

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

Adriel Antonio Schirmann

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO DE PURINAS EM
CORAÇÃO DE RATOS TRATADOS COM QUERCETINA EM UM MODELO
DEPRESSÃO-LIKE**

Santa Maria, RS

2023

Adriel Antonio Schirmann

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO DE PURINAS EM
CORAÇÃO DE RATOS TRATADOS COM QUERCETINA EM UM MODELO
DEPRESSÃO-LIKE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Química Bacharelado da Universidade
Federal de Santa Maria como requisito parcial
para obtenção do título de **Bacharel em Química**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Maria Melchiors Morsch

Santa Maria, RS

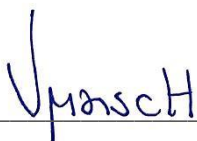
2023

Adriel Antonio Schirmann

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO DE PURINAS EM
CORAÇÃO DE RATOS TRATADOS COM QUERCETINA EM UM MODELO
DEPRESSÃO-LIKE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Química Bacharelado da Universidade
Federal de Santa Maria como requisito parcial
para obtenção do título de **Bacharel em
Química.**

Aprovado em 15 de dezembro de 2023.



Vera Maria Melchiors Morsch, Dr.^a (UFSM)
(Orientadora)



Charles Elias Assmann, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2023

PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO DE PURINAS EM CORAÇÃO DE RATOS TRATADOS COM QUERCETINA EM UM MODELO DEPRESSÃO-LIKE

Adriel A. Schirmann¹, Vitor B. Mostardeiro¹, Vera M. M. Morsch¹.

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Sede, Distrito de Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

RESUMO

Objetivo: A desordem depressiva maior, mais conhecida como depressão, um transtorno que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo, vem sendo associada, no âmbito bioquímico com o aumento do estresse oxidativo e a ativação das vias inflamatórias, e tais parâmetros podem vir a gerar problemas cardiovasculares. A quercetina, um flavonoide facilmente encontrado em diversas plantas presentes na alimentação humana diária, possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Com isso, esse composto poderia vir a ser um adjuvante para o tratamento de tais complicações.

Métodos: 30 ratos Wistar machos (n=30) foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, induzidos ao estresse de contenção e tratados com quercetina e tranilcipromina. Após 45 dias de tratamento os animais foram eutanasiados, e foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo e o metabolismo de purinas no tecido cardíaco.

Resultados: Os resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de TBARS no grupo submetido ao estresse, indicando uma resposta exacerbada ao estresse depressivo, enquanto a quercetina demonstrou eficácia em atenuar esse aumento. A atividade da CAT aumentou no grupo estresse, sugerindo uma resposta adaptativa, a atividade também se elevou no grupo tratado com quercetina 50 mg/kg, em comparação com o grupo controle e estresse como possível efeito antioxidante. A hidrólise de ATP e ADP apresentou aumentos no grupo estresse, associando-se a processos inflamatórios e doenças cardiovasculares, com a quercetina demonstrando redução significativa nos níveis de hidrólise de ATP. A elevação na atividade da ADA no grupo estresse destaca a possível depleção de adenosina, contribuindo para alterações no sistema purinérgico.

Conclusão: Este estudo fornece novas perspectivas sobre os efeitos potenciais da quercetina em um modelo de depressão-like em ratos, indicando sua capacidade de modular o estresse oxidativo e o metabolismo de purinas no coração. Os resultados apontam para a relevância terapêutica da quercetina, destacando a necessidade de investigações mais aprofundadas para compreender totalmente seus mecanismos de ação e validar seu potencial terapêutico em contextos clínicos específicos.

Palavras Chave: Depressão; Quercetina; Coração; Estresse Oxidativo; Metabolismo de Purinas.

OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND PURINE METABOLISM IN THE HEART OF RATS TREATED WITH QUERCETIN IN A DEPRESSION-LIKE MODEL

Adriel A. Schirmann¹, Vitor B. Mostardeiro¹, Vera M. M. Morsch¹.

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology - Center for Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi District, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

ABSTRACT

Objective: Major depressive disorder, commonly known as depression, a condition affecting millions of people worldwide, has been biochemically associated with increased oxidative stress and activation of inflammatory pathways, which may lead to cardiovascular problems. Quercetin, a flavonoid readily found in various plants present in daily human diet, possesses antioxidant and anti-inflammatory properties. Therefore, we hypothesized that this compound could serve as an adjunct in the treatment of such complications.

Methods: Thirty male Wistar rats (n=30) were randomly divided into 6 groups, induced with restraint stress and treated with quercetin and tranylcypromine. After 45 days of treatment, the animals were sacrificed, and oxidative stress parameters and purine metabolism were assessed in cardiac tissue.

Results: The results revealed a significant increase in TBARS levels in the stress-induced group, indicating an exacerbated response to depressive stress, while quercetin demonstrated efficacy in attenuating this increase. CAT activity increased in the stress group, suggesting an adaptive response. It is noteworthy that this activity also elevated in the quercetin-treated group (50 mg/kg), compared to the control and stress groups, indicating a potential antioxidant effect. ATP and ADP hydrolysis showed increases in the stress group, associated with inflammatory processes and cardiovascular diseases, with quercetin demonstrating a significant reduction in ATP hydrolysis levels. The rise in ADA activity in the stress group highlights the possible depletion of adenosine, contributing to alterations in the purinergic system.

Conclusion: This study provides valuable insights into the potential effects of quercetin in a depression-like model in rats, indicating its ability to modulate oxidative stress and purine metabolism in the heart. The results point to the therapeutic relevance of quercetin, emphasizing the need for further investigations to fully understand its mechanisms of action and validate its therapeutic potential in specific clinical contexts.

Keywords: Depression; Quercetin; Heart; Oxidative Stress; Purine Metabolism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1 Materiais	10
2.2 Animais	10
2.3 Grupos	10
2.4 Indução do modelo de depressão-like	10
2.5 Tratamentos de Quercetina e Tranilcipromina	11
2.6 Eutanásia e Coleta das Amostras de Coração	11
2.7 Determinação de Proteínas	11
2.8 Parâmetros de Estresse Oxidativo no Coração	12
2.8.1 Peroxidação Lipídica	12
2.8.2 Proteína Carbonil	12
2.8.3 Espécies Reativas	12
2.8.4 Tióis Totais	12
2.8.5 Ensaio da Enzima Catalase	13
2.8.6 Ensaio da Enzima Glutathione S-Transferase	13
2.9 Metabolismo de Purinas	13
2.9.1 Ensaio enzimático da Ecto-Nucleoídeo Trifosfato Difosfohidrolase	13
2.9.2 Ensaio enzimático da Ecto-5'-Nucleotidase	13
2.9.3 Ensaio Enzimático Adenosina Desaminase	14
2.10 Análises Estatísticas	14
3. RESULTADOS	14
3.1 Parâmetros de Estresse Oxidativo	14
3.2 Enzimas Antioxidantes	16
3.3 Metabolismo de Purinas	16
4. DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	20
6. REFERÊNCIAS	22
7. AGRADECIMENTOS	27
8. ANEXOS	28

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM), comumente conhecido como depressão, é um transtorno mental complexo que envolve fatores bioquímicos, genéticos, psicológicos e ambientais. Dentre as doenças psiquiátricas é considerada uma das mais graves, apresentando sintomas que interferem no dia a dia das pessoas afetadas (OTTE et al., 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 280 milhões de pessoas no mundo sofrem de depressão e mais de 700.000 pessoas morrem por suicídio todo ano, sendo esta a quarta principal causa de morte entre jovens de 15 a 29 anos (OMS, 2023). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, a prevalência de depressão ao longo da vida, está em cerca de 15,5% (Ministério da Saúde, 2023).

A recente pandemia de SARS-CoV-2 (COVID-19) além de impactos físicos como anosmia, alterações do paladar, inflamação, vasoconstrição entre outros mais graves (JAIN, 2020) contribuiu para o aumento dos casos de ansiedade e depressão ao redor do mundo. Há estudos psicológicos e meta-análises descrevendo a relação de tais sintomas, há evidências também de um aumento significativo de raiva, confusão, estresse e ansiedade em pessoas que são mantidas em isolamento. (BROOKS et al., 2020; ON KWOK; SERDARI; SANI, 2021).

No âmbito bioquímico, pesquisas sugerem que desequilíbrios nos neurotransmissores, como serotonina, noradrenalina e dopamina, estão ligados aos sintomas depressivos, como humor deprimido e ansiedade (BELMAKER; AGAM, 2008). Os níveis aumentados de espécies reativas e a diminuição das defesas antioxidantes também vem sendo descrita em casos depressivos (MAES et al., 2011) da mesma forma, à medida que o aumento das espécies reativas ocorre, observa-se a ativação das vias de sinalização pró-inflamatórias (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015).

O sistema purinérgico, descrito por Geoffrey Burnstock na década de 70, é um complexo sistema de sinalização celular que engloba nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Nucleotídeos, como o ATP, são liberados extracelularmente, desempenhando o papel de mensageiros. A adenosina, derivada do ATP, também é significativa nesse contexto. Os receptores purinérgicos incluem P1 (tem como

agonista a adenosina) e P2 (tem como agonistas nucleotídeos, a exemplo do ATP, subdivididos em P2X e P2Y). Enzimas como a ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) são cruciais no metabolismo das purinas, convertendo ATP e ADP em AMP, a 5'-nucleotidase converte AMP em adenosina, e a Adenosina Desaminase converte adenosina em inosina (CARDOSO et al., 2021).

No que tange as vias inflamatórias, o sistema purinérgico desempenha um papel decisivo na regulação de moléculas inflamatórias e sobre o sistema imune, representando assim, um importante alvo para investigações. Além disso, Burnstock demonstrou a relação da sinalização purinérgica no sistema cardiovascular (BURNSTOCK, 2017). Já há relatos também que o sistema purinérgico pode desempenhar um papel na fisiopatologia dos transtornos de humor (BARTOLI et al., 2020; KRÜGEL, 2016)

Conjuntamente já foi demonstrado uma prevalência do TDM relacionado com a patogênese de doenças cardiovasculares (CARNEY; FREEDLAND, 2016). Indivíduos diagnosticados com outras doenças mentais graves como esquizofrenia e transtorno bipolar também foram associados com o aumento do risco para o desenvolvimento de doenças coronárias, demonstrando a importância do entendimento dos efeitos sobre o sistema cardiovascular (DE HERT; DETRAUX; VANCAMPFORT, 2018). Apesar de muitas hipóteses, revisões e meta-análises, ainda se faz necessário mais investigações dos níveis de espécies reativas e as vias de inflamação associando doenças cardiovasculares com a depressão. O sistema purinérgico vem como alvo de estudo, podendo melhor evidenciar uma possível relação entre doenças cardiovasculares e transtorno depressivo maior.

Embora existam meios para atenuar e tratar os sintomas depressivos, como o uso de antidepressivos, é crucial reconhecer também os efeitos adversos que estes podem trazer, podendo variar de sintomas leves a desafios significativos (SPINDELEGGER et al., 2015; BEHLKE; LENZE; CARNEY, 2020). É evidente também uma crescente procura por terapias complementares de origem natural. Neste ponto, a quercetina é um flavonóide encontrado em uma variedade de plantas, como alcaparras e cebolas, entre outros, presentes na dieta, e sua ingestão diária em populações ocidentais está na faixa de 20-50 mg/dia (KELLY, 2011; BENTZ, 2017; ALIZADEH; EBRAHIMZADEH, 2022)

Além disso, já foi demonstrado que esta molécula atua sobre a enzima monoamina oxidase (MAO) inibindo-a, inclusive agindo sobre suas duas isoformas MAO-A MAO-B, afetando assim, a disponibilidade de monoaminas no Sistema Nervoso Central (SNC) (DHIMAN et al., 2019), o que vem a relacionar seu possível efeito protetor sobre a depressão. Há estudos indicando sua atuação sobre complicações cardiovasculares e também sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, possibilitando assim, uma provável relação com o sistema purinérgico (ERLUND, 2004; GUARDIA et al., 2001; LI et al., 2016).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os produtos químicos e reagentes utilizados neste estudo, incluindo a quercetina, reagente de Bradford, TWEEN® 20, nucleotídeos, adenosina, 2,4-Dinitrofenilhidrazina, ácido tricloroacético (TCA), molibdato de amônia, verde malaquita foram obtidos da Sigma-Aldrich.

2.2 Animais

Trinta ratos Wistar machos adultos (200-300 g; 45-60 dias de idade) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) sob ciclo claro/escuro de 12 horas com comida e água disponível *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria, sob o protocolo número 3315241022.

2.3 Grupos

Os grupos foram divididos aleatoriamente na seguinte forma:

Grupo 1: Grupo Controle/TWEEN 3% (C);

Grupo 2: Estresse de Contenção (S);

Grupo 3: Quercetina 50 mg/kg (Q);

Grupo 4: Quercetina 50 mg/kg + Estresse de Contenção (Q+S);

Grupo 5: Tranilcipromina (10 mg/kg) + Estresse de Contenção (T+S);

Grupo 6: Quercetina 50 mg/kg + Tranilcipromina (10 mg/kg) + Estresse de Contenção (Q+T+S).

2.4 Indução do modelo de depressão-like

Para a indução do modelo de estresse depressão-like os animais foram submetidos a contenção física como já relatado por (CUNHA et al., 2006) e (XAVIER FARIA et al., 2021), permanecendo imobilizados durante 4 horas por 14 dias consecutivos. Os animais foram realocados para uma sala livre de ruídos e ficaram contidos individualmente de maneira a permanecerem imobilizados em recipientes de plástico medindo 25 cm x 7 cm com orifícios de 1 cm de diâmetro para a respiração. Os animais do grupo controle também foram manuseados no mesmo horário e

levados para a sala de comportamento, porém estes não sofreram a imobilização e permaneceram alocados na mesma caixa.

2.5 Tratamentos de Quercetina e Tranilcipromina

Os animais receberam a dose de quercetina de 50 mg/kg dissolvida em TWEEN 3% baseado em (DE MATTOS et al., 2020; GORBENKO et al., 2021; PEREIRA BRAGA et al., 2012) e o tratamento foi realizado via gavagem durante 45 dias consecutivos. A administração do Tranilcipromina (10 mg/kg/dia) seguindo (GREENSHAW et al., 1988; MALYSZKO, et al., 1994; DE SOUSA TOMAZ et al., 2020) foi também realizada via gavagem. A utilização desse fármaco foi baseada em sua atuação na inibição direta da MAO, já descrito na literatura por Lemere (1960). Os animais do grupo controle também foram submetidos a gavagem recebendo apenas o veículo (solução de TWEEN 3%).

2.6 Eutanásia e Coleta das Amostras de Coração

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com isoflurano a uma concentração de $\pm 5\%$ e eutanasiados por exsanguinação, e o coração coletado para análises posteriores.

2.7 Determinação de Proteínas

Os níveis de proteínas foram determinados de acordo com o método de (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina como proteína padrão. As amostras de coração foram homogeneizadas em salina (solução de NaCl 0,9%) na diluição de 1:10 com volume final de 2 mL, as amostras de tecido (coração total) foram pesadas em mais ou menos 0,2 g e homogeneizadas no gelo em 1,8 mL de salina e centrifugadas a 1800 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante coletado para a determinação de proteínas e análises posteriores.

2.8 Parâmetros de Estresse Oxidativo no Coração

2.8.1 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica no tecido cardíaco foi estimada medindo as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malondialdeído (MDA a 532 nm), pelo método de (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979) com modificações. Os resultados foram expressos como nmol MDA/mg de proteína.

2.8.2 Proteína Carbonil

A oxidação de proteínas no coração foi determinada de acordo com o método descrito por (LEVINE et al., 1990). O método baseia-se na quantificação da oxidação de proteínas pela reação dos grupos carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido. A intensidade da cor do sobrenadante foi medida a 370 nm e expressa como nmol carbonil/mg de proteína.

2.8.3 Espécies Reativas

Para a determinação de espécies reativas (ER), seguiu-se a técnica descrita por (ALI; LEBEL; BONDY, 1992) onde as amostras foram incubadas com 20 µL de 2'-7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). A oxidação de DCFH-DA em diclorofluoresceína (DCF) foi determinada por fluorescência na emissão de 525 e excitação de 488 nm em um intervalo de tempo de 50 min após a adição do DCFH-DA no meio. Os resultados foram expressos em U DCFH-DA/mg de proteína.

2.8.4 Tióis Totais

Os níveis totais de tiol foram determinados de acordo com (ELLMAN et al., 1961). Para calcular os níveis de tióis não proteicos (NPSH), 150 µL do sobrenadante de proteínas foram misturados com 150 µL de ácido tricloroacético a 10% (v/v) e, em seguida, centrifugados a 2000 g por 10 minutos. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi utilizado para a análise. O ensaio colorimétrico foi conduzido em um tampão fosfato de 1 M com pH 7,4 e leitura em 412 nm. Os resultados foram quantificados e expressos como mmol de grupos sulfidrilos por miligrama de proteína.

2.8.5 Ensaio da Enzima Catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada através da técnica descrita por (NELSON; KIESOW, 1972), onde acompanha-se por espectrofotometria, o decaimento do peróxido de hidrogênio, podendo assim, mensurar indiretamente a atividade da enzima. A atividade foi expressa em U CAT/mg proteína.

2.8.6 Ensaio da Enzima Glutathiona S-Transferase

O ensaio enzimático de Glutathiona S-Transferase (GST) foi realizado conforme descrito por (HABIG et al., 1974). A reação foi iniciada pela adição do substrato de GST e observada no comprimento de onda de 340 nm em um intervalo de tempo de 2 min após a incubação 37°C. A atividade foi expressa como $\mu\text{mol/CDNB/min/mg}$ de proteína.

2.9 Metabolismo de Purinas

2.9.1 Ensaio enzimático da Ecto-Nucleoídeo Trifosfato Difosfohidrolase.

Para a determinação da atividade da enzima NTPDase1 (CD39) a hidrólise do ATP e ADP utilizou-se a técnica já descrita por Leal et al., (2005) e Schetinger et al., (1995). O sistema reacional continha glicose 6 mM, KCl 5 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, tampão Tris-HCl 250 mM, pH 7,4 e 20 μL da amostra em um volume final de 220 μL . Após pré-incubação a 37 ° C por 10 min, os substratos ATP ou ADP (1 mM) foram adicionados para iniciar a reação e incubados por mais 30 min. Em seguida, as reações foram interrompidas pela adição de 150 μL de TCA 15% e o método colorimétrico com verde malaquita e KH₂PO₄ como padrão foi utilizado para determinar o fosfato inorgânico (Pi) liberado. Os resultados foram expressos como nmol Pi/min/mg de proteína.

2.9.2 Ensaio enzimático da Ecto-5'-Nucleotidase

A hidrólise de AMP foi observada a partir da atividade da enzima 5'-nucleotidase 5'-NT (CD73) utilizando-se da técnica de Heymann et al., (1984) e o sistema reacional já mencionado anteriormente para as demais enzimas, porém

utilizando substrato de AMP (2 mM). Os resultados foram expressos como nmol Pi/min/mg de proteína.

2.9.3 Ensaio Enzimático Adenosina Desaminase

A atividade da enzima Adenosina Desaminase (ADA) foi determinada por espectrofotometria de acordo com o método já descrito por (GIUSTI G; GALANTI B, 1984), a qual se baseia na medição direta da amônia produzida pela ADA, com modificações. Os resultados foram expressos em U/mg, onde uma unidade de U expressa a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de amônia por minuto da adenosina sob condições de ensaio padrão.

2.10 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada por comparação de grupos usando análise de variância de uma via ANOVA, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. O software GraphPad Prism foi utilizado para todas as comparações.

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros de Estresse Oxidativo

Os níveis de TBARS nas amostras de coração (Fig. 1A) demonstraram um aumento significativo no grupo submetido ao S ($p < 0,0001$) em comparação com o C. Os grupos Q+S ($p < 0,0184$), T+S ($p < 0,0001$) e Q+T+S ($p < 0,0015$) também demonstraram aumento em relação ao grupo controle. O grupo quercetina demonstrou uma diminuição dos níveis de TBARS em relação ao grupo estresse ($p < 0,0001$). A oxidação de proteínas (Fig. 1B) não apresentou resultados significativos em nenhum grupo. A determinação de espécies reativas, ER (Fig. 1C), assim como a oxidação de proteínas não demonstrou resultados significativos.

Os níveis de Tióis totais (Fig. 2A) demonstraram um aumento significativo do grupo quercetina em relação ao grupo controle ($p < 0,0112$). Os níveis de Tióis não proteicos (Fig. 2B) não demonstraram resultados significativos em nenhum dos grupos.

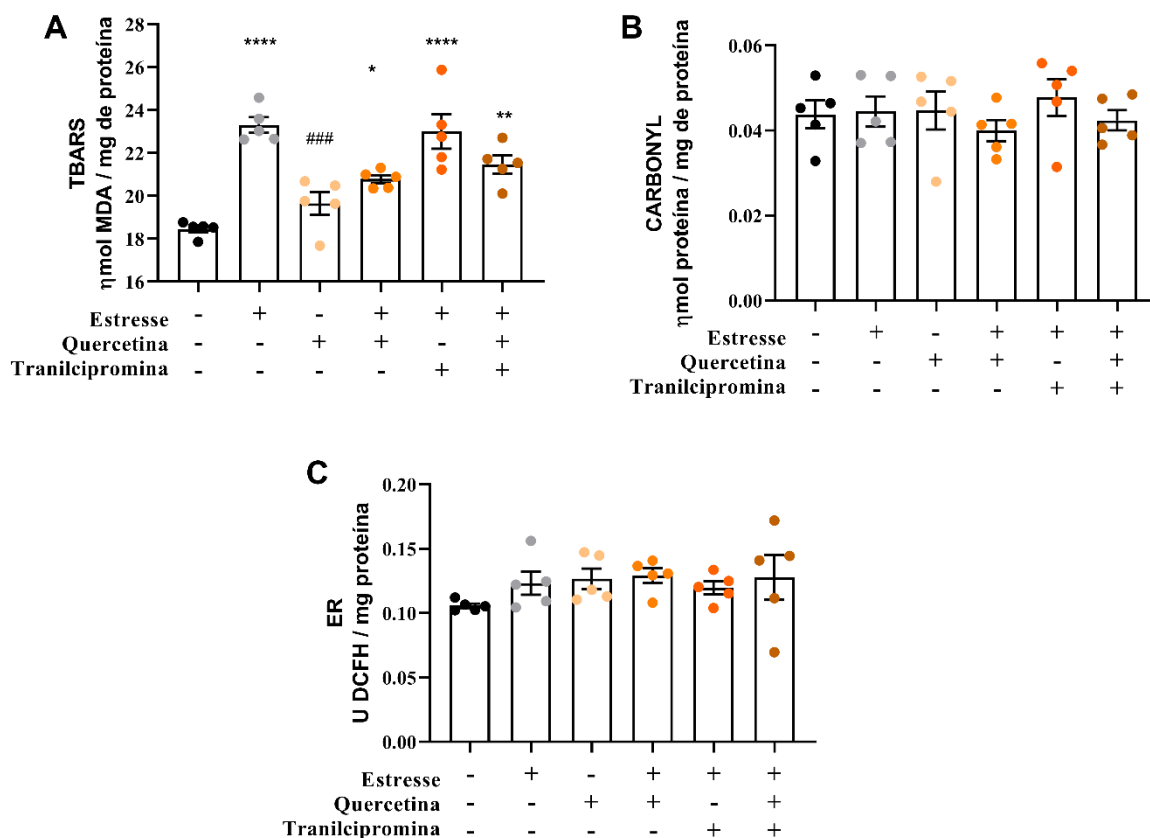


Fig. 1 Ensaio de TBARS (A) ($n = 5$), ($p < 0,0001$) na comparação do grupo estresse ao grupo controle, indicado por *, o grupo quercetina demonstrou resultados significativos em relação ao estresse representado por #. Os ensaios de Carbonil (B) ($n = 5$) e Espécies Reativas (C) ($n = 5$) não demonstraram resultados significativos em nenhum dos grupos. Os resultados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey. A média foi expressa em \pm SEM.

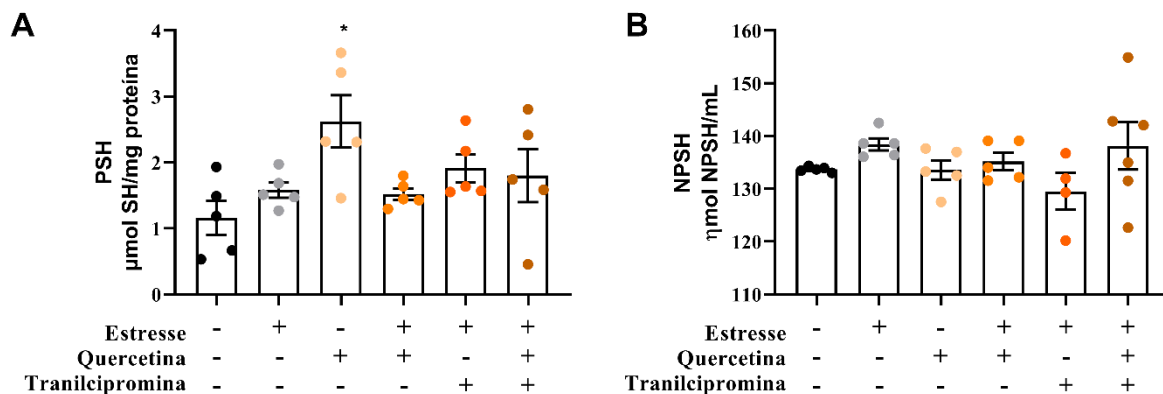


Fig. 2 Ensaio de tióis totais (A) ($n = 5$), demonstraram resultados significativos quando comparado grupo Quercetina 50 mg/kg ao grupo controle ($p < 0,0112$). O ensaio de tióis não proteicos (B) ($n = 5$) não demonstrou resultados significativo em nenhum dos grupos. Os resultados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey. A média foi expressa em \pm SEM.

3.2 Enzimas Antioxidantes

A atividade da CAT (Fig. 3A) demonstrou um aumento significativo ($p < 0,0140$) no grupo Estresse em relação ao grupo Controle. O grupo Quercetina ($p < 0,0001$), demonstrou um aumento significativo em relação ao grupo Estresse (S) e também em relação ao grupo controle ($p < 0,012$).

A atividade da enzima Glutathione S-Transferase não demonstrou resultado significativo em nenhum dos grupos.

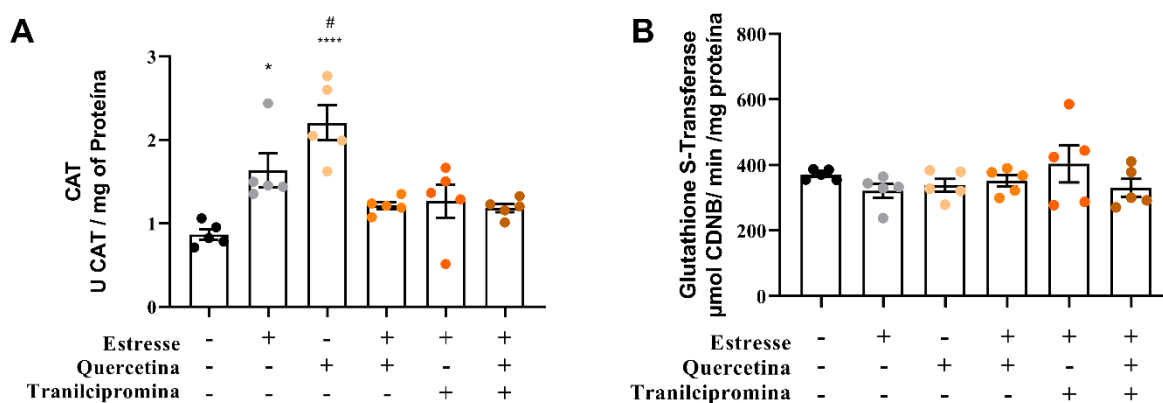


Fig. 3 A atividade de CAT (A) ($n = 5$) no coração dos ratos demonstrou resultados significativos em relação ao grupo controle expressos por * e em relação ao grupo estresse expressos por #. A atividade da Glutathione S-Transferase ($n = 5$) não demonstrou resultados significativos em nenhum dos grupos. Os resultados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey e a média foi expressa em \pm SEM.

3.3 Metabolismo de Purinas

A atividade da enzima NTPDase foi verificada através da hidrólise do ATP (Fig. 4A) e ADP (Fig. 4B) os níveis de ATP se mostraram significativos com um aumento no grupo Estresse em relação ao grupo Controle ($p < 0,0499$). A hidrólise do ADP aumentou significativamente no grupo S ($p < 0,0001$), e no grupo T+S ($p < 0,0487$) ambos em relação ao C. Uma diminuição significativa foi verificada nos grupos Q ($p < 0,0138$) e Q+T+S ($p < 0,0223$) em relação ao grupo S.

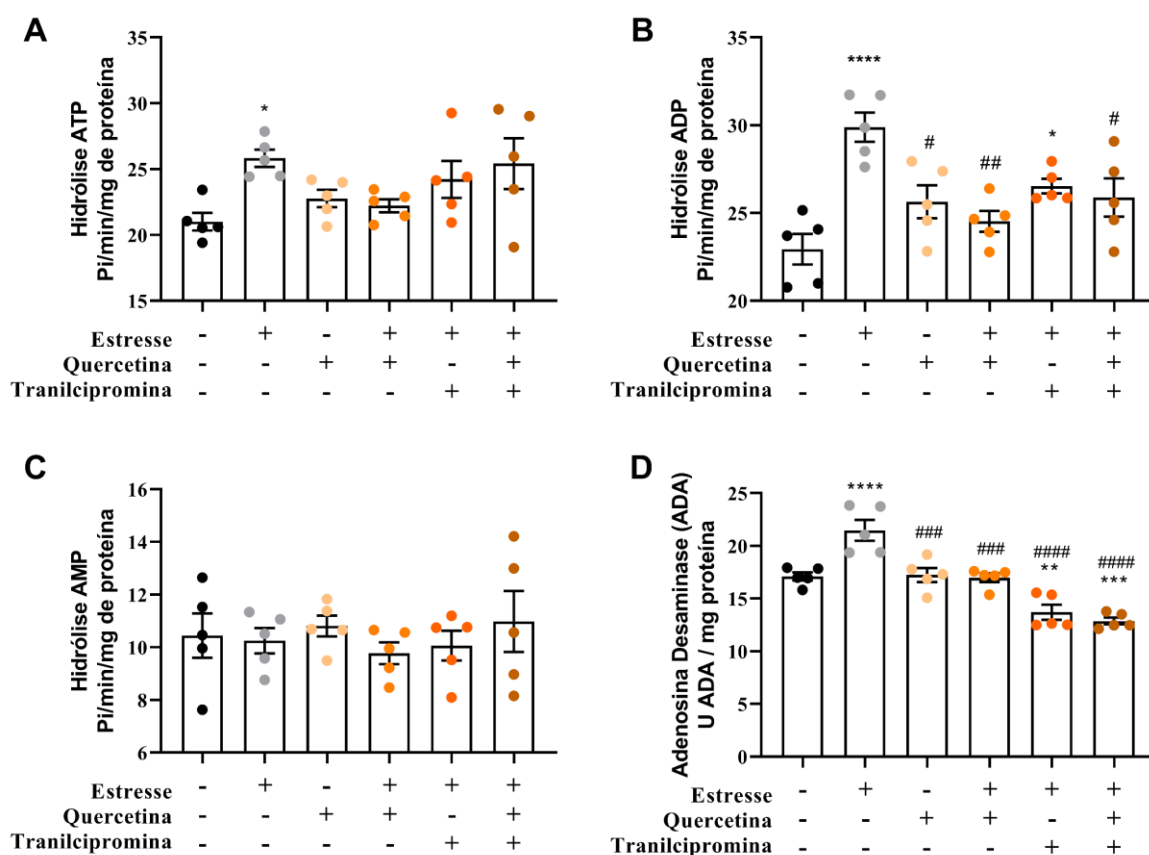


Fig. 4 As hidrólises do ATP (A), ADP (B), AMP (C) e Adenosina (D) no coração de ratos - grupo controle (n = 5), quercetina 50 mg/kg (n = 5), Q+S 50 mg/kg (n = 5), T+S 10 mg/kg (n = 5), Q+T+S 50 mg/kg + 10 mg/kg (n = 5). Os resultados estão dispostos de acordo com a comparação, sendo ela quando relacionada ao controle expressa por * e quando relacionada ao estresse expressa por #. Os resultados foram analisados usando ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey e expressos como média \pm SEM.

4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos da quercetina em um modelo de depressão-like com foco na modulação do estresse oxidativo e no metabolismo de purinas, utilizando-se como amostra biológica, coração de ratos. Os resultados obtidos revelaram uma série de alterações bioquímicas significativas, destacando o potencial terapêutico da quercetina nesse contexto.

Em relação ao estresse oxidativo, observou-se um aumento significativo nos níveis de TBARS no grupo submetido ao estresse, indicando uma resposta desse grupo ao estresse depressivo isso corrobora pesquisas já realizadas (BILICI et al., 2001; BENGESSER et al., 2015). A quercetina demonstrou eficácia em atenuar esse aumento, sugerindo seu papel como um agente antioxidante protetor, esses achados estão em consonância com estudos anteriores que destacam os benefícios antioxidantes da quercetina. (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008; ZHANG et al., 2011)

No entanto, é interessante notar que a oxidação de proteínas e a produção de espécies reativas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Essa falta de alteração pode ser atribuída à complexidade dos processos celulares envolvidos e ressalta a necessidade de uma compreensão mais aprofundada desses mecanismos.

Quanto às enzimas antioxidantes, a atividade da catalase (CAT) mostrou um aumento no grupo estresse, indicando uma resposta adaptativa ao estresse depressivo como já previamente descrito (TSAI; HUANG, 2015). O grupo tratado com quercetina 50 mg/kg exibiu um aumento significativo na atividade dessa enzima, em relação ao controle e em relação ao grupo submetido ao estresse, sugerindo uma possível modulação, através do controle antioxidante, dessa enzima pela quercetina como já descrito em outros estudos (LIU; ZHANG; LU, 2012; BALDISSARELLI et al., 2016).

Na análise do metabolismo de purinas, as hidrólises de ATP e ADP apresentaram um aumento no grupo estresse o que sugere uma possível associação entre o estresse depressivo e a liberação aumentada de adenosina trifosfato (ATP) relacionada com inflamação como já descrito (VELASQUEZ; RAPPAPORT, 2016; DOSCH et al., 2018). Os resultados obtidos da hidrólise de ADP podem ser correlacionados com implicações potencialmente significativas para a saúde cardiovascular. O aumento significativo na hidrólise de ADP no grupo estresse sugere uma possível associação entre o estresse depressivo e a liberação exacerbada desse nucleotídeo. Estudos prévios têm correlacionado o aumento da hidrólise de ADP com a agregação plaquetária, um evento importante na formação de trombos e no desenvolvimento de problemas cardíacos (JIN et al., 2002).

A elevação na atividade da Adenosina Desaminase (ADA) neste estudo demonstra a influência dessa enzima no tecido cardíaco de ratos em um modelo de depressão-*like*. O grupo submetido ao estresse depressivo demonstrou um aumento significativo na atividade da ADA, indicando uma resposta adaptativa pronunciada durante esse estado (HEADRICK et al., 2011; CHEFFER et al., 2018). A relação entre a atividade aumentada da ADA e a potencial depleção de adenosina destaca a complexidade das respostas bioquímicas purinérgica sob doenças psiquiátricas, como depressão. Esses achados fornecem uma base sólida para investigações mais aprofundadas sobre o

papel da ADA na interação entre depressão, estresse oxidativo e metabolismo de purinas, contribuindo para uma compreensão mais abrangente dos mecanismos subjacentes a esses processos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo oferecem achados valiosos sobre os efeitos da quercetina em um modelo de depressão-*like* em ratos, destacando seu potencial na modulação do estresse oxidativo e no metabolismo de purinas no coração dos animais. A hidrólise de ATP e ADP revelou padrões que sugerem sua relevância para a compreensão de processos inflamatórios e doenças cardiovasculares associadas à depressão. O aumento na hidrólise de ATP no grupo estresse pode indicar maior liberação desse nucleotídeo, associando-se a processos inflamatórios, enquanto o significativo aumento na hidrólise de ADP em ambos os grupos estresse e T+S aponta para possíveis alterações metabólicas ligadas a doenças cardiovasculares, as quais foram melhoradas pela administração de quercetina.

Além disso, o aumento na atividade da enzima Adenosina Desaminase (ADA) no grupo estresse sugere uma possível intensificação na degradação de adenosina, conhecida por seus efeitos protetores e anti-inflamatórios no coração. Esse aumento da ADA pode representar uma resposta adaptativa pronunciada durante o estresse depressivo, possivelmente exacerbando a depleção de adenosina e contribuindo para alterações no sistema purinérgico.

Os resultados promissores, como a redução nos ensaios de TBARS, o aumento significativo na atividade da CAT e nos níveis de tióis totais no grupo quercetina, sugerem um potencial efeito antioxidante e protetor dessa substância contra o estresse oxidativo. Essas descobertas indicam a possível contribuição da quercetina na redução do estresse oxidativo e na modulação do sistema purinérgico no contexto da depressão-*like*, apontando para sua relevância terapêutica.

No entanto, a pesquisa destaca a complexidade dos efeitos do estresse depressão-*like* nos animais, a complexidade refere-se à variedade de respostas e alterações observadas nos animais submetidos ao estresse, indicando que o impacto dessa indução pode se manifestar de maneiras diversas. Embora alguns parâmetros, como a oxidação de proteínas e a produção de espécies reativas, não tenham alcançado significância estatística, a eficácia da indução do estresse depressão-*like* é evidenciada por testes comportamentais realizados em um trabalho mais amplo de sistema purinérgico e envolvimento da depressão, do qual este se derivou.

O aumento significativo nos níveis de TBARS no grupo submetido ao estresse apontam para danos nos lipídios que compõem a membrana celular. Essa elevação sugere que o estresse depressivo pode desencadear uma resposta oxidativa prejudicial, resultando na degradação dos lipídios presentes nas membranas celulares. A correlação entre o aumento nos níveis de ATP e ADP no grupo estresse e o aumento na peroxidação lipídica fortalece a associação entre o estresse depressivo e os danos causados no coração, evidenciando possíveis implicações na saúde cardiovascular. Essas descobertas têm implicações significativas para a compreensão dos mecanismos subjacentes à relação entre depressão e saúde cardiovascular, destacando a necessidade de pesquisas futuras mais aprofundadas e abrangentes.

6. REFERÊNCIAS

- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, v. 13, n. 3, p. 637–648, 1 jan. 1992.
- ALIZADEH, S. R.; EBRAHIMZADEH, M. A. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 229, p. 114068, 2022.
- BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*, v. 144, n. 3, p. 365–373, 1 mar. 2015.
- BALDISSARELLI, J. et al. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 84, p. 1849–1857, 2016.
- BARTOLI, F. et al. Purinergic Signaling and Related Biomarkers in Depression. *Brain Sciences*, v. 10, n. 3, 1 mar. 2020.
- BEHLKE, L. M.; LENZE, E. J.; CARNEY, R. M. The Cardiovascular Effects of Newer Antidepressants in Older Adults and Those With or At High Risk for Cardiovascular Diseases. *CNS Drugs*, v. 34, n. 11, p. 1133–1147, 1 nov. 2020.
- BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major Depressive Disorder. <https://doi.org/10.1056/NEJMra073096>, v. 358, n. 1, p. 55–68, 3 jan. 2008.
- BENGESESSER, S. A. et al. Peripheral markers of oxidative stress and antioxidative defense in euthymia of bipolar disorder—Gender and obesity effects. *Journal of Affective Disorders*, v. 172, p. 367–374, 1 fev. 2015.
- BENTZ, A. B. A Review of Quercetin: Chemistry, Antioxidant Properties, and Bioavailability. *Journal of Young Investigators*, 1 abr. 2017.
- BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: Alterations by antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, v. 64, n. 1, p. 43–51, 2001.
- BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, v. 585, n. 2–3, p. 325–337, 13 maio 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*

Biochemistry, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BROOKS, S. K. et al. Rapid Review The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *www.thelancet.com*, v. 395, 2020.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, v. 120, n. 1, p. 207–228, 6 jan. 2017.

CARNEY, R. M.; FREEDLAND, K. E. Depression and coronary heart disease. 2016.

CHEFFER, A. et al. *Purinergic system in psychiatric diseases* *Molecular Psychiatry*, 2018.

CUNHA, G. M. A. et al. INCREASED DENSITY AND SYNAPTO-PROTECTIVE EFFECT OF ADENOSINE A_{2A} RECEPTORS UPON SUB-CHRONIC RESTRAINT STRESS. 2006.

DE HERT, M.; DETRAUX, J.; VANCAMPFORT, D. The intriguing relationship between coronary heart disease and mental disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 20, n. 1, p. 31–40, 1 mar. 2018.

DE MATTOS, B. da S. et al. Quercetin prevents alterations of behavioral parameters, delta-aminolevulinic dehydratase activity, and oxidative damage in brain of rats in a prenatal model of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 80, n. 4, p. 287–302, 1 jun. 2020.

DE SOUSA TOMAZ, V. et al. Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro-and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. 2020.

DHIMAN, P. et al. Quercetin and related chromenone derivatives as monoamine oxidase inhibitors: Targeting neurological and mental disorders. *Molecules*, v. 24, n. 3, 2019.

DOSCH, M. et al. Mechanisms of ATP release by inflammatory cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, p. 1–16, 2018.

ELLMAN, G. L. et al. A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88–95, 1961.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, v. 24, n. 10, p. 851–874, 2004.

GIUSTI G; GALANTI B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: *Methods of*

Enzymatic Analysis. [s.l: s.n.]

GORBENKO, N. I. et al. Quercetin improves myocardial redox status in rats with type 2 diabetes. *Endocrine regulations*, v. 55, n. 3, p. 142–152, 1 jul. 2021.

GREENSHAW, A. J. et al. Chronic tranylcypromine treatment induces functional $\alpha 2$ -adrenoceptor down-regulation in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 154, n. 1, p. 67–72, 1 set. 1988.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*, v. 56, n. 9, p. 683–687, 1 ago. 2001.

HABIG, W. H. et al. Glutathione S-Transferases THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HEADRICK, J. P. et al. Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1808, n. 5, p. 1413–1428, 1 maio 2011.

HEYMANN, D.; REDDINGTON, M.; KREUTZBERG, G. W. Subcellular Localization of 5'-Nucleotidase in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, 1984.

JAIN, U. Effect of COVID-19 on the Organs. *Cureus*, v. 6, n. Mi, p. 8–13, 2020.

JIN, J. et al. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin α (IIb) β (3) and ADP receptors. *Blood*, v. 99, n. 1, p. 193–198, 1 jan. 2002.

KRÜGEL, U. Purinergic receptors in psychiatric disorders. *Neuropharmacology*, v. 104, p. 212–225, 2016.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; Ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2005.

LEVINE, R. L. et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 186, n. C, p. 464–478, 1 jan. 1990.

LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients 2016, Vol. 8, Page 167*, v. 8, n. 3, p. 167, 15 mar. 2016.

LIU, H.; ZHANG, L.; LU, S. Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, v. 17, n. 4, p. 4281–4291, 2012.

MACHADO, A. et al. Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas. [s.d.].

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 35, n. 3, p. 676–692, 29 abr. 2011.

MALYSZKO, J. et al. Serotonergic Systems in Brain and Blood Under Stress and Tranylcypromine Treatment in Rats. *Brain Research Bulletin*, v. 35, p. 9–13, 1994.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 474–478, 1 out. 1972.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979.

ON KWOK, K.; SERDARI, A.; SANI, G. Perceived Stress of Quarantine and Isolation During COVID-19 Pandemic: A Global Survey. *Frontiers in Psychiatry* | www.frontiersin.org, v. 1, p. 656664, 2021.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers* 2016 2:1, v. 2, n. 1, p. 1–20, 15 set. 2016.

PEREIRA BRAGA, C. et al. Influence of treatment with quercetin on lipid parameters and oxidative stress of pregnant diabetic rats. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0173>, v. 91, n. 2, p. 171–177, fev. 2012.

SCHETINGER, M. R. et al. Effects of Aluminum Chloride on the Kinetics of Rat Cortex Synaptosomal ATP Diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5). *Biological Trace Element Research*, v. 209, 1995.

SPINDELEGGER, C. J. et al. Cardiovascular Adverse Reactions During Antidepressant Treatment: A Drug Surveillance Report of German-Speaking Countries Between 1993 and 2010. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 4, p. 1–9, 1 jan. 2015.

TSAI, M. C.; HUANG, T. L. Increased activities of both superoxide dismutase and catalase were indicators of acute depressive episodes in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Research*, v. 235, p. 38–42, 2015.

VELASQUEZ, S.; RAPPAPORT, J. Inflammasome activation in major depressive disorder: A pivotal linkage between psychological stress, purinergic signaling, and the kynurenine pathway. *Biological Psychiatry*, v. 80, n. 1, p. 4–5, 2016.

XAVIER FARIA, R. et al. Crosstalk Between ATP-P 2X7 and Adenosine A 2A

Receptors Controlling Neuroinflammation in Rats Subject to Repeated Restraint Stress. 2021.

ZHANG, M. et al. Antioxidant properties of quercetin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 701, p. 283–289, 2011.

7. AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais, **Nilcia** e **Oli** que me proporcionaram todo o suporte para poder chegar até aqui, e aguentaram firme comigo a saudade por estar longe de casa.

À minha irmã, **Andréia** por todo o incentivo e pelo auxílio também no tempo em que passamos juntos em Santa Maria.

À **Nathaly** por todo carinho e pela paciência, por estar ao meu lado sempre, por acreditar em mim e não deixar eu desistir, muito obrigado por tudo.

Ao meu grande amigo, **Matheus Jantsch** por ter me influenciado a vir para Santa Maria e estudar na UFSM, e por todos esses anos de amizade.

Ao meu primo **Matheus Henckes**; aos meus amigos **Samuel Neumann**, **Eduardo Wachholtz**, **Tainá Fonseca** pela amizade e principalmente ao amigo **Cristian Schuh** por ter encarado essa jornada em Santa Maria comigo.

Ao **apartamento 6317** e todos os membros que passaram por ele durante esses anos, se tornaram minha segunda família, não serão esquecidos.

Ao **Instituto Federal Sul rio-grandense (IFSUL) - Campus Venâncio Aires**, pelos ótimos professores com quem pude ter convívio e receber aprendizado de qualidade, e por sempre me incentivarem a buscar mais.

À **Prof^a. Dr^a. Vera Maria Melchiors Morsch** e à **Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina**, pela orientação neste trabalho, pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de profissionais que são.

À **Universidade Federal de Santa Maria**, ao **Curso de Química Bacharelado** e ao **Laboratório de Enzimologia Toxicológica (ENZITOX)** pelos grandes profissionais que os compõem, pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo ótimo espaço de aprendizagem.

À **CNPq**, **CAPES** e **FAPERGS** pelo auxílio financeiro.

Por último, mas não menos importante, à todos que fizeram parte dessa jornada e com quem pude compartilhar experiências e conhecimentos ou simplesmente muitas risadas, meus mais sinceros agradecimentos. Muito Obrigado!

8. ANEXOS



Universidade Federal de Santa Maria

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA QUERCETINA SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM RATOS SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE ESTRESSE DEPRESSÃO-LIKE", protocolada sob o CEUA nº 3315241022 (ID 003972), sob a responsabilidade de **Vera Maria Melchior Morsch e equipe; Vitor Bastianello Mostardeiro; Charles Elias Assmann; MARCYLENE VIEIRA DA SILVEIRA; Jelson Norberto Nauderer; LAIMARY SILVA PEREIRA; JAIME ARAMBURU** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 22/11/2022.

We certify that the proposal "Effects of Quercetin on Purinergic Signalling in rats undergoing a Depression-like Stress Protocol", utilizing 60 Heterogeneous rats (60 males), protocol number CEUA 3315241022 (ID 003972), under the responsibility of **Vera Maria Melchior Morsch and team; Vitor Bastianello Mostardeiro; Charles Elias Assmann; MARCYLENE VIEIRA DA SILVEIRA; Jelson Norberto Nauderer; LAIMARY SILVA PEREIRA; JAIME ARAMBURU** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 11/22/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 01/2023 a 09/2024 Área: Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular

Origem: Biotério Central UFSM

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem: Wistar

sexo: Machos

idade: 45 a 60 dias

Quantidade: 60

Peso: 200 a 250 g

Santa Maria, 18 de maio de 2023

Dra. Patrícia Bräunig

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

