

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

Viviane Martins Bernardes

**EFEITO DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) NO METABOLISMO
DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM
PLAQUETAS DE RATOS COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA**

Santa Maria, RS
2018

Viviane Martins Bernardes

**EFEITO DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) NO METABOLISMO DE
NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PLAQUETAS DE
RATOS COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS
2018

Bernardes, Viviane Martins
EFEITO DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) NO
METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM
PLAQUETAS DE RATOS COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA / Viviane
Martins Bernardes.- 2018.
71 p.; 30 cm

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2018

1. Hiperlipidemia 2. Plaquetas 3. Sistema purinérgico
4. Ectoenzimas 5. Tucumã I. Bitencourt Rosa Leal,
Daniela II. Título.

Viviane Martins Bernardes

**EFEITO DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) NO METABOLISMO DE
NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PLAQUETAS DE
RATOS COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 12 de setembro de 2018:

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)

Marina Prigol, Dra. (UNIPAMPA) - Parecer

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Cláudio e Cleonice,
à minha irmã Liane e ao meu namorado Bruno.
Vocês são a força e os motivos que me fazem querer ser sempre melhor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado e permitir que eu tenha chegado até aqui. Obrigada pela vida, pela sabedoria e por guiar e proteger meus passos.

À minha família, pelo apoio e amor incondicional. Obrigada por acreditarem em mim, pelos valores a mim ensinados e por me mostrarem que a família é o maior porto seguro de alguém. Vocês são as bases que tornam meus planos possíveis e minha felicidade completa.

Ao meu namorado Bruno Garcia, pelo companheirismo e incentivo. Obrigada por nunca largar minha mão e por compartilhar comigo sonhos e projetos de vida.

À minha orientadora Daniela Bitencourt Rosa Leal, pela oportunidade e confiança. Obrigada pelos ensinamentos, atenção e orientação.

Aos meus colegas e amigos do LABIBIO, por tornarem meus dias de trabalho mais leves e divertidos. Obrigada pela companhia diária, pelos ensinamentos compartilhados e por fazerem parte desta caminhada. Meu agradecimento especial aos colegas que tornaram esse experimento possível: Patrícia Cavalheiro, Paulo Guilherme Schimites, Alessandra Manzoni, Jean Gutknecht, Matheus Jantsch, Renata Pereira e Lara Becker.

À minha amiga e companheira de experimentos Fernanda Cabral, pelo auxílio e amizade durante todos os experimentos e etapas do mestrado. Obrigada por ter se tornado minha dupla e ser uma “tucumana” comigo.

À minha amiga Daniela Passos, pela paciência e disponibilidade. Obrigada pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar e dividir o que sabe.

À minha amiga Juliana Sorraia, pela disponibilidade e ajuda. Obrigada por sempre me estender a mão e ajudar a encontrar soluções diante dos imprevistos.

Aos professores e funcionários que tornaram esse projeto possível: Ritiel da Cruz, Thiago Belarmino, Luis, Rafaela Dornelles, Melânia Palermo, Ivana da Cruz e Cinthia de Andrade, pela atenção e auxílio prestados.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da UFSM, pelos ensinamentos e assistência prestados.

À banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas contribuições que farão a este trabalho.

A todos que colaboraram de alguma forma e contribuíram para tornar essa caminhada possível, minha gratidão e respeito. Muito obrigada!

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

RESUMO

EFEITO DO TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) NO METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM PLAQUETAS DE RATOS COM HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA

AUTORA: Viviane Martins Bernardes

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Daniela Bitencourt Rosa Leal

O aumento dos níveis de lipídeos na corrente sanguínea, especialmente triglicerídeos e colesterol-LDL, caracteriza um distúrbio lipídico chamado hiperlipidemia e constitui um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares. A hiperlipidemia pode resultar em agressão ao endotélio vascular no qual as plaquetas, buscando manter a homeostasia, tornam-se hiperativas e promovem a liberação de uma série de fatores pró-aterogênicos. Dentre os mediadores liberados pelas plaquetas estão os nucleotídeos ATP, ADP, AMP e o nucleosídeo adenosina. Essas moléculas atuam como sinalizadoras de um complexo sistema envolvido na regulação e manutenção das respostas imunológicas, chamado sistema purinérgico. Esse sistema também é composto por ectoenzimas que possuem a função de regular os níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. O tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) é um fruto com alto potencial terapêutico pela sua composição rica em carotenoides, flavonoides, fibras e ácidos graxos poli-insaturados. Portanto, possui uma provável ação benéfica no metabolismo lipídico e na prevenção de doenças cardiovasculares. A indução de hiperlipidemia por Poloxamer-407 é um modelo bem estabelecido na literatura, que possui efeito sobre uma variedade de enzimas-chave no metabolismo lipídico, contribuindo para investigação de eventos patológicos e alternativas terapêuticas na hiperlipidemia. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade de ectoenzimas do sistema purinérgico em plaquetas de ratos com hiperlipidemia induzida, tratados com tucumã. Para o desenvolvimento desse estudo, foram utilizados 56 ratos machos *Wistar* adultos. Os animais foram pré-tratados com veículo, extrato de tucumã (250mg/Kg), rutina (3,2mg/kg) e β -caroteno (6,5mg/kg), administrados uma vez ao dia, via gavagem, por 30 dias. Rutina e β -caroteno foram utilizados como padrão comparativo. A hiperlipidemia foi induzida de forma aguda mediante injeção intraperitoneal de P-407 (500mg/kg dissolvido em solução estéril de NaCl a 0,9%). Os ratos foram anestesiados com isoflurano e submetidos à eutanásia 36h pós-indução. As plaquetas foram separadas para a determinação da atividade das ectoenzimas e o soro foi utilizado para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Os resultados desse estudo demonstraram que a indução de hiperlipidemia causou um aumento na atividade da E-NTPDase e E-5'-NT e redução da atividade da E-ADA, possivelmente como um mecanismo para regular os níveis de ATP e ADP, importantes agonistas da agregação plaquetária, e elevar os níveis de adenosina, a qual possui propriedades antitrombóticas. O tratamento com extrato de tucumã preveniu o aumento da hidrólise de ADP, mantendo a atividade da E-NTPDase em níveis basais e diminuiu a atividade da E-ADA, possivelmente aumentando a disponibilidade de adenosina e demonstrando um efeito de proteção vascular e prevenção do dano endotelial causado pelo excesso de lipídeos na circulação. Entretanto, o tucumã não foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de lipídeos e alterações bioquímicas causados pela indução da hiperlipidemia. Através da modulação das atividades das enzimas purinérgicas, o tucumã pode contribuir para a manutenção da homeostase vascular, diminuindo a agregação plaquetária e subsequente aterotrombose. Dessa forma, a utilização do tucumã pode beneficiar pacientes com hiperlipidemia e constitui uma alternativa promissora para redução do número de casos de doenças cardiovasculares.

Palavras-chaves: Hiperlipidemia. Plaquetas. Sistema purinérgico. Ectoenzimas. Tucumã.

ABSTRACT

EFFECT OF TUCUMÃ (*Astrocaryum aculeatum*) ON THE METABOLISM OF ADENINE NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDE IN PLATELETS OF RATS WITH INDUCED HYPERLIPIDEMIA

AUTHOR: Viviane Martins Bernardes

ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Daniela Bitencourt Rosa Leal

Increased levels of lipids in the bloodstream, especially triglycerides and LDL-cholesterol, characterize a lipid disorder called hyperlipidemia, which is one of the major modifiable risk factors for cardiovascular disease. Hyperlipidemia results in aggression to the vascular endothelium in which platelets, seeking to maintain homeostasis, become hyperactive and promote the release of several proatherogenic factors. Among the mediators released by platelets are the nucleotides ATP, ADP, AMP, and the nucleoside adenosine. These molecules act as signals for a complex system involved in the regulation and maintenance of immune responses, denominated purinergic system. This system is also composed by ectoenzymes that have the function of regulating the extracellular levels of nucleotides and nucleosides of adenine. Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) is a fruit with high therapeutic potential due to its composition rich in carotenoids, flavonoids, fibers, and polyunsaturated fatty acids. Therefore, it may have beneficial actions in the lipid metabolism and in the prevention of cardiovascular diseases. The induction of hyperlipidemia by Poloxamer-407 is a well-established model in the literature, which affects a variety of key enzymes in lipid metabolism, contributing to the investigation of pathological events and therapeutic alternatives in hyperlipidemia. Thus, the objective of the present study was to evaluate the activities of the purinergic system ectoenzymes in platelets of rats with induced hyperlipidemia, treated with tucumã. For the development of this study, 56 adult male Wistar rats were used. The animals were pretreated with vehicle, tucumã extract (250mg / kg), rutin (3.2mg / kg), and β -carotene (6.5mg / kg), administered once daily, via gavage, for 30 days. Rutin and β -carotene were used as a comparative standard. Hyperlipidemia was acutely induced by an intraperitoneal injection of P-407 (500mg/kg dissolved in sterile 0.9% NaCl solution). The rats were anesthetized with isoflurane and submitted to euthanasia 36h post-induction. Platelets were separated for determination of ectoenzyme activities and serum was used to evaluate biochemical parameters. The induction of hyperlipidemia increased E-NTPDase and E-5'-NT activities and reduced E-ADA activity, possibly as a mechanism for regulating ATP and ADP levels, important agonists of platelet aggregation, and increasing adenosine levels, which has antithrombotic properties. The tucumã extract treatment prevented the increase in ADP hydrolysis, maintaining E-NTPDase activity at basal levels and decreased E-ADA activity, possibly to increase the availability of adenosine, demonstrating a vascular protective effect and prevention of endothelial damage caused by excessive lipids in the blood. However, tucumã was not able to prevent the increase of lipid levels and biochemical changes caused by the induction of hyperlipidemia. By modulating the activities of purinergic enzymes, tucumã may contribute to the maintenance of vascular homeostasis, reducing platelet aggregation and subsequent atherothrombosis. Thus, tucumã may benefit patients with hyperlipidemia and is a promising alternative for reducing the number of cases of cardiovascular diseases.

Keywords: Hyperlipidemia. Platelets. Purinergic system. Ectoenzymes. Tucumã.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Composição das principais classes de lipoproteínas plasmáticas humanas	16
Figura 2 – Ciclos de transporte de lipídeos no plasma	18
Figura 3 – Formação da placa aterosclerótica	21
Figura 4 – Papel das plaquetas na homeostase e trombose	22
Figura 5 – Representação dos componentes do sistema purinérgico	23
Figura 6 – Principais enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	26
Figura 7 – Sinalização purinérgica nas plaquetas.....	28
Figura 8 – Palmeiras de <i>Astrocaryum aculeatum</i> e os cachos contendo frutos.....	31
Figura 9 – Frutos inteiros, parcialmente descascados e seccionados de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	32

MANUSCRITO

Fig. 1 Representative high-performance liquid chromatography profile of tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>) extract, detection UV was at 325nm.....	62
--	----

Fig. 2 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities with ATP(a), ADP(b) and AMP(c) hydrolysis in platelets of rats with Poloxamer-407-induced hyperlipidemia pretreated with vehicle, tucumã extract (250mg/kg/day), rutin (3.2mg/kg/day) and β -carotene (6.5mg/kg/day).....	63
---	----

Fig. 3 E-ADA activity in platelets of rats with Poloxamer-407-induced hyperlipidemia pretreated with vehicle, tucumã extract (250mg/kg/day), rutin (3.2mg/kg/day) and β -carotene (6.5mg/kg/day).....	64
--	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Composição físico-química da polpa (mesocarpo) e polpa desidratada e pulverizada de tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>)	32
Tabela 2 – Composição de fenólicos e flavonoides de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	33

MANUSCRITO

Table 1 Phenolics and flavonoids composition of the tucumã extract.....	58
Table 2 Hematological parameters of rats with P-407-induced hyperlipidemia after one month of preventive treatment with tucumã, rutin and β -carotene.....	59
Table 3 Lipid profile after induction of hyperlipidemia in rats previously treated with tucumã, rutin, and β -carotene.....	60
Table 4 Biochemical parameters after induction of hyperlipidemia in rats previously treated with tucumã, rutin and β -carotene.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	Acil-Coa Colesteril Aciltransferase
ADP	Adenosina Difosfato
Akt	Proteína Quinase B
ALT	Alanina Aminotransferase
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPc	AMP cíclico
Apo	Apolipoproteínas
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CETP	Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol
CT	Colesterol Total
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E-5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase
E-ADA	Ecto-adenosina desaminase
E-NPP	Ecto-nucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
ERK	Proteína Quinase regulada por Sinal Extracelular
FAL	Fosfatase Alcalina
GPCRs	Receptores acoplados a Proteína G
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HDL	Lipoproteínas de Densidade Alta
LCAT	Lecitina Colesterol Aciltransferase
LDL	Lipoproteínas de Densidade Baixa
LDL-ox	Lipoproteínas de Densidade Baixa oxidada
LDLR	Receptores de Lipoproteínas de Densidade Baixa
LPL	Enzima Lipase Lipoproteica
MEC	Matriz Extracelular
MTT	3-(4,5)-dimetiliazolil-2,5-difeniltetrazólio
ORAC	Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio
P-407	Poloxamer-407
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂
TG	Triglicerídeo
TRAP	Potencial Reativo Antioxidante Total
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VLDL	Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa
vWF	Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	13
1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	METABOLISMO LIPÍDICO	16
2.2	DISLIPIDEMIAS.....	18
2.3	HIPERLIPIDEMIA.....	20
2.4	PLAQUETAS E SEU PAPEL NA HIPERLIPIDEMIA	21
2.5	SISTEMA PURINÉRGICO.....	23
2.6	SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA COMO REGULADORA DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA.....	27
2.7	TUCUMÃ	30
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MANUSCRITO	37
5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está subdividida em seções dispostas da seguinte maneira: Introdução, composta de uma descrição breve do contexto e relevância do estudo proposto; Revisão Bibliográfica, constituída de um embasamento teórico-científico dos principais tópicos abordados no estudo e Objetivos, composto das finalidades da pesquisa. As subdivisões Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se na seção Manuscrito e representam a íntegra deste estudo. A formatação do manuscrito está organizada de acordo com as normas do periódico “*Molecular and Cellular Biochemistry*”, ao qual esse estudo foi submetido. O item Conclusão contém interpretações e comentários dos resultados obtidos. Por fim, a seção Referências refere-se às citações mencionadas ao longo das seções Introdução e Revisão Bibliográfica.

1 INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortes no mundo, sendo responsáveis por tirar a vida de aproximadamente 17 milhões de pessoas anualmente, o que representa 30% do número global de mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). No Brasil, esse quadro se mantém e estima-se que a cada 90 segundos uma morte causada por doença cardiovascular seja registrada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2018). Vários são os fatores envolvidos no estabelecimento deste preocupante cenário, dentre os quais a hiperlipidemia merece destaque, pois o acúmulo de lipídeos na corrente sanguínea desencadeia um processo inflamatório e contribui para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, um dos principais precedentes para eventos cardiovasculares (FALUDI et al., 2017).

A hiperlipidemia é um tipo de dislipidemia caracterizada por um excesso dos níveis de lipídeos na corrente sanguínea, sendo eles o colesterol total (CT), lipoproteínas de densidade baixa (LDL), triglicerídeos (TG) ou uma associação de dois ou mais deles (NELSON, 2013). O excesso de gorduras no plasma desencadeia um processo de agressão ao endotélio vascular, aumentando a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas e facilitando o acúmulo dessas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL são oxidadas e estimulam a expressão e liberação de uma série de fatores envolvidos no recrutamento de células de defesa e na amplificação do processo inflamatório (FENG et al., 2018).

Como resposta a lesão endotelial decorrente do estado hiperlipidêmico, as plaquetas, principais responsáveis pela homeostasia vascular, tornam-se hiperativas e liberam sinais pró-aterogênicos, intensificando o processo de agregação plaquetária e formação do trombo. Dentre os principais mecanismos envolvidos na hiperatividade plaquetária está a liberação de grânulos contendo adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) (HOLINSTAT, 2017).

Esses importantes mediadores fazem parte de um grupo de moléculas conhecidas como nucleotídeos e nucleosídeos de adenina que ao se ligarem a receptores purinérgicos específicos, são responsáveis por desencadear uma cascata de reações envolvidas na modulação de diversos efeitos biológicos, como a agregação plaquetária, inflamação, modulação da função cardíaca e das respostas imunológicas (BURNSTOCK, 2006; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Dessa forma, os níveis desses derivados de adenina no meio extracelular precisam ser mantidos em concentrações fisiológicas e para isso são regulados por ectoenzimas ancoradas

na superfície das membranas celulares. Entre as principais ectoenzimas estão incluídas as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), que catalisam a hidrólise do ATP e do ADP em adenosina monofosfato (AMP), a enzima ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT), responsável pela hidrólise da molécula de AMP no nucleosídeo adenosina e a enzima ecto-adenosina desaminase (E-ADA), responsável pela desaminação de adenosina e conversão em inosina (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012; YEGUTKIN, 2008).

Os modelos experimentais animais permitem avaliar parâmetros envolvidos em diversos processos fisiopatológicos, como a regulação do sistema purinérgico, além de contribuir na investigação e desenvolvimento de novas terapias (CONN, 2013). O modelo de indução de hiperlipidemia por Poloxamer-407 (P-407), por exemplo, é um método bem descrito na literatura, capaz de exercer efeito sobre a atividade biológica de uma variedade de enzimas-chave envolvidas no metabolismo e transporte lipídico (JOHNSTON; KOROLENKO; SAHEBKAR, 2017). Outrossim, a identificação de compostos bioativos através da caracterização da composição química de plantas e frutos revelam um alto potencial farmacoterapêutico desses produtos e despertam um interesse cada vez maior na utilização desses no tratamento e prevenção de doenças (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Oriundo de uma palmeira amazônica, o tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) é um fruto rico em compostos antioxidantes como carotenoides e flavonoides (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; SAGRILLO et al., 2015). Encontrado principalmente no estado do Amazonas, onde é conhecido popularmente como tucumã-do-amazonas, tucumanzeiro ou tucumã-açu, este fruto é frequentemente utilizado para o consumo *in natura* ou na fabricação de sanduíches, licores, doces, sorvetes e na extração de diferentes óleos comestíveis (YUYAMA et al., 2008). Entre os diversos compostos bioativos encontrados no tucumã, que conferem a esse fruto um alto potencial terapêutico, estão o beta-caroteno, a quercetina, a rutina e o ácido cafeico (SAGRILLO et al., 2015). Além disso, o tucumã é composto por um alto teor de fibras e ácidos graxos insaturados, que se consumidos de forma moderada podem exercer uma ação benéfica no metabolismo lipídico (VASCONCELOS, 2010).

Dessa forma, a investigação do efeito do tucumã na prevenção da hiperlipidemia, através da sua ação no sistema purinérgico em plaquetas, contribui para a elucidação de possíveis terapias adjuvantes que possam reduzir o impacto da hiperlipidemia nas doenças cardiovasculares.

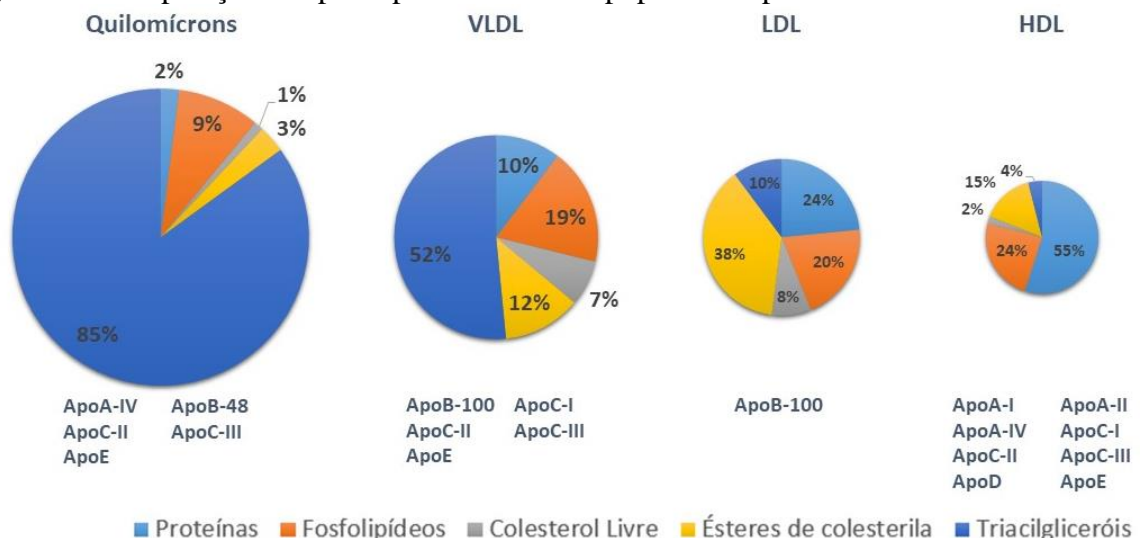
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 METABOLISMO LIPÍDICO

O colesterol e os triglicerídeos (TG) são considerados dois dos lipídios biologicamente mais relevantes do metabolismo humano (FALUDI et al., 2017). Enquanto os TG constituem uma importante forma de armazenamento energético, o colesterol desempenha um papel crucial na manutenção da fluidez e permeabilidade da membrana celular, além de atuar como precursor de hormônios esteroidais, ácidos biliares e vitamina D (BHATNAGAR; SORAN; DURRINGTON, 2008). Entretanto, por serem moléculas hidrofóbicas, os lipídeos circulam na corrente sanguínea associados a proteínas específicas denominadas apolipoproteínas (apo). Essa associação dá origem a complexos chamados lipoproteínas, que permitem então a solubilização e carregamento dos lipídeos no meio aquoso plasmático (FALUDI et al., 2017).

As lipoproteínas podem variar entre si em tamanho, densidade e composição química, sendo, portanto, divididas em quatro principais classes: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e lipoproteínas de densidade alta (HDL) (NELSON, 2013). Cada uma dessas classes é diferenciada por um conteúdo próprio de apo, as quais possuem papel importante na função que cada lipoproteína exerce no metabolismo lipídico, podendo atuar na formação intracelular das partículas lipoproteicas, como ligantes de membrana e como cofatores enzimáticos (WÜSTNER; SOLANKO, 2015). Uma representação esquemática da composição de diferentes classes de lipoproteínas (NELSON; COX, 2014) está reproduzida na Figura 1.

Figura 1 – Composição das principais classes de lipoproteínas plasmáticas humanas



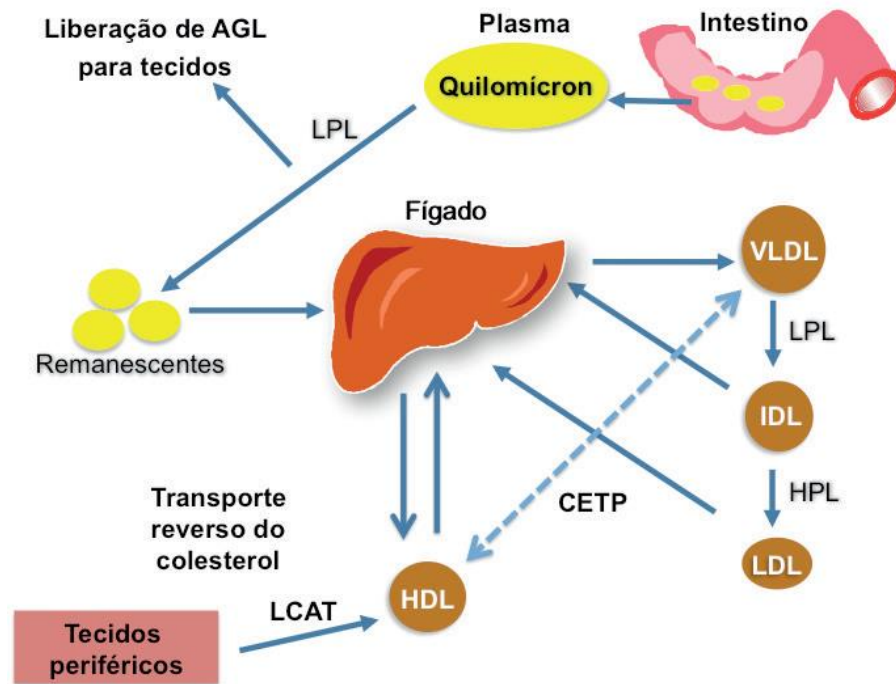
Fonte: (AUTORA)

Durante o metabolismo lipídico, os TG são hidrolisados e absorvidos no intestino, onde são formados os quilomícrons. Enquanto circulam, os quilomícrons sofrem ação da enzima lipase lipoproteica (LPL) e liberam ácidos graxos livres para os tecidos periféricos, onde são consumidos ou armazenados como fonte de energia. Os remanescentes dos quilomícrons e ácidos graxos são também captados pelo fígado, onde são utilizados na formação de VLDL (HUSSAIN, 2014). Ao serem liberadas na corrente sanguínea, as VLDL, por ação das LPL, distribuem seu conteúdo lipídico e são progressivamente depletadas de TG, transformando-se em VLDL remanescentes ou resultando na formação de LDL. As VLDL podem fazer trocas lipídicas com outras lipoproteínas, como LDL e HDL, através da ação da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), fornecendo TG em troca de ésteres de colesterol (FALUDI et al., 2017).

A LDL é formada essencialmente por um conteúdo residual de TG e colesterol e possui como principal função o transporte de colesterol livre até os tecidos periféricos. No interior das células, o colesterol livre pode ser esterificado para depósito por ação da enzima acil-Coa: colesterol aciltransferase (ACAT) (HUANG; ELVINGTON; RANDOLPH, 2015). Tanto nas células hepáticas quanto nas periféricas, as LDL são capturadas por receptores de LDL (LDLR) sendo, portanto, a expressão desses receptores no fígado a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue. O caminho inverso do transporte de colesterol, ou seja, dos tecidos periféricos até o fígado, é realizado pela HDL, onde o colesterol livre, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), contribuindo para sua estabilização e transporte no plasma no interior dessa lipoproteína (WÜSTNER; SOLANKO, 2015). O processo de transporte de lipídeos no plasma está representado na Figura 2.

A influência das lipoproteínas no metabolismo lipídico faz com que possuam um grande impacto no processo aterogênico. Enquanto as LDL modificadas constituem um fator-chave no processo inflamatório de formação da placa aterosclerótica, as HDL podem inibir a modificação de lipídios e proteínas em virtude de suas atividades biológicas antioxidantes (RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Além disso, o papel protetor do leito vascular exercido pelas HDL é ainda reforçado pelo seu potencial de remoção de lipídeos oxidados da LDL, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulação da liberação de óxido nítrico (TRAN-DINH et al., 2013). Essas diferentes contribuições das lipoproteínas no processo aterogênico devem-se em grande parte ao tipo de modificações que as lipoproteínas sofrem durante o metabolismo, como, por exemplo, reações de oxidação, glicação ou dessialização (HUSSAIN, 2014).

Figura 2 – Ciclos de transporte de lipídeos no plasma



Fonte: (FALUDI et al., 2017, p. 3)

2.2 DISLIPIDEMIAS

Dislipidemias são alterações nos níveis séricos de lipoproteínas, que podem estar aumentadas ou diminuídas, resultando em desordens no metabolismo lipídico. São geralmente causadas por uma associação entre fatores genéticos, ambientais e metabólicos, sendo os dois últimos representados por uma dieta de baixa qualidade, sedentarismo, síndrome metabólica e utilização de certos medicamentos (RAMASAMY, 2016). As dislipidemias consistem atualmente em um dos principais fatores de risco modificáveis para doenças vasculares, juntamente com o tabagismo, pressão arterial elevada e diabetes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Dessa forma, a prevenção da dislipidemia consiste em um fator determinante para redução do número de mortes causadas por doenças cardiovasculares, bem como na redução de custos com tratamento de desordens dessa natureza (HENDRANI, 2016).

Quanto a sua origem etiológica, as dislipidemias podem ser classificadas em primárias, quando o distúrbio lipídico é de origem genética, ou secundárias, quando causada por um estilo de vida inadequado, condições mórbidas, ou decorrente do uso de fármacos (NELSON, 2013). Já a classificação laboratorial considera a fração lipídica alterada e classifica as dislipidemias em quatro grupos bem definidos: Hipercolesterolemia isolada, quando há um aumento isolado do LDL-c ($\text{LDL-c} \geq 160 \text{ mg/dL}$); Hipertrigliceridemia

isolada, quando apenas os triglicérides estão aumentados ($TG \geq 150$ mg/dL ou ≥ 175 mg/dL, se a amostra for obtida sem jejum); Hiperlipidemia mista, quando há um aumento concomitante do LDL-c ($LDL-c \geq 160$ mg/dL) e dos TG ($TG \geq 150$ mg/dL ou ≥ 175 mg/dL, se a amostra for obtida sem jejum), ou HDL-c baixo, quando há uma redução do HDL-c (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL) isolada ou em associação ao aumento de LDL-c ou de TG (FALUDI et al., 2017).

Elevações do CT e TG, bem como de lipoproteínas, caracterizam a maior parte das dislipidemias primárias. Geralmente, esses distúrbios lipídicos são decorrentes do aumento de síntese ou redução da hidrólise de lipídios causadas por deficiências genéticas em enzimas ou apo relacionadas a estas lipoproteínas, como no caso da hipertrigliceridemia, ou em genes que codificam receptores importantes, como ocorre na hipercolesterolemia familiar (SANTOS, 2012). Nestes casos, o fenótipo do perfil lipídico é determinado por fatores genéticos, porém sofre influência ambiental já que em algumas vezes sua manifestação está condicionada a maus hábitos alimentares e uma vida ociosa (FALUDI et al., 2017).

O perfil lipídico é definido pelas determinações bioquímicas do CT, TG, LDL-c e HDL-c. Atualmente, a Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda que a amostra para realização das dosagens do perfil lipídico seja coletada sem jejum, de forma que represente nosso estado metabólico normal e dieta habitual. Desde que os valores de CT, HDL-c e não HDL-c não sofrem influência do estado alimentar, apenas os níveis de triglicérides, bem como seus níveis desejáveis, são diferentes nos estados com ou sem jejum, devendo, portanto, ser indicado pelo laboratório em qual situação o exame foi realizado (FALUDI et al., 2017). O fim do jejum para o perfil lipídico e sua utilização na rotina laboratorial já vem sendo adotado em outros países e amplamente discutido na comunidade médica (LANGSTED; FREIBERG; NORDESTGAARD, 2008; RIFAI; YOUNG, 2016).

Apesar das lipoproteínas e dos lipídeos serem os principais marcadores de risco para DCV, a utilização de outros marcadores, como citocinas e proteínas inflamatórias, vem sendo investigada. Porém, uma melhoria significativa na previsão do risco de DCV através da aplicação desses parâmetros não está ainda bem estabelecida. Além disso, esses marcadores alternativos elevam custos, podem adicionar riscos e muitos ensaios não foram ainda padronizados, dificultando sua utilização como ferramenta de triagem na rotina clínica. Sua utilização é, portanto, mais indicada durante a escolha da conduta terapêutica pelo médico e em casos específicos de pacientes com risco identificado para DCV (NELSON, 2013).

2.3 HIPERLIPIDEMIA

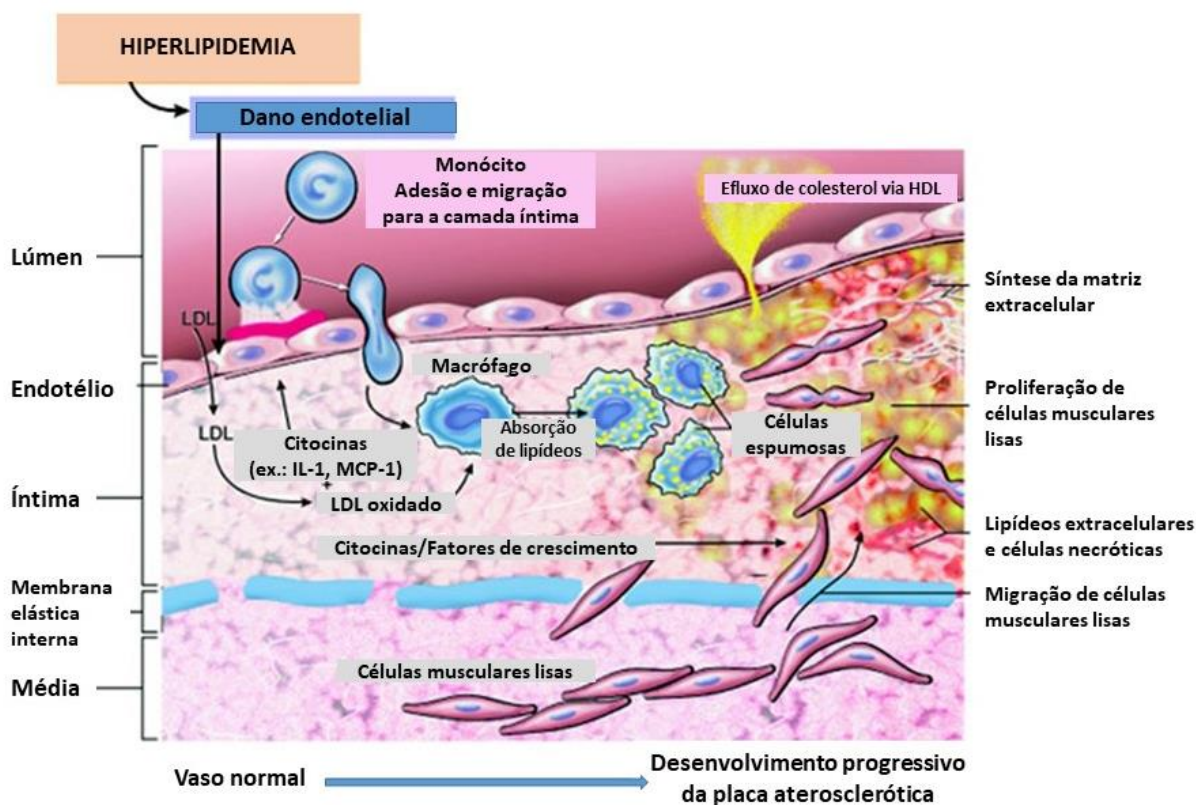
Uma relação causal entre hiperlipidemia e aterosclerose vem sendo demonstrada a mais de 100 anos, porém, até a década de 1980, esse fato recebeu pouca atenção da prática clínica, tornando cada vez mais necessária uma hipótese detalhada e aceitável sobre o papel do colesterol e das lipoproteínas na patogênese da aterosclerose. Dessa forma, o desenvolvimento de um esquema patogênico mostrando como o LDL e outras lipoproteínas pró-aterogênicas penetram na parede da artéria e originam as células espumosas; juntamente com o detalhamento de receptores específicos de macrófagos envolvidos, facilitaram a aceitação da hipótese lipídica e, conseqüentemente, a adoção de medidas preventivas da hiperlipidemia como uma meta mundial de saúde pública (STEINBERG, 2005).

Níveis excessivos de LDL circulantes, associados a níveis insuficientes de HDL, prejudicam o transporte de colesterol na corrente sanguínea, fazendo com que este seja depositado na parede arterial e dando início ao processo de agressão ao endotélio vascular (ZÁRATE et al., 2016). Como consequência, a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas aumenta e, retidas no espaço subendotelial, as partículas de LDL sofrem oxidação e tornam-se imunogênicas. O surgimento de moléculas de adesão leucocitária, estimulado pela presença de LDL-oxidada (LDL-ox), faz com que monócitos migrem para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos que, por sua vez, captam LDL-ox e formam as células espumosas, marcadoras iniciais da lesão aterosclerótica (FENG et al., 2018). Os macrófagos então ativados, juntamente com outras células inflamatórias como linfócitos T, levam à evolução da placa aterosclerótica e amplificação da inflamação através da secreção de citocinas pró-inflamatórias e enzimas proteolíticas capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais (RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Esse ambiente pró-inflamatório estimula a proliferação das células musculares lisas da camada média arterial e a migração destas para a camada íntima, contribuindo para liberação de fatores de crescimento e para um aumento da matriz extracelular formadora da capa fibrosa da placa aterosclerótica (FALUDI et al., 2017). Um esquema do processo aterosclerótico está representado na Figura 3.

O depósito de lipoproteínas na parede arterial ocorre de maneira proporcional à concentração destas lipoproteínas no plasma (FALUDI et al., 2017). Além disso, a presença contínua de hipercolesterolemia é necessária para a manutenção e progressão da lesão, pelo menos no caso de lesões relativamente precoces. Dessa forma, a hiperlipidemia como iniciadora do processo aterosclerótico e a inflamação como resposta à lesão vascular causada

pelo acúmulo de lipoproteínas são fatores complementares na patogênese da aterosclerose (STEINBERG, 2002).

Figura 3 – Formação da placa aterosclerótica



Fonte: (Adaptado de RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2014)

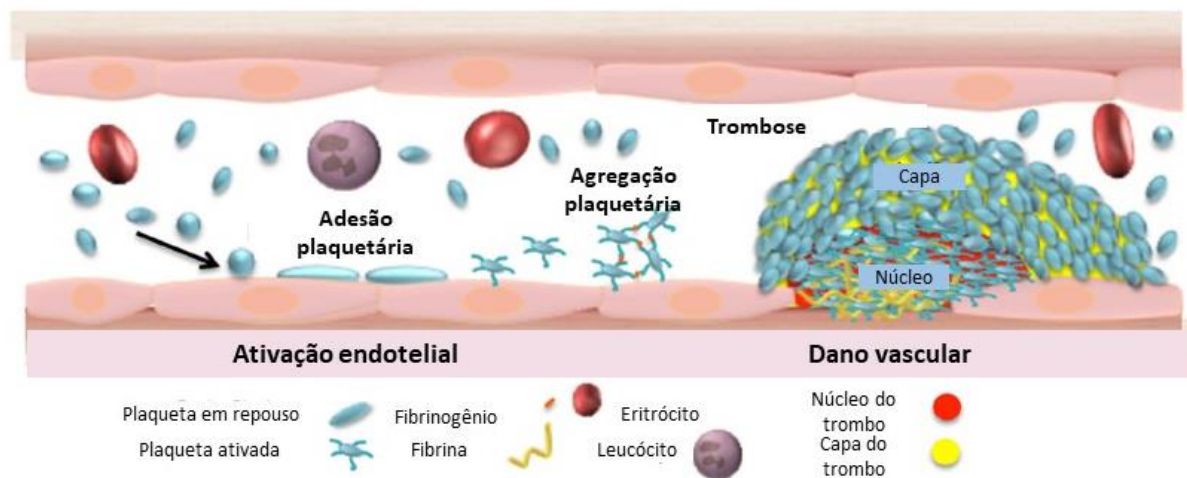
2.4 PLAQUETAS E SEU PAPEL NA HIPERLIPIDEMIA

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea. Possuem uma alta rotatividade no corpo, já que sua vida dentro do vaso sanguíneo dura em torno de 5-10 dias, sendo posteriormente removidas pelo baço (YEUNG; LI; HOLINSTAT, 2018). As plaquetas são as principais responsáveis pela coagulação sanguínea e manutenção da hemostasia, intervindo rapidamente quando a integridade do vaso é afetada. Essa intervenção é facilitada pela sua localização próxima a parede do vaso (HOLINSTAT, 2017). Além dessas funções, sabe-se que as plaquetas possuem papel importante durante outros processos fisiopatológicos, incluindo imunidade e inflamação (VON HUNDELSHAUSEN; WEBER, 2007).

Sob condições patológicas, como a aterosclerose, a lesão vascular resulta em hiperatividade plaquetária e consequentemente pode levar a formação de trombo oclusivo,

infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (YEUNG; LI; HOLINSTAT, 2018). Assim, o papel das plaquetas na aterogênese vai desde a iniciação da ativação endotelial até à progressão das lesões ateroscleróticas, que resultam muitas vezes em graves complicações tromboembolíticas (MASSBERG et al., 2002). Uma representação simplificada do envolvimento das plaquetas durante a ativação endotelial e dano vascular está demonstrada na Figura 4.

Figura 4 – Papel das plaquetas na homeostase e trombose



Fonte: (Adaptado de HOLINSTAT, 2017, p.6)

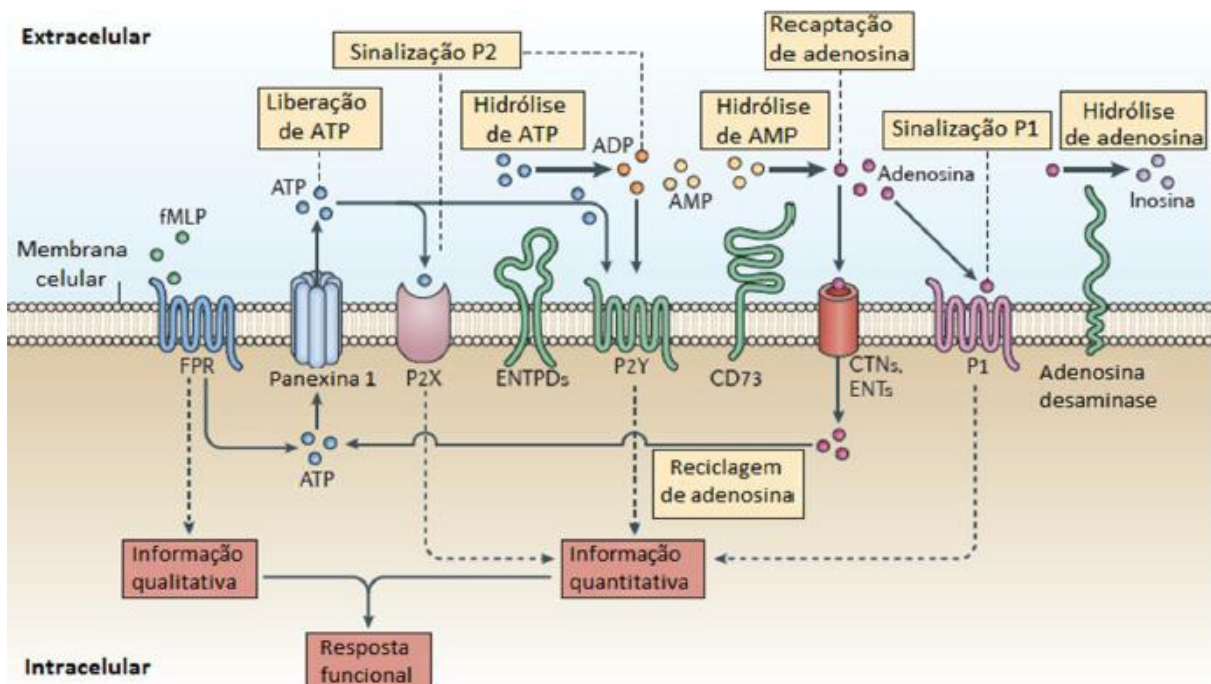
Quando ocorre uma lesão vascular, as plaquetas se ligam à matriz extracelular (MEC) subendotelial através de múltiplos receptores, incluindo os receptores de colágeno e do fator von Willebrand (vWF) que são ativados pela formação do complexo glicoproteico (GPIIb/IIIa). Após a adesão à MEC subendotelial, as plaquetas sofrem disseminação, ativação e agregação para formar o trombo (HOLINSTAT, 2017). Durante a ativação plaquetária, essas células liberam grânulos ou sinais que auxiliam no recrutamento e ativação de outras plaquetas localizadas próximas ao trombo. Essa sinalização via secreção de grânulos pode ser mediada por feedback positivo autócrino e por sinalização parácrina, estimulando as plaquetas circulantes ou fracamente ligadas a se integrarem ao coágulo existente para formar um tampão plaquetário irreversível no local da lesão (YEUNG; LI; HOLINSTAT, 2018). Além disso, a ativação plaquetária é reforçada pela interação entre prostaglandinas E2 (PGE2) e tromboxano A2 (TXA2) com respectivos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) presentes na membrana das plaquetas (YEUNG; HAWLEY; HOLINSTAT, 2017).

Dessa forma, a hiperlipidemia está associada a um aumento da reatividade plaquetária e progressão da placa aterosclerótica, quando estas, aderidas ao endotélio comprometido pelo acúmulo de LDL-ox, promovem a liberação de moléculas envolvidas na ativação de diversos mecanismos pró-aterogênicos. Esse aumento de reatividade plaquetária está relacionado também a alterações da composição de colesterol da membrana das plaquetas (aumento da relação colesterol/fosfolípido) (NAGY JR. et al., 2011; SHATTIL et al., 1975) e a um aumento da sensibilização das plaquetas à estimulação por colágeno e trombina via complexo glicoproteico GPIIb/IIIa (HACKENG, 1999).

2.5 SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico consiste, sobretudo, de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, responsáveis por mediar a sinalização purinérgica; receptores, sobre os quais essas moléculas se ligam para desempenhar suas funções e ectoenzimas, responsáveis por regular os níveis dos derivados de adenina no meio extracelular (Figura 5) (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). O funcionamento desse complexo sistema está envolvido na regulação de diversos processos intracelulares como neurotransmissão, vasodilatação, agregação plaquetária, resposta imune, inflamação, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2006).

Figura 5 – Representação dos componentes do sistema purinérgico



Fonte: (Adaptado de JUNGER, 2011, p.202)

Os nucleotídeos de adenina, adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), e o nucleosídeo adenosina são secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas e estão normalmente presentes em baixas concentrações no meio extracelular (ZIMMERMANN, 2000). Entretanto, quando em condições patológicas, como na inflamação ou isquemia, esses nucleotídeos são liberados e desencadeiam uma cascata de reações responsáveis pela ativação e sustentação das respostas imunológicas frente ao dano detectado (BURNSTOCK, 2006).

Em condições basais, o ATP está presente no citoplasma celular em baixas concentrações, porém quando as células sofrem algum tipo de dano, essa molécula é liberada do espaço intracelular e contribui para a instauração de uma resposta pró-inflamatória. Em altas concentrações, o ATP estimula a produção de diversos mediadores inflamatórios como as citocinas IL-1, IL-2, IL-12, IL-18 e TNF- α (BOURS et al., 2006). Além disso, o ATP pode apresentar um potencial citotóxico, capaz de levar à morte de diferentes classes de células através da formação de grandes poros na membrana plasmática (FILIPPINI et al., 1990). Na apoptose, por exemplo, a liberação controlada de ATP, através de hemicanais de panexina, funciona como um sinal quimiotático para fagócitos (RAVICHANDRAN, 2011). Outras funções exercidas pelo ATP compreendem a estimulação e proliferação de linfócitos e o aumento da agregação plaquetária (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012).

O ADP desempenha sua principal função durante a ativação plaquetária, sendo a principal molécula liberada dos grânulos intracelulares das plaquetas após a ocorrência de um dano endotelial. Dessa forma, o ADP atua como principal agonista da agregação plaquetária, auxiliando na formação do trombo e contribuindo tanto para a homeostase quanto para a evolução de processos inflamatórios como a aterosclerose (YEUNG; LI; HOLINSTAT, 2018).

Em relação ao AMP, foi revelado recentemente que essa biomolécula possui efeitos antiplaquetários, sendo capaz de inibir a formação do trombo através da redução da liberação de mediadores inflamatórios associados à aterosclerose e da ativação de receptores A2A, o mesmo receptor responsável pelo efeito protetivo da adenosina (FUENTES et al., 2014a). A adenosina, por sua vez, desempenha uma multiplicidade de efeitos imunomodulatórios como supressão da proliferação e das funções efetoras dos linfócitos, promoção da angiogênese e regeneração tecidual e inibição da agregação plaquetária e da inflamação (BOURS et al., 2006).

No espaço extracelular, os nucleotídeos exercem suas funções através da ligação com receptores específicos designados receptores purinérgicos do tipo P2, os quais são divididos

em receptores P2Y (acoplados à proteína G) ou receptores P2X (ligados a canais iônicos). Enquanto o ADP ativa receptores do tipo P2Y, o ATP pode ligar-se tanto a receptores do tipo P2Y, quando em baixas concentrações, quanto a receptores do tipo P2X, quando em altas concentrações extracelulares (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Exemplos de sinalização de receptores de nucleotídeos, em condições inflamatórias, compreendem a sinalização do receptor P2Y6 ou P2X7, que medeiam a inflamação vascular e a sinalização do receptor P2Y1, P2X1 e P2Y12, que medeiam a ativação plaquetária (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012).

A adenosina pode sinalizar através de quatro receptores distintos acoplados à proteína G, denominados receptores do tipo P1. Estes compreendem os subtipos A1, A2A, A2B e A3 (FREDHOLM et al., 2011). Os subtipos de receptores de adenosina estão distribuídos de forma diferente em cada célula alvo. Por exemplo, o A2B é altamente expresso em células endoteliais vasculares, enquanto que o A2A é altamente expresso em plaquetas e células do sistema imunológico, como neutrófilos e linfócitos (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012).

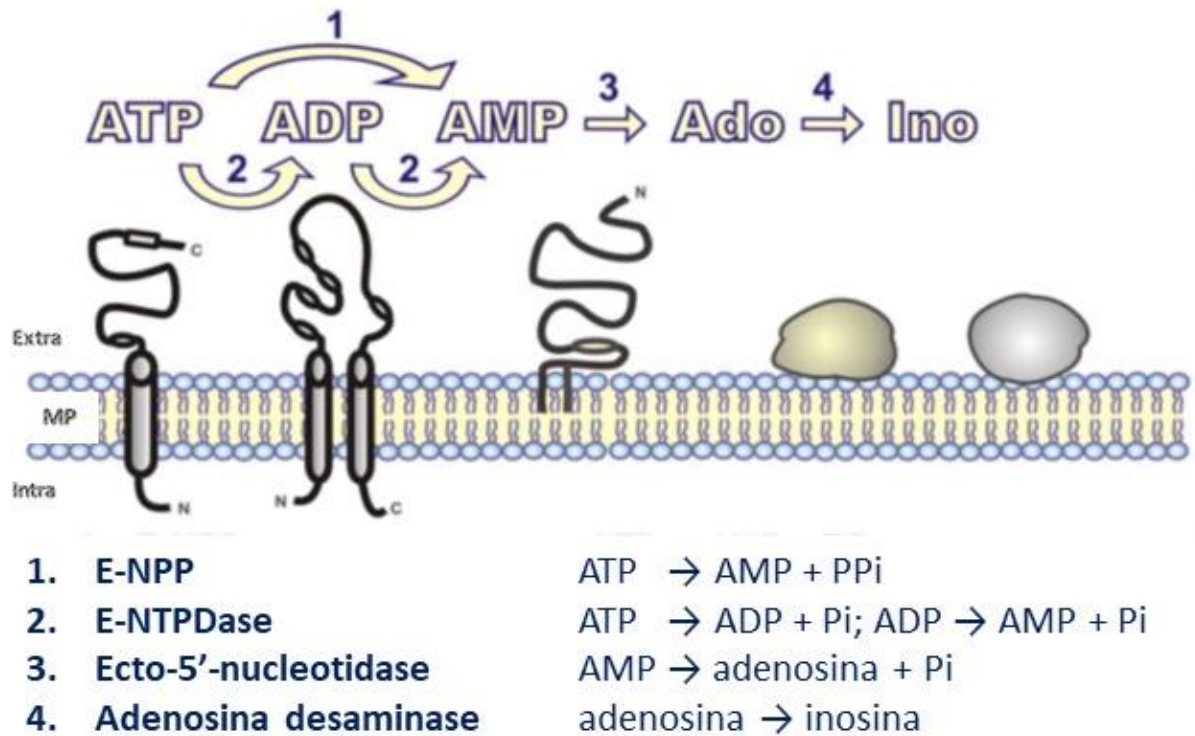
Como os receptores de ATP e ADP e os receptores de adenosina frequentemente traduzem efeitos opostos nos sistemas biológicos, a resposta celular resultante atribui-se tanto à razão entre as concentrações de ADP/ATP e adenosina, quanto aos níveis de expressão e intensidade de sinalização de seus receptores (BURNSTOCK, 2006). Dessa forma, mudar o equilíbrio entre a sinalização P1 e P2 purinérgica é um conceito terapêutico emergente nos esforços para diminuir a inflamação e promover a cura de diversas patologias (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012).

A sinalização induzida pelas moléculas de nucleotídeos depende diretamente da atividade de enzimas ancoradas na superfície da membrana celular, conhecidas como ectonucleotidases. Estas enzimas possuem a importante função de manter os níveis de nucleotídeos extracelulares em concentrações fisiológicas (ZIMMERMANN, 2000). As quatro maiores famílias de enzimas que constituem o grupo das ectonucleotidases incluem: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), fosfatases alcalinas e ecto 5'-nucleotidases (E-5'-NT) (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

A cascata de reações de fosfohidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos inicia-se com a conversão do ATP e do ADP em AMP pela ação da E-NTPDase, ou de forma direta do ATP à AMP pela enzima E-NPP. Na sequência, a enzima E-5'-NT converte o AMP em adenosina que é posteriormente desaminada e convertida em inosina pela ação da ADA (YEGUTKIN,

2008). Um esquema das principais reações e enzimas envolvidas na sinalização purinérgica está demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Principais enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina



Fonte: (Adaptado de YEGUTKIN, 2009, p.675)

As NTPDases constituem uma família de enzimas essencialmente expressas em todos os tecidos e são responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares tri e difosfatados em nucleosídeos monofosfatados, possuindo um papel fundamental na sinalização purinérgica através da atenuação do impacto dos nucleotídeos em seus receptores. Desempenham suas funções na presença de altas concentrações de Ca^{2+} ou Mg^{2+} em pH extracelular fisiológico entre 7 e 8 (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Oito famílias de NTPDases já foram identificadas em mamíferos, sendo quatro delas (NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e NTPDase8) localizadas na superfície celular e quatro (NTPDase4, NTPDase5, NTPDase6 e NTPDase7) localizadas em organelas intracelulares (KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011; ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

A distribuição tecidual da família NTPDase1 está diretamente relacionada às suas funções de modulação da resposta imune celular (DWYER et al., 2007), inflamação, homeostasia do endotélio vascular e trombose (DEAGLIO; ROBSON, 2011). Dessa forma, a

NTPDase 1 é expressa em células imunes, como células NK, monócitos, células dendríticas e subconjuntos de células T ativadas, além de células endoteliais e plaquetas (KOZIAK et al., 1999). Já a NTPDase2 é principalmente expressa na superfície adventícia dos vasos sanguíneos, contribuindo para a homeostasia vascular (SÉVIGNY et al., 2002). A propagação da sinalização do tipo P2 em uma variedade de tecidos especializados é ainda realizada pela ação da NTPDase3 e NTPDase8. A NTPDase3 é expressa no cérebro, rim e nos sistemas digestivos, respiratórios e reprodutivos. Por sua vez, a expressão da NTPDase8 é particularmente presente nos tecidos hepático, renal e entérico (KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011).

A E-5'-NT possui o suprimento de adenosina extracelular, a partir da hidrólise de AMP, como sua principal função. Dessa forma, mudanças na expressão e/ou na atividade dessa enzima, assim como no fornecimento de seu substrato AMP, possuem impacto direto na disponibilidade de adenosina no meio extracelular (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). A E-5'-NT possui uma variada distribuição tecidual, sendo expressa por plaquetas, subpopulações de linfócitos T e B, além de muitas linhagens de células tumorais (JIN et al., 2010). Em relação aos papéis fisiopatológicos da E-5'-NT, estudos demonstram seu envolvimento funcional na imunidade e inflamação (BOURS et al., 2006), regulação da barreira tecidual, adaptação à hipóxia, interações microrganismo-hospedeiro (COLGAN et al., 2006) e no controle imunológico do câncer (ZHANG, 2010).

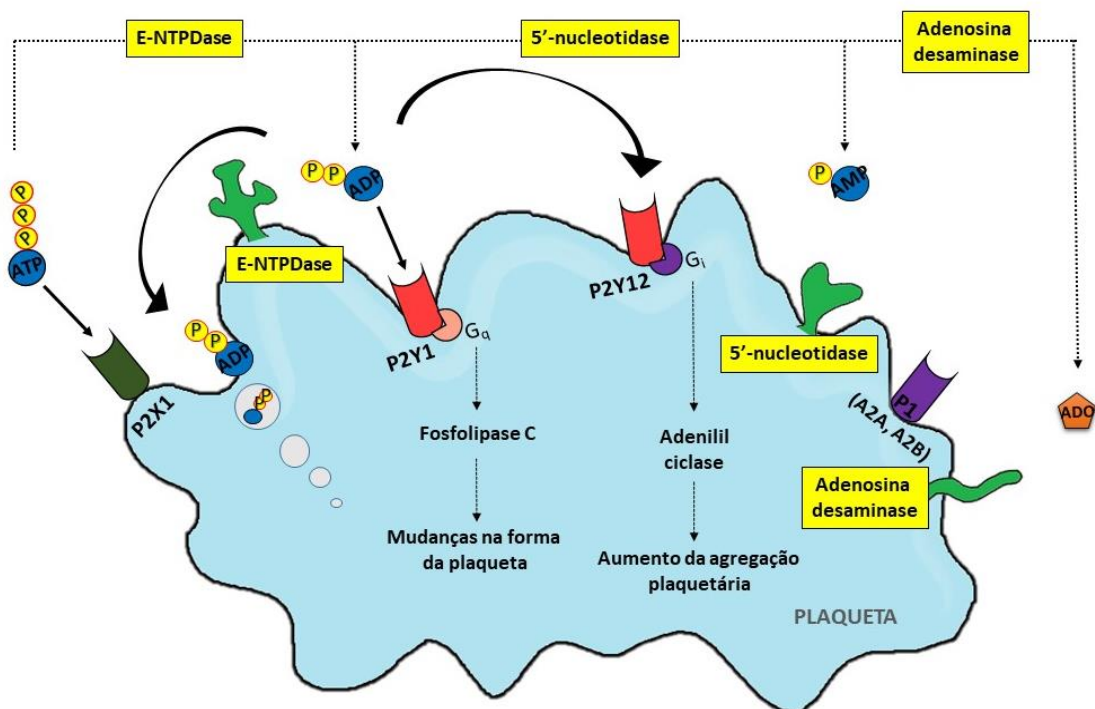
A ADA catalisa a desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente. Está presente em todos os tipos celulares, porém é principalmente encontrada no cérebro, trato gastrointestinal e em tecidos linfoides, especialmente baço e timo (YEGUTKIN, 2008). Esta enzima possui uma localização tanto citosólica quanto na superfície celular, sendo amplamente expressa na superfície de linfócitos e células dendríticas, onde contribui para a manutenção do estado hiperativo dessas células durante o processo inflamatório através da rápida eliminação de adenosina extracelular (DESROSIERS et al., 2007). Deficiências metabólicas na E-ADA possuem um alto impacto no sistema imunológico e resultam em um quadro de linfopenia e comprometimento da imunidade celular e humoral (WHITMORE; GASPAR, 2016).

2.6 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA COMO REGULADORA DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA

As plaquetas são mediadores críticos durante o processo inflamatório causado pelo aumento de lipídeos na corrente sanguínea e sua atuação nesse cenário deve-se em grande parte à sinalização purinérgica. Em condições inflamatórias, as plaquetas liberam, a partir de grânulos intracelulares, os nucleotídeos ATP e ADP, que através da ativação de receptores específicos como P2Y1, P2X1 e P2Y12, medeiam a ativação plaquetária (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012).

O ADP inicia a agregação plaquetária pela ativação simultânea de P2Y1 e P2Y12, sendo essa a principal via direcionada para prevenção de trombose oclusiva (HOLINSTAT, 2017). A ligação do ADP ao receptor P2Y1 ativa a enzima fosfolipase C e desencadeia mudanças subsequentes na forma das plaquetas. Já a ativação dos receptores P2Y12 ativa a proteína G_i e diminui a atividade da adenilil ciclase, contribuindo para a ativação de receptores de fibrinogênio (complexo glicoproteico GPIIb/IIIa) e aumento da agregação plaquetária (DORSAM; KUNAPULI, 2004; ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012). As plaquetas também expressam receptores P2X1, que participam tanto da modulação da agregação plaquetária quanto da regulação das mudanças de forma das plaquetas após a ativação destas por ADP ou ATP (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012). Essas vias de sinalização purinérgica nas plaquetas foram ilustradas na Figura 7.

Figura 7 – Sinalização purinérgica nas plaquetas



A utilização de antagonistas do receptor P2Y12 tem demonstrado efeitos terapêuticos benéficos na redução de eventos cardiovasculares e da atividade pró-coagulante das plaquetas em doenças vasculares e metabólicas associadas à dislipidemia. Dessa forma, as evidências de que a sinalização subsequente à ativação do receptor P2Y12 possa ser um dos principais contribuintes para a geração de hiperatividade plaquetária decorrente da hipercolesterolemia são intensificadas. Dentre os mecanismos responsáveis pelo aumento da reatividade plaquetária através do receptor P2Y12 já demonstrados estão o aumento significativo da fosforilação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e da proteína quinase B (Akt) (NAGY JR. et al., 2011).

A homeostasia vascular é assegurada também pela ação das enzimas NTPDases, especialmente dos subtipos NTPDase1 e NTPDase2, presentes na superfície das plaquetas e de células da parede dos vasos sanguíneos (SÉVIGNY et al., 2002). A hidrólise de ADP pró-trombótico pela NTPDase1, presente principalmente no endotélio vascular, contribui para a diminuição da agregação plaquetária e consequente manutenção da fluidez vascular, desempenhando um papel importante na modulação nos processos de inflamação vascular e trombose. Já a atividade da NTPDase 2, expressa majoritariamente na camada adventícia dos vasos, facilita a agregação plaquetária à medida que possui uma maior afinidade por nucleotídeos trifosfatados, resultando em uma rápida hidrólise de ATP, porém lenta conversão de ADP até AMP (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; SÉVIGNY et al., 2002).

O papel da E-5'-NT na função plaquetária e na coagulação sanguínea ainda não é bem definido. Porém, sabe-se que sua contribuição na regulação dessas vias está principalmente associada à geração de adenosina extracelular (COLGAN et al., 2006) e consequentemente à modulação do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária e inibição da adesão de leucócitos. Determinadas disfunções plaquetárias foram observadas em camundongos knockout para E-5'-NT, que demonstraram uma diminuição dos níveis de AMPc como consequência da diminuição de adenosina, juntamente com um menor tempo de sangramento após lesão da cauda ou lesão vascular, resultando em uma resposta inflamatória vascular aumentada e alterações na tromborregulação (KOSZALKA et al., 2004).

Níveis elevados de adenosina estão relacionados à inibição da agregação plaquetária e diminuição do risco de trombose, possuindo, portanto, um efeito cardioprotetor bem estabelecido (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012). A atividade antiplaquetária da adenosina é majoritariamente resultado da interação desse nucleosídeo com o receptor A2A, levando a um aumento dos níveis de AMP cíclico (cAMP) e consequentemente inibição de

vias de sinalização que intensificam o processo de agregação plaquetária como expressão de receptores de colágeno e liberação de ADP (FUENTES et al., 2014b).

Por fim, considerando que o ATP e a adenosina desempenham efeitos divergentes na vasculatura, as atividades das enzimas purinérgicas precisam ser contrabalanceadas de acordo com a função da célula em que se encontram. Dessa forma, a E-ADA possui uma expressão menor em células endoteliais comparadas a células linfoides. Esse balanço resulta também em uma alta atividade da E-NTPDase e E-5'-NT e baixa atividade da E-ADA no endotélio vascular como uma tentativa de compensar os efeitos pró-inflamatórios e pró-trombóticos do ATP e ADP extracelular com a geração de adenosina, agente anti-inflamatório e inibidor da agregação plaquetária. Logo, esse contrabalanceamento possui influência direta no papel exercido pelas plaquetas na manutenção da homeostase vascular (YEGUTKIN et al., 2002).

2.7 TUCUMÃ

O tucumã é um fruto oleaginoso proveniente de uma palmeira amazônica da família *Aracaceae*, conhecida como tucumanzeiro. Sua distribuição abrange toda a floresta amazônica brasileira, de onde ele parece ser nativo, sendo também encontrado no Peru, Colômbia, Bolívia e Guiana Francesa (CAVALCANTE, 1991; KAHN; MILLÁN, 1992). Diversas espécies de tucumã foram identificadas, entre as quais o tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) é uma das espécies de maior relevância e popularidade. Suas características morfofisiológicas e sazonais possibilitam a exploração do tucumã por diversos setores da economia, nutrição e tecnologia (YUYAMA et al., 2008).

O tucumanzeiro constitui uma palmeira resistente e de crescimento fácil, podendo ser encontrado em solos pobres, campos agrícolas e florestas secundárias. Sua disseminação ocorre, sobretudo, de maneira natural já que muitos animais silvestres, como as cotias, se alimentam de seus frutos e enterram suas sementes no solo (KAHN; MILLÁN, 1992). Seu cultivo por agricultores leva um grande período de tempo pois a planta demora de 30 dias a 1 ano para germinar e cresce em média 1 metro por ano, produzindo frutos somente após 7 anos de cultivo quando já apresenta uma altura entre 6 a 9 metros (COSTA; LEEUWEN; COSTA, 2010).

É uma planta de porte alto, possuindo até 25 metros de altura, e composta por um único tronco grosso, coberto por espinhos dispostos em anéis e folhas longas. Seu tronco é utilizado para construção habitacional em zonas rurais, enquanto suas folhas são utilizadas na produção de tapetes, redes e artesanatos. O período de frutificação do tucumanzeiro situa-se

entre os meses de fevereiro a agosto, e seu florescimento se dá de junho a janeiro. Além disso, a palmeira produz em média 3-5 cachos de frutos por ano, cada um contendo em torno de 240 frutos pesando entre 20 a 100 g. Dessa forma, o rendimento médio de um tucumanzeiro por ano é em torno de 12 kg de fruto por árvore (COSTA; LEEUWEN; COSTA, 2010; FAO, 1987). Aspectos das palmeiras e dos cachos contendo frutos do tucumã estão demonstrados na Figura 8.

Figura 8 – Palmeiras de *Astrocaryum aculeatum* e os cachos contendo frutos



Fonte: (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA)

Os frutos possuem um formato ovoide e medem de 4,5 a 6,0cm de comprimento e 3,5 a 4,5cm de diâmetro. São recobertos por uma casca de coloração verde-amarelo e apresentam mesocarpo carnoso, de cor alaranjada ou amarela, com alto teor de pró-vitamina A e elevado valor energético pela sua composição rica em lipídeos (AGUIAR et al., 1980; COSTA; LEEUWEN; COSTA, 2010; YUYAMA et al., 2008). Entretanto, seu peso é constituído em grande parte por um caroço único e volumoso, preenchido por uma massa branca de onde são extraídos o óleo e a manteiga de tucumã utilizados na culinária, formulações cosméticas e produção de biodiesel (BARBOSA et al., 2009). Além disso, a casca do tucumã demonstra uma composição rica em compostos bioativos, em proporções até mesmo maiores do que a polpa, possibilitando sua utilização como fonte de matéria-prima para a indústria farmacêutica e contribuindo para um aproveitamento absoluto do fruto, já que por não ser consumida na alimentação, essa porção do fruto seria descartada (GARCIA, 2012; SAGRILLO et al., 2015). As características dos frutos de tucumã podem ser visualizadas na Figura 9.

Figura 9 – Frutos inteiros, parcialmente descascados e seccionados de *Astrocaryum aculeatum*



Fonte: (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA)

Análises físico-químicas da polpa do tucumã demonstram que o tucumã é um fruto com pouca ou nenhuma suculência, pouco ácido e com baixo teor de açúcares (Tabela 1). Entretanto, constitui uma significativa fonte de pró-vitamina A, β -caroteno e energia, podendo ser utilizado na prevenção de carências nutricionais (YUYAMA et al., 2008).

Tabela 1 – Composição físico-química da polpa (mesocarpo) e polpa desidratada e pulverizada de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)

Componentes	Tucumã	
	In natura	Polpa desidratada
Umidade (%)	48,46 \pm 0,48	1,67 \pm 0,06*
pH	5,89 \pm 0,10	5,71 \pm 0,01
Acidez (%)	0,32 \pm 0,00	0,60 \pm 0,01
Açúcares totais (%)	1,99 \pm 0,03	3,79 \pm 0,02
Açúcares redutores (%)	1,27 \pm 0,04	2,42 \pm 0,01
Proteínas (%)	3,51 \pm 0,00	6,70 \pm 0,00
Lipídios (%)	32,29 \pm 0,33	61,60 \pm 0,62
Cinzas (%)	1,26 \pm 0,09	2,40 \pm 0,17
Carboidratos (%)	14,48 \pm 0,40	27,63 \pm 0,75
Energia (kcal.100 g ⁻¹)	362,57 \pm 1,41	691,73 \pm 2,80
β -caroteno (μ g.100 g ⁻¹)	10286,38 \pm 717,84	12063,29 \pm 882,89
Vitamina A (μ g.100 g ⁻¹)	857,20 \pm 59,82	1005,27 \pm 73,57

Fonte: (YUYAMA et al., 2008, p.410)

Um estudo realizado por Vasconcelos (2010) demonstrou e comparou o perfil de ácidos graxos dos óleos extraídos da polpa e casca do tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) e tucumã do Pará (*Astrocaryum vulgare*) através da utilização de diferentes métodos de extração. Nesse estudo, o tucumã do Amazonas apresentou uma composição

predominantemente formada por ácidos graxos insaturados (85%), sendo o ácido oleico de maior predominância (73%), seguido do ácido linoleico (12%) e ácido palmítico (7%). Os resultados obtidos foram semelhantes em todos os métodos de extração testados, porém diferiram quanto a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados encontrada em cada espécie, sendo o tucumã do Amazonas uma melhor fonte de ácidos graxos insaturados de melhor qualidade.

Outros estudos identificaram um alto teor de compostos fenólicos e flavonoides presente no tucumã (GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010). Gonçalves e colaboradores (2010) identificaram a presença de catequina (79 ± 5 mg/100g) e, quercetina ($2,96 \pm 0,05$ mg/100g) na polpa desse fruto. Já Garcia (2012), além de demonstrar a presença desses compostos bioativos, identificou outros componentes como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina, presentes na casca e polpa do tucumã como demonstrado na Tabela 2. É importante observar que as concentrações referentes a composição do tucumã apresentam variações entre trabalhos científicos distintos. Esse fato reflete a influência que o clima, solo, floração e outras condições ambientais a que o fruto está submetido exerce (SAGRILLO, 2014; VASCONCELOS, 2010).

Tabela 2 – Composição de fenólicos e flavonoides de *Astrocaryum aculeatum*

Compostos	<i>Astrocaryum aculeatum</i>			
	Extrato da casca		Extrato da polpa	
	mg/g	%	mg/g	%
Ácido gálico	3.79 ± 0.01 a	0.38	14.25 ± 0.03 a	1.42
Ácido clorogênico	3.04 ± 0.03 a	0.30	1.19 ± 0.02 b	0.11
Ácido cafeico	8.33 ± 0.11 b	0.83	0.87 ± 0.01 b	0.09
Rutina	30.54 ± 0.04 c	3.05	19.06 ± 0.04 a	1.91
Quercetina	12.72 ± 0.01 d	1.27	6.53 ± 0.07 c	0.65
β -caroteno	62.91 ± 0.05 e	6.29	27.55 ± 0.10 d	2.75

Fonte: (GARCIA, 2012, p.68)

Ao realizar a quantificação de carotenoides em 6 frutos provenientes da Amazônia, De Rosso e Mercadante (2007) demonstraram um papel de destaque para o tucumã como excelente fonte de pró-vitamina A. Neste estudo, entre 60 tipos de carotenoides analisados, 21 foram encontrados no tucumã, resultando em um conteúdo total de carotenoides igual a 62,65

$\mu\text{g/g}$, no qual o all-trans- β -caroteno constitui 75% (47,36 $\mu\text{g/g}$) do total de todos os carotenoides identificados nesse fruto.

Popularmente, o tucumã é amplamente utilizado pela medicina empírica local. Sua semente, por exemplo, é utilizada no combate ao reumatismo (óleo) e na prevenção de derrames e dores de ouvido (extrato líquido). Além disso, acredita-se que fumar a casca da semente desse fruto possa afastar mau-olhado e proteger o corpo de maus espíritos (COELHO-FERREIRA, 2009).

Com base na composição rica em compostos bioativos do tucumã, muitos estudos investigaram e demonstraram seu alto potencial antioxidante e anti-inflamatório. Entretanto, a maioria desses estudos referem-se à espécie *Astrocaryum vulgare* e utilizam o óleo de tucumã como objeto de estudo (BALDISSERA et al., 2017a, 2017b, 2017c; BONY et al., 2012a, 2012b).

Dentre os estudos que investigaram os efeitos *in vitro* do tratamento com tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), Gonçalves e colaboradores (2010) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato da polpa do tucumã através de três métodos diferentes: capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, sequestro de radicais livres do DPPH e capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). O tucumã apresentou alta capacidade antioxidante em todos os testes analisados. No mesmo estudo, os autores investigaram ainda a capacidade do extrato de inibir as enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase. O tucumã foi capaz de reduzir a atividade dessas enzimas, demonstrando um possível potencial antidiabético já que a inibição dessas enzimas evita um aumento brusco de glicose pós-prandial por retardar e prolongar o tempo de digestão de carboidratos e reduzir a proporção de glicose absorvida.

Corroborando com esses achados, Garcia (2012) demonstrou uma expressiva atividade antioxidante dos extratos etanólicos da casca e polpa do tucumã. Para isso, foram realizados os métodos de sequestro de radicais livres do DPPH e potencial reativo antioxidante total (TRAP). O autor avaliou também a citotoxicidade dos extratos de tucumã em cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) através do ensaio colorimétrico com 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e do método de exclusão com azul de tripan. Os resultados demonstraram que o tucumã apresentou um efeito citotóxico quando altas concentrações do extrato foram utilizadas, possivelmente devido à presença excessiva de polifenóis e carotenoides como níveis tóxicos de β -caroteno.

Motivados pelos resultados obtidos, De Souza Filho et al., (2013), investigaram o possível efeito genotóxico do tucumã em PBMC. Através dos resultados do teste cometa, análise de fragmentação do DNA e avaliação da instabilidade cromossômica, foi demonstrado

que o tucumã apresentou efeito genotóxico em PBMC dependente da concentração utilizada e do tempo de exposição. Entretanto, em ambos os estudos realizados por Garcia (2012) e De Souza Filho et al. (2013), a utilização de baixas concentrações de extrato da polpa e casca do tucumã demonstrou ser segura pois não afetou a viabilidade celular ou apresentou efeitos prejudiciais ao DNA.

Utilizando os mesmos ensaios de Garcia (2012), Sagrillo et al. (2015), observou um efeito citoprotetor dos extratos da casca e polpa do tucumã em cultura de linfócitos expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No mesmo estudo, além de aumentar a viabilidade das células expostas ao H_2O_2 , os extratos nas concentrações entre 300 e 900 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram um efeito modulador da apoptose através da diminuição da ativação das caspases 1, 3 e 8.

Esses resultados demonstram que o tucumã apresenta uma série de propriedades terapêuticas demonstradas *in vitro*, porém há uma carência de estudos que demonstrem sua ação *in vivo*. Além disso, considerando seu alto potencial antioxidante e composição rica em compostos bioativos, o tucumã pode apresentar efeitos benéficos no tratamento e prevenção de desordens associadas à geração de estresse oxidativo e inflamação como a hiperlipidemia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito preventivo do extrato de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) na hiperlipidemia e seu papel na regulação da função plaquetária através da determinação da atividade de ectoenzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo de adenina em plaquetas de ratos com hiperlipidemia induzida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em ratos com e sem hiperlipidemia induzida, pretende-se:

- Avaliar a eficácia da indução de hiperlipidemia através da determinação do perfil lipídico e investigar o possível potencial hipolipidêmico do extrato de tucumã nesse modelo experimental;
- Determinar os efeitos da indução de hiperlipidemia e do tratamento com extrato de tucumã em parâmetros bioquímicos;
- Avaliar a atividade sérica de enzimas marcadoras de lesão hepática e investigar o possível efeito hepatoprotetor do extrato de tucumã;
- Analisar os efeitos da indução de hiperlipidemia e do tratamento com extrato de tucumã em parâmetros hematológicos;
- Determinar os efeitos da indução de hiperlipidemia e do tratamento com extrato de tucumã na atividade de ectoenzimas do sistema purinérgico presentes nas plaquetas;
- Investigar uma possível utilização do extrato de tucumã na prevenção da hiperlipidemia.

4 MANUSCRITO

Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) modulates purinergic enzyme activities in platelets of rats with Poloxamer-407-induced hyperlipidemia

Viviane M. Bernardes^{a,b}, Fernanda L. Cabral^{a,c}, Daniela F. Passos^{a,b}, Alessandra G. Manzoni^{a,b}, Matheus H. Jantsch^a, Paulo G. Schimites^{a,c}, Jean L. G. da Silva^{a,b}, Juliana S. de Oliveira^{a,d}, Guilherme L. Dornelles^d, Cinthia M. de Andrade^{a,d}, Ivana B. M. da Cruz^b, Daniela B. R. Leal^{a,b,c*}

^a *Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada (LABIBIO), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.*

^b *Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.*

^c *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.*

^d *Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.*

*** Corresponding author:**

Daniela Bitencourt Rosa Leal (dbitencourtrosaleal@gmail.com)

Fax: + 55 55 3220 8242; Phone: + 55 55 3220 9581

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 20, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) under grant number 88882.182167/2018-01.

Abstract

Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) is an Amazonian palm tree with antioxidant and anti-inflammatory activities. Its fruits are rich in carotenoids, flavonoids, fibers, and unsaturated fatty acids, which may benefit the metabolism of lipids. Hyperlipidemia is a lipid disorder characterized by excessive levels of cholesterol and triglycerides in the blood circulation, which may result in aggression towards vascular endothelium. To maintain homeostasis, platelets become hyperactive and promote the release of several mediators such as adenine nucleotides and nucleosides. The action of these molecules is regulated by ectoenzymes anchored to the surface of the cells. In the vascular environment, these enzymes are important to preserve homeostasis affecting important process such as platelet aggregation. We investigated the effect of tucumã on the activity of purinergic enzymes in platelets of rats submitted to hyperlipidemia. Adult male *Wistar* rats were pretreated with tucumã extract, rutin, and β -carotene by gavage for 30 days. Rutin and β -carotene were used as a comparative standard. Hyperlipidemia was induced by a single intraperitoneal injection of Poloxamer-407. The enzymatic essays ecto-diphosphohydrolyase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT), and ecto-adenosine deaminase (E-ADA) activities were performed 36h post-induction. Tucumã modulated extracellular ADP hydrolysis and adenosine deamination in platelets of rats with induced hyperlipidemia. Even though tucumã did not show a hypolipidemic effect, it might contribute to the maintenance of vascular homeostasis by preventing platelet aggregation and subsequent atherothrombosis, therefore being beneficial for patients with hyperlipidemia.

Keywords: Tucumã; hyperlipidemia; ectonucleotidases; chronic inflammation; rutin; β -carotene

1. Introduction

Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) is a type of palm from the Aracaceae family, which is widely found in the Amazon region [1]. Studies revealed a high therapeutic potential of its fruits owing to the bioactive compounds such as carotenoids and flavonoids in its composition [1, 2]. In addition, tucumã is rich in dietary fibers and unsaturated fatty acids which, when moderately consumed, may improve lipid metabolism [3]. Tucumã has shown health benefits such as anti-inflammatory [4], hypoglycemic and antioxidant properties [5]. Thus, tucumã may have a preventive role in conditions where inflammation and oxidative stress are involved, such as hyperlipidemia.

Hyperlipidemia is a lipid disorder, which represents a major risk factor for chronic inflammation as atherosclerosis [6]. It is characterized by increased levels of total cholesterol (TC), especially low-density lipoproteins (LDL), accompanied by elevated levels of triglycerides (TG) in the blood [7]. Although lipids perform essential physiological functions, excessive levels of LDL increase the chance of developing cardiovascular diseases even in the absence of other risk factors, such as genetic and environmental factors [8].

High levels of circulating TG and LDL, associated with insufficient levels of HDL, delay the transport of cholesterol in the bloodstream, causing its deposition within arterial walls [9]. When retained, LDL particles undergo oxidation and become immunogenic, aggravating the endothelial injury. In response, monocytes migrate to the subendothelial layer where they differentiate into macrophages and capture the LDL-oxidized forming foam cells. Besides macrophage activation, other inflammatory cells, such as T lymphocytes and platelets, contribute to the development of atherosclerotic plaques and the amplification of inflammation through the secretion of cytokines, proteolytic enzymes and other inflammatory mediators [10].

Platelets perform a central role in atherogenesis, from the beginning of the endothelial activation until the progression of atherosclerotic lesions, which may often result in severe thromboembolic complications [11]. Thus, hyperlipidemia can indirectly increase platelet reactivity since their adherence to the vascular walls injured by ox-LDL accumulation, contributes to endothelium activation and further release of pro-inflammatory mediators, boosting the inflammatory response [12]. Furthermore, a significant reduction in leukocyte infiltration and atherogenesis was demonstrated when platelet adhesion is inhibited in hypercholesterolemic rats [11].

Adenine nucleotides (ATP: adenosine triphosphate, ADP: adenosine diphosphate, and AMP: adenosine monophosphate) and the nucleoside adenosine are important modulators of platelet function [13]. These molecules are secreted by leukocytes, platelets, and damaged endothelial cells, playing an essential role in the onset and maintenance of immune responses. In addition, when interacting with purinergic receptors, they are responsible for triggering a cascade of reactions involved in several biological processes, such as platelet aggregation, inflammation, and modulation of cardiac function [14, 15].

The purinergic signaling directly depends on the activity of ectoenzymes anchored to the surface of the cells, which maintain the levels of extracellular adenine nucleotides and nucleosides at physiological concentrations. The main purinergic ectoenzymes include the E-NTPDase (ecto-diphosphohydrolase), which catalyzes the hydrolysis of ATP and ADP in AMP [16], E-5'-NT (ecto-5'-nucleotidase), which hydrolyzes AMP to adenosine [17, 18], and the enzyme E-ADA (ecto-adenosine deaminase), responsible for regulating adenosine concentrations by deamination of adenosine to inosine [15]. These enzymes are crucial to the maintenance of homeostasis by platelets since they regulate the extracellular levels of ATP and ADP, agonists of platelet aggregation, as well as producing adenosine, an antithrombotic agent [19].

Since hyperlipidemia is a condition associated with oxidative stress and inflammatory disorders, which increases platelet reactivity leading to changes in the purinergic signaling, we evaluated the high therapeutic potential of tucumã in the prevention of the endothelial damage associated with this condition. The effect on tucumã in hyperlipidemia through the modulation of purinergic signaling in platelets has not yet been explored. In addition, the discovery of a preventive or adjuvant therapy for hyperlipidemia may reduce the mortality and costs associated with cardiovascular diseases. Thus, it is of high relevance to investigate the potential therapeutic action of tucumã in hyperlipidemia by determining its effects on the activities of purinergic enzymes in platelets.

2. Material and methods

2.1. Reagents

The reagents bovine serum albumin, coomassie brilliant blue G, rutin hydrate, Poloxamer-407, and the substrates ATP, ADP, AMP, and adenosine were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4) was purchased from Reagen Produtos para Laboratórios Ltda (Brazil). Pure powder of β -carotene was

obtained from a compounding pharmacy (Dermapelle, Santa Maria, RS, Brazil). For HPLC analysis, methanol, phosphoric acid, gallic acid, ellagic acid and caffeic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and quercetin, rutin, kaempferol, catechin, and β -carotene from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2 Collection of Plant Material and Preparation of Extract

Tucumã fruits were obtained from a native forest located in the Amazon region (3.08°S, 60.01°W), near Manaus city (Amazonas State, Brazil). Fruits were collected in February/2016 and a voucher specimen (No. 010547/2013-4) has been deposited in the herbarium of Federal University of Santa Maria, RS, Brazil. The extract was performed as described by Sagrillo et al. [1] with some modifications. Pulp and peel of the fruit were combined in the same extract. Tucumã pulp and peel samples were manually removed, titrated and placed into amber glass jars with absolute ethanol solution at a ratio of 1:5 (w/v) over four days at room temperature. At the day five, the homogenate was filtered through filter gauze and Whatman No. 1 filter paper. Ethanol was then removed by rotary evaporator at reduced pressure, 25 °C at 115 rpm. Finally, the extract was lyophilized and stored at -20°C until its usage.

2.3 Quantification of compounds of tucumã extract

High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Autosampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD (diode) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) at a concentration of 12 mg/mL was injected by means of a model SIL-20A Shimadzu Autosampler. Separations were carried out using a Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm x 5 μ m particle size). The mobile phase was water with 1% phosphoric acid (v/v) (solvent A) and HPLC grade methanol (solvent B) at a flow rate of 0.6 mL/min and injection volume 40 μ L. The composition gradient was 5% solvent B reaching 15% at 10 min; 30% solvent B at 25 min, 65% solvent B at 40 min and 98% solvent B at 45 min, followed by 50 min at isocratic elution until 55 min. At 60 min the gradient reached the initial conditions again, following the method described by Brum et al. [20] with slight modifications. The sample and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the methanol at a concentration range of 0.03–0.50

mg/mL. Quantifications were carried out by integration of the peaks using the external standard method, at 254nm for gallic acid; 280nm for catechin; 325nm for caffeic acid and ellagic acid; 366 for quercetin, rutin, and kaempferol; and 450nm for β -carotene. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600nm). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

2.4 Animals

The experiment was performed with adult male heterogenic Wistar rats (130–150 days; 350–450g) from the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM). All animal procedures were approved and carried in accordance with the Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (protocol number: 114/2014). The following conditions were applied: constant temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$); 12h light/dark cycle; standard pelleted food and water *ad libitum*.

2.5 Experimental procedure

The animals were pretreated with tucumã extract (250mg/kg), rutin (3.2mg/kg) and β -carotene (6.5mg/kg) for 30 days. The rats were randomly divided into hyperlipidemic and control rat groups and subdivided into eight groups of seven animals each: control (C); control+tucumã (C+T); control+rutin (C+R); control+ β -carotene (C+B); hyperlipidemic (H); hyperlipidemic+tucumã (H+T); hyperlipidemic+rutin (H+R); hyperlipidemic+ β -carotene (H+B). After one month of pretreatment, hyperlipidemia was induced by a single intraperitoneal (i.p) injection of P-407 (500mg/kg). P-407 was dissolved in cold, sterile NaCl 0.9% solution [21], so the non-hyperlipidemic rat groups received an i.p. injection of the vehicle at the same volume. Rats were anesthetized with isoflurane and euthanized by exsanguination 36h post-induction. Blood was collected by cardiac puncture for the subsequent enzymatic assays.

2.6 Pretreatment with tucumã extract, rutin, and β -carotene

Tucumã extract, rutin, β -carotene, and vehicle were administered by oral gavage once a day for a period of 30 days. The choice of the dose of tucumã extract (250mg/kg) was based on a previous work from our research group. Rutin and β -carotene were used as a comparative standard since both are major components of carotenoids and flavonoids existent in tucumã. Rutin and β -carotene doses were equivalent to their respective concentrations present in

250mg/kg of the tucumã extract (250mg/kg), determined by HPLC. Controls with saline were performed to correct for vehicle (DMSO 0,08 %) interference. Significant differences between vehicle and saline control activities were not observed (data not shown).

2.7 Hematological and biochemical parameters

Complete blood count was performed in EDTA blood using an automated hematology analyzer (SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnostic, USA).

For biochemical parameters, blood was drawn in serum separator tubes, which were spun at 3500 rpm for 15min at room temperature. Serum levels of glucose, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), albumin, and uric acid were evaluated in a semi-automatic analyzer (TPAnalyzer Plus®, Thermoplate) using commercial kits (Bioclin/Quibasa). The non-HDL-cholesterol (non-HDL-C) was calculated by subtracting HDL-C from TC [22].

2.8 Platelet-rich plasma preparation

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared according to Pilla et al. [23] with slight modifications. Blood was collected in citrate and spun at 1000 rpm for 10 min. PRP was collected and spun at 3700 rpm for 30 min. The pellet was washed with Ammonium Chloride lysis buffer (155mM ammonium chloride, 0,1 mM EDTA and 10mM sodium bicarbonate, pH 7,2) to remove red blood cells. Platelets were then washed with 3.5 mM HEPES isomolar buffer (142 mM NaCl, 2.5mM KCl, and 5.5mM glucose). Finally, platelets were resuspended in HEPES buffer and protein was determined according to Bradford [24] and adjusted to 0.4–0.6 mg/mL.

2.9 Determination of E-NTPDase and E-5'-NT activities

To determine E-NTPDase activity, twenty microliters (20 μ L) of platelets were added to 160 μ L of reaction medium (5.0 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 50 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4), and pre-incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was started by adding 20 μ L of ATP (1.0 mM) or ADP (1.0 mM) followed by a 60 min incubation. The final volume of the mixture was 200 μ L and the method was previously described by Pilla et al. [23]. To stop the reaction, 200 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA) was added to the tube. Samples were run in triplicate with two corresponding blank tubes containing only reaction medium and substrate. After stopping the reaction, platelets (20 μ L)

were added to the blank tubes for correction of non-enzymatic hydrolysis of nucleotides. The measurement of released inorganic phosphate (Pi) followed Chan method [25] by using KH_2PO_4 as standard and malachite green as the colorimetric reagent. Results are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

E-5'-NT activity was measured using the same protocol described above, except that the 10 mM MgCl_2 was used instead of 5 mM CaCl_2 in the reaction medium and the reaction started by the addition of AMP (2.0 mM).

2.10 Determination of E-ADA activity

Platelet E-ADA activity was determined according to Giusti and Galanti method [26]. Fifty microliters (50 μL) of platelets and 450 μL of adenosine (21 mmol/L) were incubated at 37 °C for 60 min. A solution of phenol (106.2 mM and 167.8 nm sodium nitroprusside) halted the reaction. Samples were run in duplicate with two corresponding blank tubes containing only the substrate. Platelets (50 μL) were added to the blank tubes for correction of non-enzymatic hydrolysis of adenosine. Hypochlorite solution (0,082 %) was then added as a color reagent. Results were expressed in nmol NH_3 /min/mg of protein.

2.11 Statistical analysis

Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. Differences were considered statistically different when $P < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard errors mean (SEM).

3. Results

3.1 Quantification of compounds of tucumã extract

HPLC fingerprinting of *Astrocaryum aculeatum* extract revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 14.73$ min; peak 1), catechin ($t_R = 16.39$ min; peak 2), caffeic acid ($t_R = 24.01$ min; peak 3), ellagic acid ($t_R = 32.18$ min; peak 4), rutin ($t_R = 38.45$ min; peak 5), quercetin ($t_R = 46.93$ min; peak 6), β -carotene ($t_R = 55.12$ min; peak 7) and kaempferol ($t_R = 62.73$ min; peak 8) (Figure 1). Phenolics and flavonoids composition of tucumã extract are present in Table 1.

3.2 Hematological parameters

Results obtained for RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC, WBC, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and platelets are shown in Table 2. HGB and HCT were significantly altered ($P < 0.05$; $n = 7$) in H+B, which demonstrates a decrease of approximately 10% of these levels when compared to C. Other parameters showed no significant difference ($P > 0.05$; $n = 7$) between hyperlipidemic and control rat groups. The pretreatment with tucumã, rutin or β -carotene *per se* did not alter hematological parameters when compared to C.

3.3 Biochemical parameters

The measurements of TC, HDL-C, non-HDL-C and TG are shown in Table 3. A 5-fold increase ($P < 0.001$; $n = 7$) in TC, HDL-C ($P < 0.001$; $n = 7$), and non-HDL-C ($P < 0.05$; $n = 7$) was observed in all hyperlipidemic groups, when compared to C. Similar patterns were observed for TG levels, which were by approximately ten times greater ($P < 0.001$; $n = 7$) in hyperlipidemic rats compared to C.

The results of AST, ALT and ALP activity measurements, as well as TPP, albumin, uric acid and glucose levels, are shown in Table 4. Non-significant ($P > 0.05$; $n = 7$) differences were observed in AST activity. However, there was a significant increase ($P < 0.05$; $n = 7$) in ALT activity in H that was two times higher than in C. The activity of the hepatic enzyme ALP was three times higher ($P < 0.001$; $n = 7$) in H and H+T than in C. However, the elevation of ALP activity was less significant in the pretreated groups H+R ($P < 0.05$; $n = 7$) and H+B ($P < 0.01$; $n = 7$). A significant increase ($P < 0.001$; $n = 7$) in TPP levels was detected in all hyperlipidemic groups: H (22%); H+T (27%); H+R (20%) and H+B (24%) when compared to C. Uric acid measurements had approximately a 5-fold increase ($P < 0.01$; $n = 7$) in all hyperlipidemic groups compared to C. Non-significant ($P > 0.05$, $n = 7$) differences in albumin and glucose levels were observed among all groups. The pretreatment with tucumã, rutin or β -carotene *per se* did not alter biochemical parameters when compared to C.

3.4 E-NTPDase and E-5'-NT activities

Figure 2 shows the effect of pretreatment with tucumã extract, rutin and β -carotene on ATP and ADP hydrolysis by E-NTPDase in poloxamer-407-induced hyperlipidemic rats. E-NTPDase activity results, with ATP as a substrate, are shown in Fig. 2a. The hydrolysis of ATP was significantly increased (51%) in H (10.74 ± 0.59 ; $n = 7$; $P < 0.05$) when compared to C (7.11 ± 0.55 ; $n = 7$; $P < 0.05$). In addition, the results obtained for E-NTPDase activity, with ADP as a substrate, are shown in Fig. 2b, where the ADP hydrolysis was two times higher in H (12.54 ± 1.55 ; $n = 7$; $P < 0.001$) than in C (5.97 ± 0.96 ; $n = 7$; $P < 0.001$). ADP hydrolysis

was also elevated by 75.5 % in H+B (10.48 ± 1.27 ; $n = 7$; $P < 0.05$). H+T and H+R, when compared to H, showed decreased E-NTPDase activity, in 36.3 % (7.98 ± 0.41 ; $n = 7$; $P < 0.05$), and in 53.3 % (5.85 ± 0.19 ; $n = 7$; $P < 0.001$), respectively.

AMP hydrolysis by E-5'-NT is shown in Fig. 2c. E-5'-NT activity was 53.3 % higher in H (2.38 ± 0.15 ; $n = 7$; $P < 0.05$), and 96.9 % higher in H+B (3.05 ± 0.33 ; $n = 7$; $P < 0.001$) than in C (1.55 ± 0.11 ; $n = 7$; $P < 0.05$). E-NTPDase and E-5'-NT activities were not modified in pretreatment with tucumã, rutin or β -carotene *per se* when compared to C.

3.5 E-ADA activity

Results obtained for adenosine hydrolysis by E-ADA are shown in Figure 3. The E-ADA activity showed a significant decrease by 68.8 % in H (1.88 ± 0.44 ; $n = 7$; $P < 0.05$), and 59.7 % group in H+T (2.43 ± 0.29 ; $n = 7$; $P < 0.05$) when compared with C (6.03 ± 0.77 ; $n = 7$; $P < 0.05$). However, H+B (5.46 ± 0.65 ; $n = 7$; $P < 0.05$) showed a 2-fold increase in E-ADA activity when compared to H. E-ADA activity was not modified in pretreatment with tucumã, rutin or β -carotene *per se* when compared to C.

4. Discussion

We investigated the effects of the pretreatment with tucumã in rats with induced-hyperlipidemia. The increase of lipid levels in the blood caused by the induction of hyperlipidemia changed biochemical parameters related to a hepatic injury. Tucumã was not able to prevent these changes and did not show a hypolipidemic effect. Both the induction of hyperlipidemia and the tucumã pretreatment modulated the activity of purinergic enzymes in platelets. Tucumã was able to keep vascular homeostasis by possibly increasing adenosine availability and preventing the changes caused by hyperlipidemia.

Our study demonstrated substantial concentrations of β -carotene and rutin in the combined extract of tucumã peel and pulp. This result corroborates with a previous work, which demonstrates that peel and pulp have the same components, but at different concentrations. The same study revealed the presence of rutin and β -carotene as the major constituents of the extract [1]. The HPLC analysis showed gallic acid, catechin, caffeic acid, ellagic acid, rutin, quercetin, β -carotene and, kaempferol as bioactive components of tucumã. The synergism among these components is likely to be responsible for the antioxidant and anti-inflammatory properties of this fruit.

It has been well documented that the administration of a single dose of P-407 to mice results in hyperlipidemia [22, 27], and repeated exposure could lead to atherosclerosis [28, 29]. This induction model of hyperlipidemia is valuable not only to study the efficacy of new fat-lowering agents but also to simulate pathological characteristics on lipid metabolism. In addition, when compared to high-fat diet models, it requires a shorter period of treatment and does not depend on individual food intake [30]. However, this model of hyperlipidemia requires that the measure of parameters in hyperlipidemia-induced rats are done within a restricted period of time since the levels of lipids reach their highest concentrations 36 h after the administration of P-407 [22] and return to basal levels after approximately 120 h [21]. For this reason, we have chosen a pretreatment rather than a treatment post-induction.

As expected, large increases in TC, non-HDL-C and TG levels were seen 36h after P-407 administration. The elevation of lipid levels observed in this study confirms that hyperlipidemia has been efficiently induced. Johnston et al [31] described one of the main mechanisms of P-407-induced elevation of circulating TG levels, which is a result of inhibition of capillary-bound lipoprotein lipase (LPL), an enzyme responsible for TG hydrolysis. Other mechanisms comprise the inhibition of hepatic lipase (HL), a key enzyme that hydrolyzes TG; the stimulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase activity and inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase (C7 α H), which are the rate-limiting enzymes in the synthesis of cholesterol and bile acid, respectively [29–31].

HDL-C is responsible for the transportation of cholesterol from peripheral tissues to the liver for metabolization. Consequently, elevation of serum HDL potentially prevents atherosclerosis and subsequent coronary heart disease [32]. However, in our study, the HDL-C is elevated as well as in other studies using the same model of P-407-induced hyperlipidemia [27, 33]. In response to P-407-induced hyperlipidemia, the metabolism of HDL is affected by mechanisms such as the inhibition of the endothelial lipase lipolytic action by P-407 [34].

Tucumã failed to prevent the increase of TC, non-HDL-C, and TG in rats submitted to induction of hyperlipidemia by P-407. As tucumã has a high fiber content, as well a high concentration of mono and polyunsaturated fatty acids, which are positively correlated with cholesterolemic control, we expected that the intake of tucumã could have beneficial actions on lipid metabolism. However, considering the timing of this induction model of hyperlipidemia and the acute changes in lipid metabolism, the properties of tucumã may be not sufficient to prevent the increase of blood circulating lipids. Furthermore, the lack of a

hypolipidemic effect related to tucumã ingestion was confirmed by Maia et al. [3] using a high-fat diet model in rats.

Regarding hepatic enzymes, we found a significant increase in serum ALT and ALP levels in the hyperlipidemic groups, whilst AST levels were not altered. Elevations of liver marker enzymes in P-407-induced rats are reported by several studies [10, 35–37], indicating that increases in serum lipids lead to hepatic injury. Elevation of ALT, rather than AST, is prominent in non-alcoholic fatty liver diseases and metabolic syndrome [38]. Hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and low levels of HDL-C are central components in metabolic syndrome [38], as well in hyperlipidemia, which in our study was responsible for liver damage, evidenced by high levels of ALT and ALP. Another possibility is that the elevation of AST was less manifested at the time of sample collection due to its shorter half-life (18h) compared to ALT (36h) [38]. ALP levels were increased in all hyperlipidemic groups, including those that received pretreatment; however, the group pretreated with rutin showed a less pronounced increase. The hepatoprotective effect of rutin was also observed in other hepatotoxicity models following a hypercaloric diet and chronic ethanol consumption [39], and exposure to cadmium and ethanol association [40]. In all these studies, the ability of rutin to preserve liver damage is possibly related to its potential to improve the antioxidant defense system.

In our study, the levels of uric acid are elevated in all hyperlipidemic groups. Increased levels of uric acid as well as lipoproteins in serum contribute to the development of atherosclerosis and are both risk factors for cardiovascular diseases. A pro-oxidant effect of uric acid when the endothelial is disrupted is related to the prothrombotic-setting present in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and probably in hyperlipidemia, as observed in our study. Thus, the prothrombotic environment causes a shift from antioxidant to pro-oxidant redox enhancing inflammation and oxidative stress [41].

E-NTPDase and E-5'-NT have a protective effect against atherosclerosis due to their role in lipid metabolism and immune responses. In the vascular environment, E-NTPDase and E-5'-NT, by generating adenosine, decreases cholesterol efflux and lipid uptake by macrophages, suppressing cell foam formation and reducing lipid levels in the bloodstream [42, 43]. These enzymes also ensure vascular homeostasis by modulating the function of immune cells such as platelets [44], which play a crucial role in hyperlipidemia and atherosclerosis [45]. Our results demonstrate an increase of both E-NTPDase and E-5'-NT activities in platelets of hyperlipidemic rats compared to control rats.

Platelets participate in thrombus assembly promoting an inflammatory and prothrombogenic profile within the arterial wall when levels of cholesterol are elevated [46]. In the presence of high blood cholesterol levels, extracellular signaling molecules as nucleotides and nucleosides modulate a variety of processes related to vascular inflammation [47]. When a vascular injury occurs, platelets bind to the subendothelial extracellular matrix and undergo dissemination, activation, and aggregation to form the thrombus [48]. Activated platelets release ATP and ADP from intracellular granules, as well as other mediators, to aid the recruitment and activation of platelets close to the thrombus [45]. An enhancement of ATP and ADP hydrolysis was already demonstrated in previous studies, *in vivo* [46] as well as *ex vivo* [49]. Duarte et al. [46] demonstrated that the hydrolysis of adenine nucleotides *in vivo* is elevated in platelets of patients with cholesterol levels higher than 150mg/dL, probably indicating a regulatory mechanism to prevent thrombus formation. In the same way, Braun et al. [49] showed an increase in E-NTPDase activity and proinflammatory cytokine secretion *ex vivo* in lymphocytes of hyperlipidemic rats due to the inflammatory process caused by abnormal levels of lipids in the circulating blood.

Tucumã and rutin had a significant effect in preventing the increase in ADP hydrolysis caused by hyperlipidemia. ADP, the main mediator of platelet aggregation and thrombus formation, is rapidly degraded by E-NTPDase in physiological circumstances [46]. In inflammatory conditions, platelets substantially release ADP from its intracellular granules. Excess levels of this nucleotide in the extracellular medium activate specific purinergic receptors, leading to changes in platelet shape as well as exacerbating platelet reactivity and aggregation [50]. Thus, rats pretreated with tucumã and rutin kept the ADP hydrolysis at normal levels, possibly because these compounds prevented the vascular injury caused by hyperlipidemia, which leads to the elevation in ADP levels. A decrease in ADP hydrolysis was also seen by Braun et al. [49] in lymphocytes of hyperlipidemic rats pretreated with quercetin and treated with simvastatin, which is a well-established drug for cholesterol lowering. In addition, a recent investigation by Baldissera et al. [51] found that tucumã oil decreased NTPDase and 5'-NT activities in serum of alloxan-induced diabetic mice, in which inflammation and increase of cholesterol and TG are secondary characteristics of the disease. Tucumã oil prevented upregulation of purinergic enzymatic activities and the increase in blood glucose levels, thus avoiding complications caused by diabetes mellitus [51].

E-ADA is responsible for hydrolyzing adenosine, which retains anti-inflammatory, cardioprotective and analgesic properties [52], as well a role in the metabolism of lipids [53]. Adenosine prevents thrombus formation due to its potential to inhibit platelet activation via

A2A and A2B receptors leading to increased cAMP, which has immunosuppressive effects [54]. Our results demonstrated that hyperlipidemia reduces E-ADA activity. Similar results were observed by Ruchel et al. [55] in lymphocytes of rats with diet-induced hypercholesterolemia. Since adenosine is a consequence of ATP dephosphorylation and the hyperlipidemic state causes an increase in E-NTPDase and E-5'-NT activities, we suggest that E-ADA activity is decreased in hyperlipidemic rats as a regulatory mechanism to maintain sufficient adenosine levels to promote a switch from an inflammatory to an anti-inflammatory response. Hyperlipidemic rats pretreated with tucumã also showed a decrease in adenosine deamination, possibly increasing the availability of adenosine and ensuring its antithrombotic effect. This outcome is important to promote vascular protection in hyperlipidemia.

In our study, the pretreatment with β -carotene significantly decreased HGB and HCT in hyperlipidemic rats but did not alter the other hematological parameters. β -carotene is a natural molecule with several biomedical actions in the human body, such as prevention of oxidative stress, immune system reinforcement, and modulation of cell proliferation and differentiation [56]. Despite its beneficial effects and apparent harmlessness, long-time intake of large doses of β -carotene may result in carotenemia to which individuals with hypercholesterolemia are especially susceptible [57]. In addition, excessive intake of vitamin A, the product of the oxidative cleavage of β -carotene in the body, may result in hypervitaminosis A, which affects the hematopoietic system resulting in anemia [57]. The development of hypervitaminosis A also appears to have hyperlipoproteinemia as a predisposing factor [58]. Thus, the slight modifications in the blood series caused in hyperlipidemic rats pretreated with β -carotene may be due to the increased susceptibility to physiological dysfunctions caused by high levels of lipids in the blood, since the pretreatment *per se* did not cause any change.

The pretreatment with β -carotene significantly increased E-NTPDase, E-5'-NT and E-ADA activities in hyperlipidemic rats. In addition, β -carotene *per se* showed a tendency to positive modulate purinergic enzyme activities, as demonstrated by the significant increase in AMP hydrolysis in normocholesterolemic rats. The exact role of β -carotene as an antioxidant or pro-oxidant agent is controversial [59]. Some oxidative stress-generating conditions, such as cigarette smoke and alcohol intake, are demonstrated to contribute to the pro-oxidant effects of β -carotene, since free oxygen radicals formed during the stress state interact with products of β -carotene, generating a more pro-oxidative and damaging environment for cells [57]. A study demonstrates that a treatment with β -carotene increased UVA-induced DNA damage in fibroblasts, but this pro-oxidant effect was suppressed when β -carotene was

associated with some of the flavonoids naringin, rutin or quercetin [60]. Thus, we suggest that since the pretreatment with β -carotene *per se* already demonstrated a positive modulation in the adenine nucleotide hydrolysis, this potential was increased by induction of hyperlipidemia, which comprehends oxidative stress and inflammation, contributing to the pro-oxidant potential of β -carotene, similarly as occurred in hyperlipidemic rats without treatment.

5. Conclusion

Tucumã presented a modulatory effect on the activity of purinergic enzymes in platelets, despite not showing a hypolipidemic effect. Through the decrease in E-NTPDase and E-ADA activities, tucumã acted in the maintenance of vascular homeostasis. Regulating the levels of extracellular adenine nucleotides and nucleosides is important as they influence other immune cells involved in the inflammatory response against hyperlipidemia. Further studies are necessary to support the use of tucumã in hyperlipidemia.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Sagrillo MR, Garcia LFM, De Souza Filho OC, et al (2015) Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chem* 173:741–748 . doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.067
2. De Rosso V V, Mercadante AZ (2007) Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem* 55:5062–5072 . doi: 10.1021/jf0705421
3. Maia GCHM, Da Silva Campos M, Barros-Monteiro J, et al (2014) Effects of *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Tucumã) on Diet-Induced Dyslipidemic Rats. *J Nutr Metab* 2014: . doi: 10.1155/2014/202367
4. Bony E, Dussossoy E, Michel A, et al (2014) Chemical composition and anti-inflammatory activities of an unsaponifiable fraction of pulp oil from awara

- (*Astrocaryum vulgare* M.). *Acta Hort* 1040:43–48
5. Baldissera MD, Souza CF, Grando TH, et al (2017) Antihyperglycemic, antioxidant activities of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) in alloxan-induced diabetic mice, and identification of fatty acid profile by gas chromatograph: New natural source to treat hyperglycemia. *Chem Biol Interact* 270:51–58 . doi: 10.1016/j.cbi.2017.04.001
 6. Rerkasem K, Gallagher PJ, Grimble RF, et al (2008) Managing hypercholesterolemia and its correlation with carotid plaque morphology in patients undergoing carotid endarterectomy. *Vasc Health Risk Manag* 4:1259–1264
 7. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, et al (2013) Sociedade Brasileira de Cardiologia V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 101:1–20 . doi: 10.1016/S0140-6736(11)60739-3.09-2015-VYT-13-BR-J
 8. Sozen E, Ozer NK (2017) Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. *Redox Biol* 12:456–461 . doi: 10.1016/j.redox.2017.02.025
 9. Zárata A, Manuel-Apolinar L, Saucedo R, et al (2016) Hypercholesterolemia As a Risk Factor for Cardiovascular Disease: Current Controversial Therapeutic Management. *Arch Med Res* 47:491–495 . doi: 10.1016/j.arcmed.2016.11.009
 10. Braun JBS, Ruchel JB, Adefegha SA, et al (2017) Neuroprotective effects of pretreatment with quercetin as assessed by acetylcholinesterase assay and behavioral testing in poloxamer-407 induced hyperlipidemic rats. *Biomed Pharmacother* 88:1054–1063 . doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.134
 11. Massberg S, Brand K, Grüner S, et al (2002) A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *J Exp Med* 196:887–896 . doi: 10.1084/jem.20012044
 12. Sikora J, Kostka B, Marczyk I, et al (2013) Effect of statins on platelet function in patients with hyperlipidemia. *Arch Med Sci* 9:622–8 . doi: 10.5114/aoms.2013.36905
 13. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, et al (2001) Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97:587–600 . doi: 10.1182/blood.V97.3.587
 14. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413–492 . doi: 10.1007/978-3-642-28863-0_5
 15. Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299–309 . doi: 10.1007/s002100000309
 16. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure

- of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502 . doi: 10.1007/s11302-012-9309-4
17. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2:351–360 . doi: 10.1007/s11302-005-5302-5
 18. Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52:44–56 . doi: 10.1002/ddr.1097
 19. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC (2012) Purinergic Signaling during inflammation. *N Engl J Med* 367:2322–2333 . doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial
 20. da Silva Brum E, da Rosa Moreira L, da Silva ARH, et al (2016) Tabernaemontana catharinensis ethyl acetate fraction presents antinociceptive activity without causing toxicological effects in mice. *J Ethnopharmacol* 191:115–124 . doi: 10.1016/j.jep.2016.06.036
 21. Palmer WK, Emeson EE, Johnston TP (1998) Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL / 6 mouse. *Atherosclerosis* 136:115–123
 22. Chaudhary HR, Brocks DR (2013) The single dose poloxamer 407 model of hyperlipidemia; systemic effects on lipids assessed using pharmacokinetic methods, and its effects on adipokines. *J Pharm Pharm Sci* 16:65–73
 23. Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, et al (1996) ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7:225–30 . doi: 10.3109/09537109609023582
 24. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254 . doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
 25. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380 . doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8
 26. Giusti, G., Galanti B (1984) Adenosine deaminase: colorimetric method. HU Bergmeyer, *Methods Enzym Anal* 4:315–323
 27. Sun Y, Woo Y, Geon S, et al (2012) Effects of poloxamer 407-induced hyperlipidemia on the pharmacokinetics of carbamazepine and its 10 , 11-epoxide metabolite in rats : Impact of decreased expression of both CYP3A1 / 2 and microsomal epoxide hydrolase. *Eur Neuropsychopharmacol* 22:431–440 . doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.10.004

28. Johnston TP, Nguyen LB, Chu WA, Shefer S (2001) Potency of select statin drugs in a new mouse model of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Int J Pharm* 229:75–86 . doi: 10.1016/S0378-5173(01)00834-1
29. Johnston TP (2004) The P-407 Induced Murine Model of Dose-Controlled Hyperlipidemia and Atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:595–606 . doi: 10.1097/00005344-200404000-00016
30. Johnston TP, Korolenko TA, Sahebkar A (2017) The P-407-Induced Mouse Model of Dose-Controlled Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Twenty-five Years Later. *J Cardiovasc Pharmacol* 70:339–352 . doi: 10.1097/FJC.0000000000000522
31. Johnston TP, Palmer WK (1993) Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Biochem Pharmacol* 46:1037–1042 . doi: 10.1016/0006-2952(93)90668-M
32. Vergeer M, Holleboom AG, Kastelein JJP, Kuivenhoven JA (2010) The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *J Lipid Res* 51:2058–2073 . doi: 10.1194/jlr.R001610
33. Korolenko TA, Tuzikov F V., Johnston TP, et al (2012) The influence of repeated administration of poloxamer 407 on serum lipoproteins and protease activity in mouse liver and heart. *Can J Physiol Pharmacol* 90:1456–1468 . doi: 10.1139/y2012-118
34. Tanaka H, Ishida T, Johnston TP, et al (2009) Role of endothelial lipase in plasma HDL levels in a murine model of hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb* 16:327–338 . doi: JST.JSTAGE/jat/No844 [pii]
35. Sheneni VD, James DB, Atawodi SE (2014) Ethanolic Extracts of *Vitex Doniana* Possesses Hepatocuractive Property in Poloxamer Induced Hyperlipidemia. *Sci Res* 2:49 . doi: 10.11648/j.sr.20140203.14
36. Warren A, Benseler V, Cogger VC, et al (2011) The Impact of Poloxamer 407 on the Ultrastructure of the Liver and Evidence for Clearance by Extensive Endothelial and Kupffer Cell Endocytosis. *Toxicol Pathol* 39:390–397 . doi: 10.1177/0192623310394212
37. Ruchel JB, Braun JBS, Adefegha SA, et al (2017) Guarana (*Paullinia cupana*) ameliorates memory impairment and modulates acetylcholinesterase activity in Poloxamer-407-induced hyperlipidemia in rat brain. *Physiol Behav* 168:11–19 . doi: 10.1016/j.physbeh.2016.10.003
38. Botros M, Sikaris KA (2013) The de Ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev* 34:117–30

39. Abarikwu SO, Njoku RC, Lawrence CJ, et al (2017) Rutin ameliorates oxidative stress and preserves hepatic and renal functions following exposure to cadmium and ethanol. *Pharm Biol* 55:2161–2169 . doi: 10.1080/13880209.2017.1387575
40. Chuffa LGA, Fioruci-Fontanelli BA, Bordon JG, et al (2014) Rutin ameliorates glycemic index, lipid profile and enzymatic activities in serum, heart and liver tissues of rats fed with a combination of hypercaloric diet and chronic ethanol consumption. *Indian J Biochem Biophys* 51:215–222
41. Hayden MR, Tyagi SC (2004) Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle. *Nutr Metab (Lond)* 1:10 . doi: 10.1186/1743-7075-1-10
42. Kanthi Y, Hyman MC, Liao H, et al (2015) Flow-dependent expression of ectonucleotide tri(di) phosphohydrolase-1 and suppression of atherosclerosis. *J Clin Invest* 125:3027–3036 . doi: 10.1172/JCI79514
43. De Giorgi M, Enjyoji K, Jiang G, et al (2017) Complete deletion of *Cd39* is atheroprotective in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 58:1292–1305 . doi: 10.1194/jlr.M072132
44. Sévigny J, Sundberg C, Braun N, et al (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99:2801–2809 . doi: 10.1182/blood.V99.8.2801
45. Yeung J, Li W, Holinstat M (2018) Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases. *Pharmacol Rev* 70:526–548 . doi: 10.1124/pr.117.014530
46. Medeiros Frescura Duarte M, Loro VL, Rocha JBT, et al (2007) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS J* 274:2707–2714 . doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05805.x
47. Burnstock G (2002) Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:364–373 . doi: 10.1161/hq0302.105360
48. Holinstat M (2017) Normal Platelet Function. *Cancer Metastasis Rev* 36:195–198 . doi: 10.1007/s10555-017-9677-x.Normal
49. Braun JBS, Ruchel JB, Manzoni AG, et al (2017) Pretreatment with quercetin prevents changes in lymphocytes E-NTPDase/E-ADA activities and cytokines secretion in hyperlipidemic rats. *Mol Cell Biochem* 0:0 . doi: 10.1007/s11010-017-3231-6
50. Nagy Jr B, Jin J, Ashby B, et al (2011) Contribution of the P2Y12 receptor-mediated

- pathway to platelet hyperreactivity in hypercholesterolemia. *J Thromb Haemost* 9:810–819 . doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial
51. Baldissera MD, Souza CF, Doleski PH, et al (2017) Treatment with tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) for diabetic mice prevents changes in seric enzymes of the purinergic system: Improvement of immune system. *Biomed Pharmacother* 94:374–379 . doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.113
 52. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, et al (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev* 63:1–34 . doi: 10.1124/pr.110.003285.1
 53. Leiva A, Guzmán-Gutiérrez E, Contreras-Duarte S, et al (2017) Adenosine receptors: Modulators of lipid availability that are controlled by lipid levels. *Mol Aspects Med* 55:26–44 . doi: 10.1016/j.mam.2017.01.007
 54. Johnston-Cox HA, Ravid K (2011) Adenosine and blood platelets. *Purinergic Signal* 7:357–365 . doi: 10.1007/s11302-011-9220-4
 55. Ruchel JB, Rezer JFP, Thorstenberg ML, et al (2016) Hypercholesterolemia and Ecto-enzymes of Purinergic System: Effects of *Paullinia cupana*. *Phyther Res* 30:49–57 . doi: 10.1002/ptr.5499
 56. Bendich A (2004) From 1989 to 2001: What Have We Learned About the “Biological Actions of Beta-Carotene”? *J Nutr* 134:225S–230S
 57. Rutkowski M, Grzegorzcyk K (2012) Adverse effects of antioxidative vitamins. *Int J Occup Med Environ Health* 25:105–121 . doi: 10.2478/S13382-012-0022-x
 58. Ellis JK, Russell RM, Makrauer FL, Schaefer EJ (1986) Increased risk for vitamin A toxicity in severe hypertriglyceridemia. *Ann Intern Med* 105:877–879 . doi: 10.7326/0003-4819-105-6-877
 59. Halliwell B (2007) Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res* 73:341–347 . doi: 10.1016/j.cardiores.2006.10.004
 60. Yeh SL, Wang WY, Huang CH, Hu ML (2005) Pro-oxidative effect of β -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. *J Nutr Biochem* 16:729–735 . doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.012

Figure captions

Fig. 1 Representative high-performance liquid chromatography profile of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) extract, detection UV was at 325nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), caffeic acid (peak 3), ellagic acid (peak 4), rutin (peak 5), quercetin (peak 6), β -carotene (peak 7), and kaempferol (peak 8)

Fig. 2 E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activities with ATP(a), ADP(b) and AMP(c) hydrolysis in platelets of rats with Poloxamer-407-induced hyperlipidemia pretreated with vehicle, tucumã extract (250mg/kg/day), rutin (3.2mg/kg/day) and β -carotene (6.5mg/kg/day). Results were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test and expressed as mean \pm SEM. *The value is significantly different from the control group ($P < 0.05$, n= 7). ***The value is significantly different from the control group ($P < 0.001$, n= 7). #The value is significantly different from the hyperlipidemic group ($P < 0.05$, n= 7). ##The value is significantly different from the hyperlipidemic group ($P < 0.01$, n= 7)

Fig. 3 E-ADA activity in platelets of rats with Poloxamer-407-induced hyperlipidemia pretreated with vehicle, tucumã extract (250mg/kg/day), rutin (3.2mg/kg/day) and β -carotene (6.5mg/kg/day). Results were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test and expressed as mean \pm SEM. *The value is significantly different from the control group ($P < 0.05$, n= 7). #The value is significantly different from the hyperlipidemic group ($P < 0.05$, n= 7)

Table 1 Phenolics and flavonoids composition of the tucumã extract

Compounds	<i>Astrocaryum aculeatum</i>
	mg/g
Gallic acid	8.31 ± 0.02
Catechin	1.07 ± 0.01
Caffeic acid	9.84 ± 0.01
Ellagic acid	8.45 ± 0.04
Rutin	12.76 ± 0.03
Quercetin	1.03 ± 0.01
β-carotene	26.15 ± 0.03
Kaempferol	5.13 ± 0.05

Table 2 Hematological parameters of rats with P-407-induced hyperlipidemia after one month of preventive treatment with tucuma, rutin and β -carotene

Tests	C	C+T	C+R	C+B	H	H+T	H+R	H+B
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.15 \pm 0.20	9.13 \pm 0.13	9.09 \pm 0.16	9.16 \pm 0.16	8.82 \pm 0.58	8.76 \pm 0.13	8.85 \pm 0.82	8.52 \pm 0.15
HGB (g/dL)	15.78 \pm 0.17	15.50 \pm 0.18	15.62 \pm 0.23	15.31 \pm 0.18	15.55 \pm 0.14	15.48 \pm 0.27	15.47 \pm 0.05	14.80 \pm 0.21*
HCT (%)	45.93 \pm 0.61	44.7 \pm 0.51	46.37 \pm 0.75	44.50 \pm 0.59	43.52 \pm 0.31	43.08 \pm 1.00	43.32 \pm 0.61	42.06 \pm 0.54**
MCV (fl)	50.30 \pm 0.69	49.04 \pm 0.68	51.05 \pm 0.56	48.64 \pm 0.67	49.38 \pm 0.42	48.91 \pm 0.68	48.97 \pm 0.43	48.98 \pm 0.52
MCHC (g/dL)	34.35 \pm 0.36	34.62 \pm 0.12	33.65 \pm 0.21	34.37 \pm 0.17	35.68 \pm 0.36	36.12 \pm 0.58	35.70 \pm 0.46	35.72 \pm 0.51
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6.66 \pm 0.51	6.48 \pm 0.84	9.42 \pm 0.99	7.67 \pm 0.73	6.41 \pm 0.48	6.50 \pm 0.56	6.04 \pm 0.63	6.42 \pm 0.36
Neutrophils ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1.94 \pm 0.12	2.10 \pm 0.38	3.05 \pm 0.49	3.50 \pm 0.40	2.05 \pm 0.32	2.35 \pm 0.40	1.88 \pm 0.32	1.86 \pm 0.32
Lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.40 \pm 0.49	4.04 \pm 0.57	6.02 \pm 1.01	3.81 \pm 0.85	3.95 \pm 0.46	3.89 \pm 0.50	3.91 \pm 0.46	4.16 \pm 0.22
Monocytes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.23 \pm 0.06	0.20 \pm 0.05	0.33 \pm 0.08	0.22 \pm 0.08	0.25 \pm 0.10	0.19 \pm 0.05	0.14 \pm 0.04	0.31 \pm 0.06
Eosinophils ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.07 \pm 0.02	0.12 \pm 0.06	0.01 \pm 0.01	0.13 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04	0.04 \pm 0.02	0.09 \pm 0.03	0.08 \pm 0.03
Platelets ($\times 10^5/\mu\text{l}$)	15.69 \pm 0.43	17.80 \pm 0.67	18.24 \pm 1.01	17.11 \pm 0.87	16.61 \pm 1.08	17.07 \pm 0.77	17.30 \pm 0.84	15.31 \pm 0.68

RBC: red blood cells; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC: white blood cells. Results were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test and expressed as mean \pm SEM. *The value is significantly different from the control group ($P < 0.05$, $n = 7$). **The value is significantly different from the control group ($P < 0.01$, $n = 7$).

Table 3 Lipid profile after induction of hyperlipidemia in rats previously treated with tucumã, rutin, and β -carotene

Tests	TC	HDL-C	Non-HDL-C	TG
C	81.83 \pm 4.81	41.00 \pm 3.33	40.83 \pm 2.52	211.0 \pm 52.17
C+T	72.00 \pm 5.03	31.83 \pm 4.59	40.17 \pm 6.46	175.5 \pm 26.90
C+R	99.14 \pm 10.59	41.14 \pm 5.07	58.00 \pm 9.88	167.1 \pm 23.18
C+B	79.14 \pm 4.85	36.14 \pm 2.18	43.00 \pm 5.28	208.6 \pm 46.46
H	462.6 \pm 28.95***	232.3 \pm 35.84***	230.3 \pm 59.63**	2130 \pm 99.88***
H+T	505.6 \pm 10.78***	249.6 \pm 24.64***	256.0 \pm 26.64**	1819 \pm 234.3***
H+R	492.9 \pm 19.11***	267.1 \pm 15.34***	225.7 \pm 13.54**	2041 \pm 123.7***
H+B	438.3 \pm 36.71***	216.4 \pm 45.38***	221.9 \pm 52.06**	1996 \pm 218.0***

TC: total cholesterol (mg/dL), HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol (mg/dL), non-HDL-C: non-high-density lipoprotein cholesterol (mg/dL), TG: triglycerides (mg/dL). Results were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test and expressed as mean \pm SEM. **The value is significantly different from the control group ($P < 0.01$, $n = 7$). ***The value is significantly different from the control group ($P < 0.001$, $n = 7$)

Table 4 Biochemical parameters after induction of hyperlipidemia in rats previously treated with tucumã, rutin and β -carotene

Tests	AST	ALT	ALP	TPP	Albumin	Uric acid	Glucose
C	179.0 \pm 15.8	63.00 \pm 2.75	131.6 \pm 14.75	7.70 \pm 0.14	3.51 \pm 0.14	6.61 \pm 0.96	234.8 \pm 20.68
C+T	211.3 \pm 21.0	61.86 \pm 3.61	135.8 \pm 19.39	7.37 \pm 0.13	3.64 \pm 0.46	5.10 \pm 0.94	228.4 \pm 13.03
C+R	156.4 \pm 6.59	50.29 \pm 3.54	102.0 \pm 21.74	7.54 \pm 0.13	2.92 \pm 0.17	6.20 \pm 0.79	202.9 \pm 12.42
C+B	153.4 \pm 8.02	45.86 \pm 3.87	103.8 \pm 14.03	7.34 \pm 0.13	2.94 \pm 0.13	5.65 \pm 0.34	241.3 \pm 11.58
H	165.0 \pm 12.6	134.8 \pm 24.1*	404.0 \pm 38.42***	9.42 \pm 0.55***	4.80 \pm 0.64	31.16 \pm 6.33**	317.3 \pm 34.94
H+T	130.6 \pm 3.99	86.00 \pm 20.5	391.0 \pm 73.26***	9.82 \pm 0.59***	5.34 \pm 0.82	30.50 \pm 7.12**	329.4 \pm 29.43
H+R	146.8 \pm 11.6	82.80 \pm 23.5	309.8 \pm 20.62*	9.31 \pm 0.62***	5.18 \pm 0.55	32.95 \pm 5.02**	338.0 \pm 24.65
H+B	166.6 \pm 25.4	60.00 \pm 9.82	365.7 \pm 84.23**	9.57 \pm 0.72***	4.68 \pm 0.77	33.88 \pm 7.17**	333.8 \pm 30.74

AST: aspartate transaminase (U/L), ALT: alanine transaminase (U/L); ALP: alkaline phosphatase (U/L); TPP: Total plasma protein (g/dL); Albumin (g/dL); Uric acid (mg/dL); Glucose (mg/dL). Results were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test and expressed as mean \pm SEM. *The value is significantly different from the control group ($P < 0.05$, $n = 7$). **The value is significantly different from the control group ($P < 0.01$, $n = 7$). ***The value is significantly different from the control group ($P < 0.001$, $n = 7$)

Fig. 1

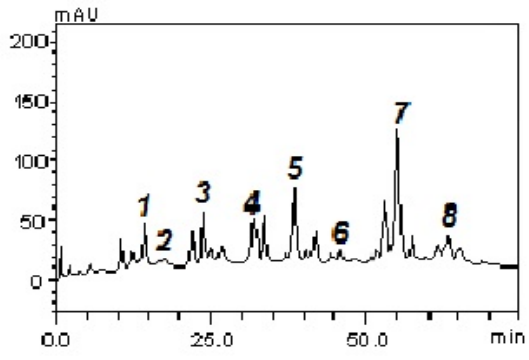


Fig. 2

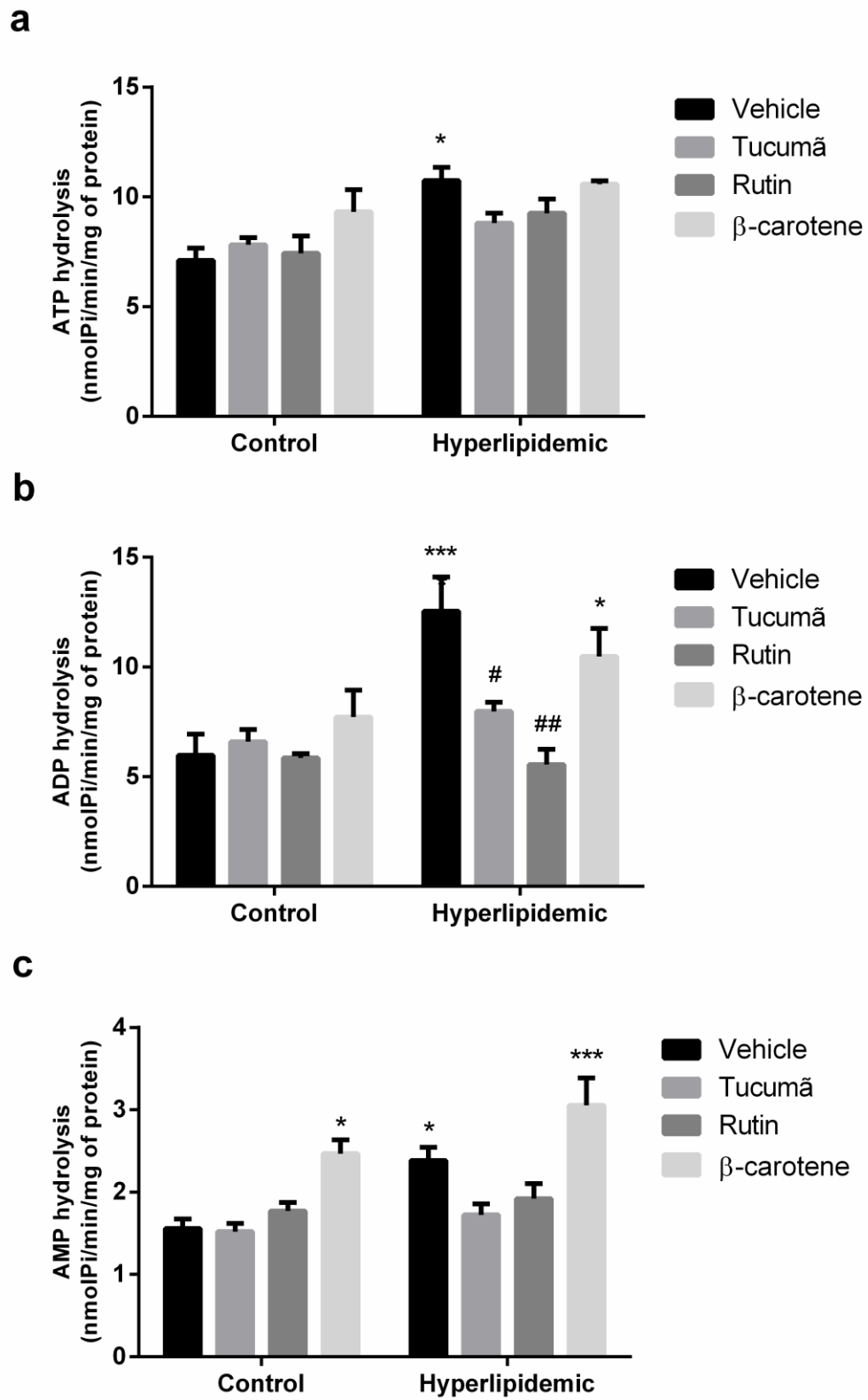
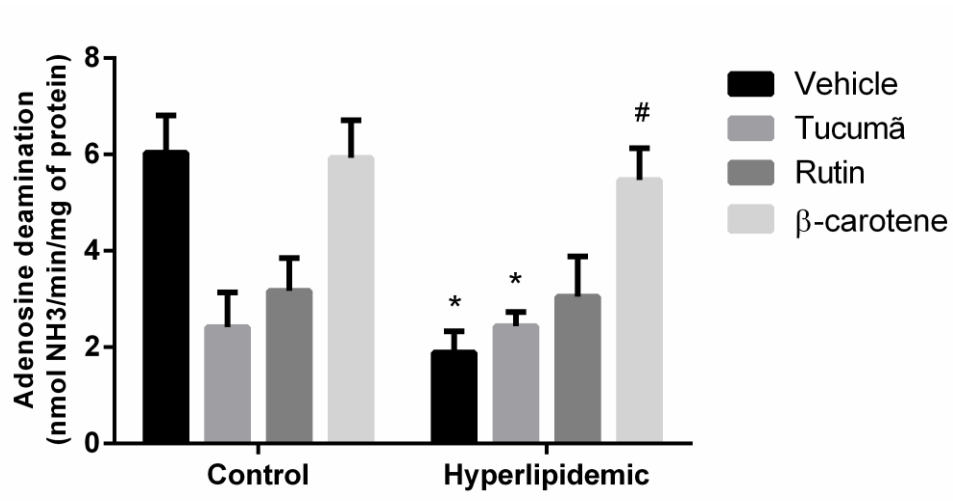


Fig. 3



5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, podem ser feitas as seguintes conclusões:

- A análise do perfil lipídico demonstrou a eficácia da indução, entretanto o extrato de tucumã não foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de lipídeos na corrente sanguínea e não demonstrou efeito hipolipidêmico nesse modelo experimental;
- A indução de hiperlipidemia não alterou os parâmetros bioquímicos glicose e albumina, porém elevou de forma significativa os níveis de ácido úrico e proteínas plasmáticas totais no soro. Esses resultados refletem o aumento de lipoproteínas na corrente sanguínea e corroboram com estudos disponíveis na literatura que demonstram um aumento dos níveis de ácido úrico associado a distúrbios metabólicos. O tratamento com extrato de tucumã não foi capaz de prevenir tais alterações;
- A indução de hiperlipidemia elevou a atividade das enzimas ALT e FAL, demonstrando um possível dano hepático causado pelo excesso de lipídeos na circulação. O tratamento com extrato de tucumã não demonstrou efeito hepatoprotetor neste modelo experimental;
- A indução de hiperlipidemia e o tratamento com extrato de tucumã não demonstraram exercer efeito sobre parâmetros hematológicos;
- O tratamento com extrato de tucumã e a indução de hiperlipidemia apresentaram efeito modulatório sobre a atividade de enzimas do sistema purinérgico presentes na superfície das plaquetas;
- A indução de hiperlipidemia causou um aumento na atividade da E-NTPDase e E-5'-NT e redução da atividade da E-ADA, possivelmente como um mecanismo para regular os níveis de ATP e ADP, importantes agonistas da agregação plaquetária, e elevar os níveis de adenosina, a qual possui propriedades antitrombóticas;
- O aumento da atividade da E-NTPDase em plaquetas, causada pela indução de hiperlipidemia, foi prevenido pelo tratamento com extrato de tucumã. Possivelmente, esse

resultado demonstra uma atuação do tucumã na prevenção do dano causado pela hiperlipidemia e subsequente aumento da liberação dos nucleotídeos de adenina. A atividade da E-ADA em plaquetas foi diminuída pelo tratamento com extrato de tucumã, resultando em um possível aumento da disponibilidade de adenosina a fim de garantir um efeito antitrombótico e promover a proteção vascular;

- Através de sua ação modulatória no sistema purinérgico, o tucumã pode contribuir para a manutenção da homeostase vascular, impedindo uma exacerbação da agregação plaquetária e subsequente aterotrombose. Assim, a utilização do tucumã pode beneficiar pacientes com hiperlipidemia e constitui uma alternativa promissora para redução do número de casos de doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. P. L. et al. Aspectos Nutritivos de Alguns Frutos Da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 4, p. 755–758, 1980.
- BALDISSERA, M. D. et al. Treatment with Tucumã Oil (*Astrocaryum vulgare*) for Diabetic Mice Prevents Changes in Seric Enzymes of the Purinergic System: Improvement of Immune System. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 374–379, 2017a.
- BALDISSERA, M. D. et al. Antihyperglycemic, Antioxidant Activities of Tucumã Oil (*Astrocaryum vulgare*) in Alloxan-Induced Diabetic Mice, and Identification of Fatty Acid Profile by Gas Chromatograph: New Natural Source to Treat Hyperglycemia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 270, p. 51–58, 2017b.
- BALDISSERA, M. D. et al. The Use of Tucumã Oil (*Astrocaryum vulgare*) in Alloxan-Induced Diabetic Mice: Effects on Behavior, Oxidant/Antioxidant Status, and Enzymes Involved in Brain Neurotransmission. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 436, n. 1–2, p. 159–166, 2017c.
- BARBOSA, B. S. et al. Aproveitamento Do Óleo Das Amêndoas de Tucumã Do Amazonas Na Produção de Biodiesel. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 371–376, 2009.
- BHATNAGAR, D.; SORAN, H.; DURRINGTON, P. N. Hypercholesterolaemia and Its Management. **Bmj**, v. 337, p. 503–508, 2008.
- BONY, E. et al. Awara (*Astrocaryum vulgare M.*) Pulp Oil: Chemical Characterization, and Anti-Inflammatory Properties in a Mice Model of Endotoxic Shock and a Rat Model of Pulmonary Inflammation. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 33–43, 2012a.
- BONY, E. et al. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Properties of the Unsaponifiable Fraction from Awara (*Astrocaryum Vulgare M.*) Pulp Oil in Activated J774 Macrophages and in a Mice Model of Endotoxic Shock. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 384–392, 2012b.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-Triphosphate and Adenosine as Endogenous Signaling Molecules in Immunity and Inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.
- BURNSTOCK, G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 1, p. 58–86, 2006.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. ed. Belém: Edições CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991, 279 p.
- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal Knowledge and Plant Utilization in an Amazonian Coastal Community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159–175, 2009.
- COLGAN, S. P. et al. Physiological Roles for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 351–360, 2006.
- CONN, P. M. **Animal models for the study of human disease**. 1 ed. Academic Press, 2013, 1108p.
- COSTA, J. R. da; LEEUWEN, van J.; COSTA, J. A. Tucumã-do-amazonas, *Astrocaryum tucuma Martius*. In: SHANLEY, P. ; SERRA, M ; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. 2 ed. Cifor. 2010 p. 221–228.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062–5072, 2007.
- DE SOUZA FILHO, O. C. et al. The *In Vitro* Genotoxic Effect of Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian Fruit Rich in Carotenoids. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 11, p. 1013–1021, 2013.
- DEAGLIO, S.; ROBSON, S. C. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis,

- Inflammation, and Immunity. **Adv Pharmacol.**, v. 61, p. 301–322, 2011.
- DESROSIERS, M. D. et al. Adenosine Deamination Sustains Dendritic Cell Activation in Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1884–1892, 2007.
- DORSAM, R. T.; KUNAPULI, S. P. Central Role of the P2Y₁₂ Receptor in Platelet Activation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 3, p. 10–15, 2004.
- DWYER, K. M. et al. CD39 and Control of Cellular Immune Responses. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 1–2, p. 171–180, 2007.
- ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic Signaling during Inflammation. **N Engl J Med**, v. 367, n. 24, p. 2322–2333, 2012.
- FALUDI, A. et al. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2 (Supl.1), p. 1–76, 2017.
- FAO. **Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos**. 3. Ejemplos de América Latina, 44/3. FAO, Rome, v. 44, n. 3, 1987, 241 p.
- FENG, M. et al. Impact of Lipoproteins on Atherobiology: Emerging Insights. **Cardiology Clinics**, v. 36, n. 2, p. 193–201, 2018.
- FILIPPINI, A. et al. Ecto-ATPase Activity in Cytolytic T-Lymphocytes. Protection from the Cytolytic Effects of Extracellular ATP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 334–340, 1990.
- FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. **Pharmacological reviews**, v. 63, p. 1–34, 2011.
- FUENTES, E. et al. Protective Mechanisms of Adenosine 5'-Monophosphate in Platelet Activation and Thrombus Formation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 111, n. 03, p. 491–507, 2014a.
- FUENTES, E. et al. Inhibition of Platelet Activation and Thrombus Formation by Adenosine and Inosine: Studies on Their Relative Contribution and Molecular Modeling. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112741, Nov. 2014b.
- GARCIA L. F. M. **Caracterização, avaliação antioxidante e citotóxica dos extratos da polpa e da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*)**. 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- GONÇALVES, A. E. de S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010.
- HACKENG, C. et al. Low-Density Lipoprotein Enhances Platelet Secretion via Integrin- α IIb β 3-Mediated Signaling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 2, p. 239–247, 1999.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.
- HENDRANI, A. D. Dyslipidemia Management in Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Current Guidelines and Strategies. **World Journal of Cardiology**, v. 8, n. 2, p. 201, 2016.
- HOLINSTAT, M. Normal Platelet Function. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 36, n. 2, p. 195–198, 2017.
- HUANG, L. H.; ELVINGTON, A.; RANDOLPH, G. J. The Role of the Lymphatic System in Cholesterol Transport. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. SEP, p. 1–11, 2015.
- HUSSAIN, M. Intestinal Lipid Absorption and Lipoprotein Formation. v. 25, n. 3, p. 200–206, 2014.
- JIN, D. et al. CD73 on Tumor Cells Impairs Antitumor T-Cell Responses: A Novel Mechanism of Tumor-

- Induced Immune Suppression. **Cancer Research**, v. 70, n. 6, p. 2245–2255, 2010.
- JOHNSTON, T. P.; KOROLENKO, T. A.; SAHEBKAR, A. The P-407-Induced Mouse Model of Dose-Controlled Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Twenty-Five Years Later. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 339–352, 2017.
- JUNGER, W. G. Immune Cell Regulation by Autocrine Purinergic Signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 201, 18 Feb. 2011.
- KAHN, F.; MILLÁN, B. *Astrocaryum (Palmae)* in Amazonia: A Preliminary Treatment. **Bulletin Institute Français d'Étude Andines**, v. 21, n. 2, p. 459–531, 1992.
- KOSZALKA, P. et al. Targeted Disruption of Cd73/Ecto-5'-Nucleotidase Alters Thromboregulation and Augments Vascular Inflammatory Response. **Circulation Research**, v. 95, n. 8, p. 814–821, 2004.
- KOZIAK, K. et al. Analysis of CD39 / ATP Diphosphohydrolase (ATPDase) Expression in Endothelial Cells, Platelets and Leukocytes. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 1538–1544, 1999.
- KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; SÉVIGNY, J. Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. **Advances in Pharmacology**, v. 61, p. 263-299, 2011.
- LANGSTED, A.; FREIBERG, J. J.; NORDESTGAARD, B. G. Fasting and Nonfasting Lipid Levels Influence of Normal Food Intake on Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Cardiovascular Risk Prediction. **Circulation**, v. 118, n. 20, p. 2047–2056, 2008.
- MASSBERG, S. et al. A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 7, p. 887–896, 2002.
- NAGY JR., B. et al. Contribution of the P2Y12 Receptor-Mediated Pathway to Platelet Hyperreactivity in Hypercholesterolemia. **J Thromb Haemost.**, v. 9, n. 4, p. 810–819, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2014.
- NELSON, R. H. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Primary Care**, v. 40, n. 1, p. 195–211, 2013.
- RAFIEIAN-KOPAEI, M. et al. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. **Int J Prev Med**, v. 5, n. 8, p. 927–946, 2014.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 3, p. 413–492, 1998.
- RAMASAMY, I. Update on the Molecular Biology of Dyslipidemias. **Clinica Chimica Acta**, v. 454, p. 143–185, 2016.
- RAVICHANDRAN, K. S. Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 445–455, 2011.
- RIFAI, N.; YOUNG, I. Nonfasting Sample for the Determination of Routine Lipid Profile : Is It an Idea Whose Time Has Come ? v. 435, 2016.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase Family of Ectonucleotidases: Structure Function Relationships and Pathophysiological Significance. **Purinergic signalling**, v. 2, p. 409–30, 2006.
- SAGRILLO, M. R. **Efeito in vitro do tucumã (Astrocaryum aculeatum Meyer) na citoproteção ao estresse oxidativo e na modulação da leucemia promielocítica aguda**. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- SAGRILLO, M. R. et al. Tucumã Fruit Extracts (*Astrocaryum Aculeatum Meyer*) Decrease Cytotoxic Effects of

Hydrogen Peroxide on Human Lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741–748, 2015.

SANTOS, R. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n. 2 Supl.2, p. 1–28, 2012.

SÉVIGNY, J. et al. Differential Catalytic Properties and Vascular Topography of Murine Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 Have Implications for Thromboregulation. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2801–2809, 2002.

SHATTIL, S. J. et al. Platelet Hypersensitivity Induced by Cholesterol Incorporation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55, n. 3, p. 636–643, 1975.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Cardiômetro: Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em < <http://www.cardiometro.com.br/>>. Acesso em 12 jul. 2018.

STEINBERG, D. Atherogenesis in Perspective: Hypercholesterolemia and Inflammation as Partners in Crime. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1211–1217, 2002.

STEINBERG, D. Thematic Review Series: The Pathogenesis of Atherosclerosis An Interpretive History of the Cholesterol Controversy, Part III: Mechanistically Defining the Role of Hyperlipidemia. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 10, p. 2037–2051, 2005.

TRAN-DINH, A. et al. HDL and Endothelial Protection. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 3, p. 493–511, 2013.

VASCONCELOS, B. E. C. **avaliação das características físicas, químicas e nutricionais dos óleos do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* e *Astrocaryum vulgare*) obtidos com CO₂ pressurizado**. 2010. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

VON HUNDELSHAUSEN, P.; WEBER, C. Platelets as Immune Cells: Bridging Inflammation and Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 100, n. 1, p. 27–40, 2007.

WHITMORE, K. V.; GASPAR, H. B. Adenosine Deaminase Deficiency - More than Just an Immunodeficiency. **Frontiers in Immunology**, v. 7:314, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Package for Cardiovascular Disease Management in Primary Health Care. **Hearts**, p. 76, 2016.

WÜSTNER, D.; SOLANKO, K. How Cholesterol Interacts with Proteins and Lipids during Its Intracellular Transport. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 9, p. 1908–1926, 2015.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and Nucleoside-Converting Ectoenzymes: Important Modulators of Purinergic Signalling Cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

YEGUTKIN, G. G. et al. The Evidence for Two Opposite, ATP-Generating and ATP-Consuming, Extracellular Pathways on Endothelial and Lymphoid Cells. **Biochem. J.**, v. 367, p. 121–128, 2002.

YEUNG, J.; HAWLEY, M.; HOLINSTAT, M. The Expansive Role of Oxylipins on Platelet Biology. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 6, p. 575–588, 2017.

YEUNG, J.; LI, W.; HOLINSTAT, M. Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases. **Pharmacological reviews**, v. 70, n. 3, p. 526–548, 2018.

YUYAMA, L. K. O. et al. Processing and Shelf-Life Evaluation of Dehydrated and Pulverized Tucuman (*Astrocaryum aculeatum Meyer*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 408–412, 2008.

ZÁRATE, A. et al. Hypercholesterolemia As a Risk Factor for Cardiovascular Disease: Current Controversial Therapeutic Management. **Archives of Medical Research**, v. 47, n. 7, p. 491–495, 2016.

ZHANG, B. CD73: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. **Cancer Research**, v. 70, n. 16, p. 6407–6411, 2010.

ZIMMERMANN, H. Extracellular Metabolism of ATP and Other Nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some Recent Developments and a Note on Nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1–2, p. 44–56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular Function and Molecular Structure of Ecto-Nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.