S, 2003.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2012, p. 728983, 2012.

MEIKLE, C. K. et al. Cancer and Thrombosis: The Platelet Perspective. **Front Cell Dev Biol**, v. 4, p. 147, 2016.

MESULAM, M. M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-39, 2002.

MEYER, E. Expressão das iodotironinas deiodases nas neoplasias tireoidianas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 5, 2007.

MORRIS, M. S. et al. Hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia associated with hypothyroidism in the third US National Health and Nutrition Examination Survey. **Atherosclerosis**, v. 155, n. 1, p. 195-200, 2001.

MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Arch Biochem Biophys**, v. 417, n. 1, p. 12-7, 2003.

NANDA, N.; BOBBY, Z.; HAMIDE, A. Association of thyroid stimulating hormone and coronary lipid risk factors with lipid peroxidation in hypothyroidism. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, n. 5, p. 674-9, 2008.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 4, p. 418-25, Oct 2001.

NOGUEIRA, C. R. et al. Hipotireoidismo: Diagnóstico. **Diretrizes clínicas na saúde suplementar: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo**, 2011.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-312, 2001.

OYARZUN, C. et al. Adenosine contribution to normal renal physiology and chronic kidney disease. **Mol Aspects Med**, 2017.

PASHEVIN, D. A. et al. Antiatherogenic effect of quercetin is mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes. **Pharmacol Rep**, v. 63, n. 4, p. 1009-18, 2011.

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia - RMCT**, V. XXVIII, 2011.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 3, p. 570S-578S, 2003.

PROCHAZKOVA, D.; BOUSOVA, I.; WILHELMOVA, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-23, 2011.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News Perspect**, v. 16, n. 3, p. 133-40, 2003.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale's Pharmacology**. 7ª. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAZAVI, S. M. et al. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 1-15, 2008.

REDON, J. et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. **Hypertension**, v. 41, n. 5, p. 1096-101, 2003.

REID, R. E. et al. Thyroxine replacement in an animal model of congenital hypothyroidism. **Physiol Behav**, v. 91, n. 2-3, p. 299-303, 2007.

RHOADES, R. A.; TANNER, G. A. **Fisiologia Médica**. v. 2. Guanabara Koogan, 2005.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 2, p. 409-30, 2006.

SALLES, II et al. Inherited traits affecting platelet function. **Blood Rev**, v. 22, n. 3, p. 155-72, 2008.

SANTI, A. et al. Effects of quercetin on oxidative stress biomarkers in methimazole - induced hypothyroid rats. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 122, n. 9, p. 533-9, 2014.

SANTI, A. et al. Association between thyroid hormones, lipids and oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism. **Clin Chem Lab Med**, v. 48, n. 11, p. 1635-9, 2010.

SCHETINGER, M. R. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007.

SCHMATZ, R. et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem Biophys**, v. 65, n. 2, p. 129-43, 2013.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, v. 94, n. 2, p. 374-83, 2012.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci**, v. 84, n. 11-12, p. 345-50, 2009.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO, J. E., JR.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 264-74, 2011.

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochim Pol**, v. 53, n. 3, p. 539-46, 2006.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem J**, v. 360, n. Pt 1, p. 1-16, 2001.

SIKORA, T. Highly Sensitive Detection of Organophosphate Insecticides Using Biosensors Based on Genetically Engineered Acetylcholinesterase and Poly (3,4-Ethylenedioxythiophene). **Journal of Sensors**, v. 2011.

SILVA, A. et al. Principais distúrbios tireoidianos e suas abordagens na atenção primária à saúde. **Revista da AMRIGS**, v. 55, n. 4, 2011.

SILVEIRA, G. F.; BUFFON, A.; BRUNO, A. N. New approaches to thyroid hormones and purinergic signaling. **J Thyroid Res**, v. 2013, p. 434727, 2013.

SOLEAS, G. J. et al. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. **Clin Biochem**, v. 35, n. 2, p. 119-24, 2002.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SPANVELLO, R. M. et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **J Neurol**, v. 257, n. 1, p. 24-30, 2010.

SQUIZZATO, A. et al. Clinical review: Thyroid dysfunction and effects on coagulation and fibrinolysis: a systematic review. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 7, p. 2415-20, 2007.

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p. 1105-12, 2004.

STATHATOS, N. Thyroid physiology. **Med Clin North Am**, v. 96, n. 2, p. 165-73, 2012.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 10, p. 542-50, 2005.

STEFAN, C. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 2, p. 361-70, 2006.

STEFANELLO, N. et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nutr Biochem**, v. 38, p. 145-153, 2016.

STOICA, G. et al. Inherited tertiary hypothyroidism in Sprague-Dawley rats. **Brain Res**, v. 1148, p. 205-16, 2007.

STUIJVER, D. J. et al. The effect of hyperthyroidism on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors: a systematic review and meta-analysis. **Thromb Haemost**, v. 108, n. 6, p. 1077-88, 2012.

TIERNEY, K. et al. Thyroid function and autoantibody status among women who spontaneously deliver under 35 weeks of gestation. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 71, n. 6, p. 892-5, 2009.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369-75, 2003.

VALERIO, D. A. et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **J Nat Prod**, v. 72, n. 11, p. 1975-9, 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANDERPUMP, M. P. The epidemiology of thyroid disease. **Br Med Bull**, v. 99, p. 39-51, 2011.

VASILOPOULOU, C. G. et al. Effect of adult onset hypothyroidism on behavioral parameters and acetylcholinesterase isoforms activity in specific brain regions of male mice. **Physiol Behav**, v. 164, n. Pt A, p. 284-91, 2016.

WANG, N. et al. Effects of thyroxine and donepezil on hippocampal acetylcholine content and syntaxin-1 and munc-18 expression in adult rats with hypothyroidism. **Exp Ther Med**, v. 7, n. 3, p. 529-536, 2014.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 4, p. 211-7, 2006.

WHITE, S. S. Hypothyroidism. In: (Ed.). *Thyroid Disease – Understanding Hypothyroidism and Hyperthyroidism.*: **Harvard Health Publications**, p.14-30, 2010.

WOEBER, K. A. Update on the management of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Arch Fam Med**, v. 9, n. 8, p. 743-7, 2000.

WU, X. et al. Efficacy and safety of methimazole ointment for patients with hyperthyroidism. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 36, n. 3, p. 1109-12, 2013.

XIE, H. Q. et al. Regulation of a transcript encoding the proline-rich membrane anchor of globular muscle acetylcholinesterase. The suppressive roles of myogenesis and innervating nerves. **J Biol Chem**, v. 282, n. 16, p. 11765-75, 2007.

YAMAMOTO, Y.; OUE, E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 70, n. 4, p. 933-9, 2006.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 59, n. 3, p. 113-22, 2004.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim Biophys Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-94, 2008.

ZANINI, D. et al. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. **Mol Cell Biochem**, v. 374, n. 1-2, p. 137-48, 2013.

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 1, p. 40-5, 2012.

ZAVIALOV, A. V. et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 2, p. 279-90, 2010.

ZHU, X. et al. Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. **J Neurol Sci**, v. 257, n. 1-2, p. 240-6, 2007.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. **Cell Tissue Res**, v. 326, n. 2, p. 655-69, 2006.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.

ZIZKOVA, P. et al. Novel quercetin derivatives: From redox properties to promising treatment of oxidative stress related diseases. **Chem Biol Interact**, 2017.

ANEXO I

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS E DO PERFIL OXIDATIVO EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CAUSADO POR TIREOIDECTOMIA

Pesquisador: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Versão: 2

CAAE:

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

02121712.2.0000.534

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 30850

Data da Relatoria: 30/05/2012

Apresentação do Projeto:

O câncer de tireoide é o mais comum dos cânceres do sistema endócrino e ocorre em todas as faixas etárias, atingindo na sua maioria mulheres acima de 35 anos. O tratamento mais comum é a remoção da glândula por meio de cirurgia, seguida por terapia com iodo radioativo. O hipotireoidismo pode se desenvolver, espontaneamente, semanas ou anos após uma tireoidectomia. Os pacientes não são mais capazes de produzir hormônios tireoidianos e o hormônio T4 (tiroxina) cai a níveis muito baixos levando o organismo a funcionar de maneira mais lenta. Em adultos, o hipotireoidismo pode levar a uma significativa redução de seu desempenho físico e mental, além de poder causar elevação dos níveis de colesterol, que aumentam as chances de problemas cardíacos.

Pelo fato de as enzimas que hidrolisam nucleotídeos mediar muitos aspectos da função celular, desde o controle dos eventos pró-agregatórios até processos pró-inflamatórios e, em razão da importância do estresse oxidativo em associação a alterações clínicas, considera-se relevante a avaliação destes dois aspectos das funções celulares em um grupo de pacientes com hipotireoidismo decorrente de tireoidectomia. O objetivo deste trabalho é avaliar a hidrólise de nucleotídeos e o perfil oxidativo, em amostras de sangue, dos pacientes com hipotireoidismo pós tireoidectomia, atendidos no Serviço de Medicina Nuclear de Santa Maria.

Serão feitas análises, em amostras de sangue, para a determinação da atividade enzimática da NTPDase, da 5'-nucleotidase e da adenosina desaminase, assim como, avaliação da expressão enzimática por citometria de fluxo, além de verificação da ação antioxidante da enzima Glutathione S-Transferase, determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de outros marcadores de estresse oxidativo. Pretende-se também, estabelecer correlações entre o desenvolvimento da doença e a exposição prévia a fatores de risco. Os resultados serão publicados em artigos científicos e congressos relacionados ao assunto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliar a atividade e expressão das enzimas que hidrolisam nucleotídeos e o perfil oxidativo em pacientes com câncer de tireoide e hipotireoidismo após tireoidectomia.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e ADA em pacientes com câncer de tireoide e hipotireoidismo após tireoidectomia e os efeitos do tratamento sobre a atividade destas enzimas.
- Avaliar a expressão das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase através de técnica de PCR.
- Avaliar indicadores do perfil oxidante e antioxidante nos referidos pacientes e verificar os efeitos do tratamento antineoplásico e de reposição hormonal sobre esses indicadores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos do projeto são os inerentes a uma coleta de sangue e no protocolo apresentado toma todas as providencias para prevenir esses riscos. Os benefícios não serão direto aos sujeitos de pesquisa

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As adequações feitas na nova versão parecem adequadas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão de acordo com as normas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar nova versão

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 02 de Junho de 2012

Assinado por:

Félix Alexandre Antunes Soar

ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Efeito da quercetina na hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina em plaquetas e sinaptossoma cerebral e no perfil oxidativo de ratos com hipotireoidismo".

Número do Parecer: 083/2012

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 19/09/2013.

Santa Maria, 19 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM