

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

**EFEITOS DO ÁCIDO GÁLICO NA SINALIZAÇÃO
PURINÉRGICA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE
RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL
DE DIABETES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline da Silva Pereira

Santa Maria, RS, 2017

**EFEITOS DO ÁCIDO GÁLICO NA SINALIZAÇÃO
PURINÉRGICA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE
RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL
DE DIABETES**

ALINE DA SILVA PEREIRA

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

Mestre em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roselia Maria Spanevello

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS, 2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Silva Pereira, Aline
EFEITOS DO ÁCIDO GÁLICO NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM
LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS A UM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES / Aline da Silva
Pereira.- 2017.
56 p.; 30 cm

Orientadora: Rosélia Maria Spanevello
Coorientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2017

1. Diabetes 2. Ácido Gálico 3. Sistema Purinérgico
4. Plaquetas 5. Linfócitos I. Spanevello, Rosélia Maria
II. Chitolina Schetinger, Maria Rosa III. Título.

ALINE DA SILVA PEREIRA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 21 de março de 2017:

Comissão examinadora

Rosélia Maria Spanevello, Prof^a. Dr^a. (UFPel)
(Presidente/Orientador)

Andréia Machado Cardoso, Prof^a. Dr^a. (UFFS)

Francieli Moro Stefanello, Prof^a. Dr^a. (UFPel)

Santa Maria, RS

21 de março, 2017

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me dar forças para seguir, buscar, lutar e finalizar este trabalho, sem Jesus nada disso seria possível. Agradeço imensamente a minha querida e amada mãe, por acreditar que tudo isso seria possível, foi no teu olhar que eu sempre encontrei a razão para seguir a diante!

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por conseguir realizar este trabalho, o grau de mestre, sempre foi um sonho a ser conquistado, e por Jesus ele se tornou realidade. Com Deus eu sempre tive a certeza, de que mesmo com as situações mais atribuladas e difíceis, isso seria vencido, e tudo seria resolvido, e que Ele me colocaria sempre nos caminhos certos.

Agradeço especialmente a minha mãe, Maria de Fátima um exemplo de perseverança, fé, amor, dedicação e entrega total aos meus sonhos, foi tu mãe quem sempre me fez levantar a cada manhã, a vencer cada obstáculo, a seguir em busca do meu sucesso, tu sempre foste o meu motivo para realizar os meus objetivos. Quando eu estava desanimada e frustrada, via no teu olhar, quem eu jamais poderia te decepcionar e assim eu encontrava forças para lutar e seguir a diante, porque quando até eu não acreditava mais em mim, tu sempre acreditou e nunca duvidou que eu chegaria aqui.

Ao meu querido Diego, que esteve comigo em toda essa trajetória acadêmica, dando forças, ouvindo e incentivando e me dando suporte. Obrigada pelo amor, companheirismo, amizade e compreensão durante todo esse trabalho.

Obrigada ao meu amigo Fábio, que me apresentou o caminho da pesquisa, por despertar em mim o gosto pela pesquisa, ensinando o verdadeiro sentido de ser um educador.

A professora Maria Rosa, pela acolhida em seu laboratório, desde o primeiro momento, a senhora abriu as portas e permitiu que o meu sonho fosse possível.

A minha querida orientadora Rosélia, tu és um exemplo de profissionalismo, um exemplo de educadora, um exemplo de amor pelo que faz, dedicada, paciente, responsável, mesmo estando longe, sempre achou uma solução pra tudo. Seu exemplo de simplicidade e dedicação, eu levarei comigo.

A professora Vera, pelo acolhimento durante minha jornada científica.

Aos meus amigos queridos de longa jornada Joseane, Carlos Emir, Nandria, Bruna L.D.S., Juliana, Carolina B.C.R., o meu muito, muito obrigada mesmo por ter a amizade de vocês acima de tudo. Por todo carinho, o apoio, as experiências pessoais e, os conselhos que sempre me deram, ficarão sempre na minha lembrança.

A colega e amiga do laboratório Enzitox, Lizielle, que foi quem me ensinou lá no início, a tratar os animais, e que também fez parte deste trabalho. A Taís, o presente de amizade que o mestrado me deu, sempre apoiando, dando forças, te levarei em meu coração sempre.

Aos colegas do Enzitox, agradeço a vocês pela grande ajuda que sempre me deram no laboratório, tirando dúvidas e ajudando em experimentos. Pela troca de experiências, pela paciência e pelos momentos de descontração e felicidade, cada um de alguma forma contribuiu com esse momento.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A CAPES pelo fomento da minha formação acadêmico e científica.

E a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS DO ÁCIDO GÁLICO NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

AUTORA: ALINE DA SILVA PEREIRA
ORIENTADORA: ROSELIA MARIA SPANEVELLO
CO-ORIENTADOR: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de março de 2017.

O Diabetes mellitus (DM), é uma doença metabólica crônica associada a um quadro de hiperglicemia, alterações inflamatórias sistêmicas e disfunções no endotélio vascular. A NTPDase, 5'- nucleotidase e a adenosina desaminase (ADA) são importantes enzimas envolvidas na regulação das respostas inflamatórias, imunes e plaquetárias e desta forma, podem ser potenciais alvos terapêuticos no DM. O ácido gálico possui muitas propriedades biológicas como ação anti-hiperglicêmica, antioxidante, anti-inflamatória e antiagregante. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ácido gálico sobre parâmetros hematológicos e na atividade de ectonucleotidases em plaquetas, linfócitos e soro de ratos diabéticos. Foram utilizados ratos machos Wistar, os quais foram divididos em quatro grupos: I - controle, II - ácido gálico, III - diabético e IV - diabético/ ácido gálico. O DM foi induzido nos animais por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (65 mg/kg). O ácido gálico foi administrado por via oral sete dias após a indução do DM, na dose de 30 mg/kg, durante um período de 21 dias. Os resultados demonstraram que a administração de ácido gálico não foi capaz de reverter a hiperglicemia dos ratos diabéticos. Em relação aos parâmetros hematológicos, a concentração de hemoglobina corpuscular média foi diminuída enquanto que a distribuição de glóbulos vermelhos foi aumentada no grupo diabético, sendo que o ácido gálico foi capaz de reverter essas alterações. O ácido gálico também reverteu o aumento induzido pelo diabetes da atividade da NTPDase em linfócitos e plaquetas e da atividade da ADA em linfócitos. Por outro lado, em animais do grupo IV ocorreu uma diminuição na atividade da enzima ADA nas plaquetas. Em soro foi observado uma diminuição na hidrólise de ATP e um aumento na hidrólise de ADP e AMP em ratos diabéticos, sendo que o tratamento com ácido gálico reverteu somente às alterações na hidrólise de ATP. Nossos resultados sugerem que o ácido gálico possui efeitos benéficos nas respostas imunes e trombaregulatórias no DM, e que estes efeitos podem estar relacionados à modulação da sinalização purinérgica em linfócitos, plaquetas e soro.

Palavras-chave: Ectonucleotidases, Diabetes mellitus, Ácido gálico, Linfócitos, Plaquetas, soro

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree

Post-Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF GALIC ACID IN PURINERGIC SIGNALING IN LYMPHOCYTES AND PLATELETS OF RATS SUBMITTED TO AN EXPERIMENTAL DIABETES MODEL

AUTHOR: ALINE DA SILVA PEREIRA

ADVISER: ROSELIA MARIA SPANEVELLO

CO-ADVISER: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Date and place of the defense: Santa Maria, March, 21th, 2017.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease associated with hyperglycemia, systemic inflammatory changes and vascular endothelial dysfunction. NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) are important enzymes involved in the regulation of inflammatory, immune and platelet responses and thus may be suitable therapeutic targets in DM. Gallic acid has many biological properties such as antihyperglycemic, antioxidant, anti-inflammatory and antiaggregant actions. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of gallic acid on hematological parameters and on the ectonucleotidases activities in platelets, lymphocytes and serum of diabetic rats. Male Wistar rats were divided into four groups: I - control, II - gallic acid, III - diabetic and IV - diabetic / gallic acid. DM was induced in the animals by injection of streptozotocin (65 mg / kg i.p.). Gallic acid was administered orally seven days after induction of DM, at a dose of 30 mg/kg during to time of 21 days. The results demonstrated that administration of gallic acid was not able to revert to hyperglycemia in diabetic rats. In relation to the hematological parameters, the mean corpuscular hemoglobin concentration was decreased while the red blood cell distribution was increased in the diabetic group, and gallic acid was able to reverse these alterations. Gallic acid also reversed the diabetes-induced increase in NTPDase activity in lymphocytes and platelets and ADA activity in lymphocytes. On the other hand, in animals of group IV was observed a decrease in the activity of the ADA in the platelets. A decrease in ATP hydrolysis and an increase in ADP and AMP hydrolysis in diabetic rats were observed in serum and gallic acid treatment was capable to revert only changes in ATP hydrolysis. Our results suggest that gallic acid has beneficial effects on immune and thromboregulatory responses in DM, and that these effects may be related to the modulation of purinergic signaling in lymphocytes, platelets and serum.

Keywords: Ectonucleotidases, Diabetes mellitus, Gallic acid, Lymphocytes, Platelets

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão bibliográfica:

- Figura 1:** Número total estimado de adultos (20-79 anos) vivendo com diabetes em 2015. Fonte: *International Diabetes Federation, 2015*.....17
- Figura 2:** Enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (Holger, 2012).....22
- Figura 3:** Estrutura química do ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzóico). Fonte: Punithavathi et al. (2011).....25

Manuscrito:

- Figure 1:** Experimental protocol the treatment of gallic acid (30 mg/kg) in a model of diabetes mellitus type 1 (DM1).....45
- Figure 2:** Blood glucose levels of the diabetic and control rats at the onset (A) and the end (B) of the gallic acid treatment. Data were expressed as mean \pm SD. *** Denotes $P < 0.001$ as compared to the others groups (n= 6).....46
- Figure 3:** NTPDase and Adenosine deaminase (ADA) activities on lymphocytes from STZ-induced diabetic rats and treated with gallic acid (30 mg/kg). Data were expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ as compared to the saline group. ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ as compared to the diabetic group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, n= 5-6].....47
- Figure 4:** NTPDase, 5'- nucleotidase and Adenosine deaminase (ADA) activities on platelets from STZ-induced diabetic rats and treated with gallic acid (30 mg/kg). Data were expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ as

compared to the saline group. ### $P < 0.001$ as compared to the diabetic group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, n= 5-6].....48

Figure 5: NTPDase, 5`- nucleotidase and Adenosine deaminase (ADA) activities on serum from STZ-induced diabetic rats and treated with gallic acid (30 mg/kg). * $P < 0.05$ as compared to the saline group. ### $P < 0.001$ as compared to the diabetic group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, n= 5-6].....49

Figure 6: Changes in haematological parameters and ectonucleotidases activities in lymphocytes, platelets and serum found in rats submitted to diabetes experimental model and gallic intake.....50

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Table 1 - Effects of gallic acid in hemogram of the diabetic and control rats. Values are expressed as mean \pm SD. Denotes statistical differences for * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ when compared to others groups. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test $n = 5-6$). MCV (Mean Corpuscular Volume), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) and RDW (Red Blood Cells Distribution Width).....45

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

AG - Ácido Gálico

ADA - Adenosina Desaminase

ADO - Adenosina

ADP - Adenosina Difosfato

AMP - Adenosina Monofosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

DM - Diabetes Mellitus

DM1- Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

HbA1c - Hemoglobina Glicosilada

RDW - Red Cell Distribution Width

STZ - Estreptozotocina

VCM - Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4. METODOLOGIA E RESULTADOS	26
4.1 Manuscrito.....	27
5. CONCLUSÃO	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, associada a níveis aumentados e sustentados de uma hiperglicemia, a qual resulta no distúrbio do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (SOUMYA & SRILATHA, 2011; LIU et al., 2017). A grande maioria dos pacientes diabéticos pertence a umas das principais classes etiopatogênicas: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) ou diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O DM1 é responsável por 5% à 10% dos casos de diabetes, e está associado a falta total de insulina causada pela destruição das células β das ilhotas pancreáticas de Langherans (KIM et al., 2006). Já o DM2 corresponde a cerca de 90% a 95% dos casos e está relacionado a uma hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina podendo resultar em graus variáveis de resistência tecidual ao hormônio (CERF, 2013; SHARAWY et al., 2015).

O DM é uma patologia que está associada à disfunção em diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos e coração (ADA, 2014). A hiperglicemia crônica pode desencadear estresse oxidativo, respostas inflamatórias sistêmicas e alterações no endotélio vascular (DEMIRTUNC et al., 2009; JINDAL et al., 2011). Já é bem estabelecido na literatura que o DM causa alterações nas funções plaquetárias como ativação, agregação, e exagerada adesão, favorecendo assim um estado pró-trombótico (MUDALIAR, 2004; GRANT, 2007; CERBONE et al., 2009; SOAITA & RUBENSTEIN et al., 2017). Além disso, alterações no sistema imunológico, tanto nas respostas celulares quanto humorais, têm sido associadas à patogênese e a progressão especialmente do DM1 (ARMSTRONG et al., 2013; KAMINITZ & ASKENASY, 2016).

Em condições fisiológicas ou patológicas muitas células são capazes de liberar nucleotídeos ou nucleosídeos de adenina como o ATP, ADP e adenosina para o espaço extracelular (DEAGLIO & ROBSON, 2011; SEVIGNY et al., 2015). Estas moléculas ao se ligarem a receptores purinérgicos específicos podem modular vários mecanismos relacionados à inflamação e tromboregulação (BOURS et al., 2006). O ATP é uma molécula que possui funções pró-inflamatórias e imunoestimulantes que contribuem para a

inflamação sustentada e o início de uma resposta imune, enquanto que o ADP é o principal agonista envolvido no recrutamento e agregação plaquetária (ANFOSSI et al., 2002; HERTER, ROSSAINT & ZARBOCK et al., 2014). A adenosina ao se ligar em receptores na superfície celular pode desencadear efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores e antiagregantes (BOURS et al., 2006). As enzimas ecto-nucleosido-trifosfato-difosfo-hidrolase (NTPDases), 5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA) possuem papéis cruciais na duração e magnitude da sinalização purinérgica através da conversão de ATP e ADP em AMP e adenosina em inosina. Juntas, essas enzimas são responsáveis pelo controle das concentrações extracelulares destes nucleotídeos e nucleosídeos, contribuindo para a manutenção da integridade do tecidos (DEAGLIO & ROBSON, 2011).

Evidências científicas demonstram a importância de novas alternativas coadjuvantes para minimizar e prevenir disfunções associadas ao DM. O uso de substâncias antioxidantes tem se mostrado uma estratégia promissora associada ao tratamento convencional desta endocrinopatia (HUANG et al., 2016). Além disso, considerando que alterações no sistema purinérgico estão associadas a complicações do DM, trabalhos prévios têm demonstrado que compostos naturais como resveratrol (Schmatz et al., 2013), quercetina (Maciel et al., 2016), ácido clorogênico e cafeína (Stefanello et al., 2016) também podem modular a atividade de ectonucleotídeos em modelos experimentais de DM.

O ácido gálico é um composto fenólico encontrado em uvas, bagas, frutas cebolas, folhas de chá (verde e preto), erva mate e manga (SAMANIDOU et al., 2012). Esse composto natural tem recebido muita atenção por apresentar potentes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e atividade antihiperlipidêmica (PUNITHAVATHI et al., 2011; KADE & ROCHA, 2013, DE OLIVEIRA et al., 2016). Neste contexto, considerando a importância de encontrar novas alternativas terapêuticas baseadas em compostos naturais para o tratamento do DM, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do ácido gálico em parâmetros hematológicos e na atividade das enzimas do sistema purinérgico (NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA) em linfócitos, plaquetas e soro de ratos submetidos a um modelo experimental de DM1 induzido por estreptozotocina.

2. Objetivos

Objetivo geral:

- Avaliar o efeito do ácido gálico em parâmetros hematológicos e na atividade de ectonucleotidases em linfócitos, plaquetas e soro de ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes.

Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos do ácido gálico no hemograma e leucograma de ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina.
- Analisar a atividade das enzimas NTPDase e adenosina deaminase em linfócitos de ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina e tratados com ácido gálico.
- Determinar os efeitos do tratamento com ácido gálico na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase em plaquetas de ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina.
- Avaliar os efeitos do tratamento com ácido gálico na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase em soro de ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina.

3. Revisão bibliográfica

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica que atinge milhões de pessoas no mundo. Estima-se que a população mundial com diabetes seja na ordem de 387 milhões e que alcance 471 milhões de pessoas em 2035. No Brasil, estima-se que existam 12 milhões de pessoas com DM sendo que o país está em 4º lugar com maior número de diabéticos no mundo segundo as Diretrizes Brasileiras De Diabetes (DBD,2015-2016). Além disso, é importante destacar que o DM, traz consigo uma sobrecarga econômica a sociedade, devido à perda de força de trabalho e ao elevado custo com o tratamento prolongado dessa doença. Essas despesas diretas variam entre 2,5 a 15% do orçamento anual de um país, dependendo de sua prevalência e do grau de complexidade do tratamento disponível. Os gastos com DM pelo sistema único de saúde são da ordem de aproximadamente R\$ 40,3 milhões, sendo 91% dos casos decorrentes de internações hospitalares (DSBD, 2015-2016).

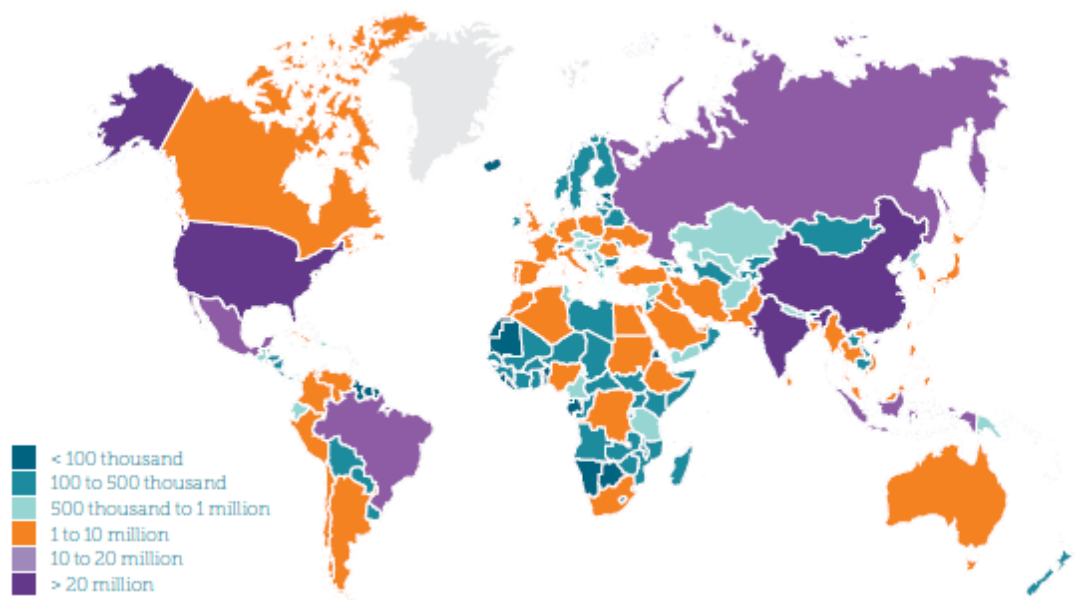


Figura 1: Número total estimado de adultos (20-79 anos) com diabetes em 2015. Fonte: *International Diabetes Federation, 2015.*

O DM é uma doença clínica multifatorial associada a uma hiperglicemia, que desencadeia vários distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (SOUMYA & SRILATHA, 2011; LIU et al., 2017). O DM é considerado um fator de risco para várias outras doenças como patologias cardiovasculares, neuropatias e nefropatias (LAAKSO et al., 2001; DANEMAN, 2006), demonstrando assim, ser um dos principais problemas de saúde mundial (DANA EI et al., 2011).

Essa doença metabólica segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016) e a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2013) é classificada em quatro categorias clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM idiopático e o DM gestacional. A grande maioria dos pacientes diabéticos pertence a umas das principais classes etiopatogênicas: DM1 ou DM2. O DM1 é mais frequente em adolescentes e corresponde a 5% à 10% dos casos sendo associado a falta total de insulina causada pela destruição das células β das ilhotas pancreáticas de Langherans (KIM et al., 2006). A fisiopatologia do DM1 está associada a fatores genéticos e ambientais sendo na maioria dos casos uma condição poligênica, onde os principais genes envolvidos estão no sistema do antígeno leucocitário humano (HLA) classe II (DSBD,2015-2016).

Já o DM2 corresponde a 90% a 95% dos casos e está relacionado a uma hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina podendo resultar em graus variáveis de resistência tecidual ao hormônio (CERF, 2013; SHARAWY et al., 2015). Esse tipo de diabetes é conhecido como não insulino - dependente ou diabetes do adulto e normalmente está associado aos maus hábitos alimentares e ao sedentarismo. Indivíduos com DM2 geralmente são obesos, e a obesidade causa resistência à insulina. Essa hiperglicemia causa um aumento no risco de desenvolver doenças microvasculares (ADA, 2010; DBD, 2015-2016). A prevenção primária do DM2 baseia-se basicamente em intervenções na dieta e na prática de exercícios físicos visando combater o excesso de peso (DBD,2015-2016).

Um dos métodos utilizados como critério de diagnóstico do DM, é a glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl no plasma e a dosagem de hemoglobina glicosilada (HbA1c). A dosagem de HbA1c é um exame muito utilizado para o acompanhamento dos pacientes diabéticos, por ser ele uma forma eficaz de

avaliar os níveis da glicose sanguínea em um período de 60 a 90 dias. Os eritrócitos possuem uma meia vida de 120 dias e a glicose ligada à hemoglobina é diretamente proporcional a concentração média de glicose sanguínea. São considerados diabéticos indivíduos com HbA1c \geq 6,5%, e indivíduos com alto risco para o desenvolvimento da doença aqueles com HbA1c entre 5,6% e 6,4% (WHO,2011).

Dentre os sintomas descritos para o DM pode-se destacar sede anormal, boca seca, micção frequente, falta de energia, cansaço extremo, fome, perda de peso, infecções recorrentes, visão turva, mudanças de humor dentre outros. Além disso, cabe destacar que o DM está associado a danos a longo prazo com disfunção em diferentes órgãos, especialmente nos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (SALGADO & GUERRA, 2014)

É bem estabelecido na literatura que o DM pode causar alterações funcionais nas plaquetas e no endotélio, estresse oxidativo sistêmico e inflamação levando a disfunções cardiovasculares (NDISANG, VANNACCI & RASTOGI, 2014). As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea possuindo importantes funções biológicas relacionadas à homeostasia e a formação de trombos (CASTRO et al., 2006; ENGELMANN B, MASSBERG S., 2013). Na presença de injúria vascular, as plaquetas são ativadas para dar início a cascata de coagulação que vai ser responsável pela hemostase. As plaquetas participam da reparação do dano tecidual através da adesão a superfícies vasculares e ativação e agregação plaquetária por mediadores como o ADP, tromboxano e o colágeno (RUGGERY, 2002; HERTER, ROSSAINT & ZARBOCK, et al., 2014).

Estudos demonstram que no estado hiperglicêmico pode ocorrer uma glicação não enzimática entre glicose e proteínas da membrana levando assim a danos na estrutura e fluidez, e conseqüentemente, alterando a função e a conformação das plaquetas (SANTILLI et al., 2015). Dessa forma, tem sido reportado que pacientes diabéticos são mais propensos a agregação plaquetária espontânea e são hipersensíveis a agonistas como trombina, colágeno e ADP. Estas alterações nas plaquetas parecem contribuir para as complicações do DM uma vez que elas podem favorecer o estado pró-trombótico e aumentar o risco para doenças micro e macrovasculares nesta

endocrinopatia (MUDALIAR, 2004; KOLTAI et al., 2006; GRANT, 2007; MICHNO et al., 2007; CERBONE et. al., 2009; MIRTUNC et al., 2009; JINDAL et al., 2011).

Outro aspecto importante a ser considerado é que alterações no sistema imunológico, tanto nas respostas celulares quanto humorais, também têm sido associadas à patogênese e a progressão especialmente do DM1 (ARMSTRONG et al., 2013; KAMINITZ & ASKENASY 2016). No DM1 o processo de destruição das células β , denominado de insulite, é mediado pela infiltração de células imunes incluindo linfócitos T e B, monócitos, células dendríticas e natural Killer nas ilhotas pancreáticas (ITOH et al., 1993; BALDA & PACHECO – SILVA, 1999; LEBIEN et al., 2008; KNIP, 2012). Além disso, a hiperglicemia crônica é capaz de diminuir a função dos linfócitos bem como aumentar os níveis de citocinas pró - inflamatórias e da proteína C reativa (PICKUP et al., 1997; FROHLICH et al., 2000) tornando o organismo mais propenso a infecções nesta condição patológica.

Os mecanismos relacionados com inflamação e tromboregulação possuem uma associação com vários componentes do sistema purinérgico. A sinalização purinérgica constitui-se atualmente um importante alvo de estudos uma vez que esta é capaz de modular importantes funções biológicas (BURNSTOCK, 2013). O sistema purinérgico é constituído pelos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, os receptores através dos quais estes nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos, e as ectoenzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (YEGUTKIN et al., 2008). O estudo sobre os componentes deste sistema tem permitido elucidar novos alvos biológicos envolvidos na patogênese de diversas doenças além de proporcionar novas abordagens terapêuticas capazes de interferir com mecanismos etiopatogênicos mais específicos (BURNSTOCK, 2014).

Em condições fisiológicas ou patológicas muitas células são capazes de liberar nucleotídeos ou nucleosídeos de adenina como o trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) e adenosina para o espaço extracelular (DEAGLIO & ROBSON, 2011; SEVIGNY et al., 2015). Estas moléculas ao se ligarem a receptores purinérgicos específicos podem modular vários mecanismos relacionados à neurotransmissão, neuromodulação,

proliferação celular, agregação plaquetária, resposta imune, inflamação e tromboregulação (BOURS et al., 2006; DEAGLIO & ROBSON, 2011; SEVIGNY et al., 2015).

O ATP intracelular geralmente é associado com processos que requerem energia, tais como transporte ativo e biossíntese, enquanto que o ATP extracelular é uma importante molécula sinalizadora (YEGUTKIN, 2008). Concentrações elevadas de ATP (5 a 10 mM) estão presentes no citoplasma celular enquanto que no espaço extracelular ele pode ser encontrado em baixas concentrações (DI VIRGILHO, 2000). Entretanto, níveis extracelulares deste nucleotídeo podem aumentar drasticamente em situações de injúria tecidual, morte celular e inflamação (YEGUTKIN, 2008).

No sistema imune, o ATP ao se ligar em receptores do tipo P2X ou P2Y, pode modular a resposta de linfócitos, monócitos, macrófagos, eosinófilos e células dendríticas (DI VIRGILHO et al., 2001; PLACIDO et al., 2006). Este nucleotídeo está envolvido na estimulação e na proliferação de linfócitos bem como na produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 2 (IL-2), interferon γ (IFN- γ) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) (BORSELLINO et al., 2013; SEVIGNY et al., 2015). Por outro lado, o ADP ao se ligar em receptores P2y2 e P2y12 é o principal agonista envolvido no recrutamento e agregação plaquetária (ANFOSSI et al., 2002). Já em relação a adenosina é bem estabelecido que esta molécula possui ações anti-inflamatórias, imunossupressoras e antiagregantes (BOURS et al., 2006; KUMAR & SHARMA, 2009).

As enzimas ecto-nucleosídeo difosfohidrolase (NTPDases), 5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA) possuem papéis cruciais na duração e magnitude da sinalização purinérgica através da conversão de ATP a inosina. A NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP a AMP, a 5'-nucleotidase hidrolisa o AMP até adenosina a qual é subsequentemente degradada pela ação da ADA a inosina (Figura 1). Juntas, essas enzimas são responsáveis pelo controle das concentrações extracelulares destes nucleotídeos e nucleosídeos, contribuindo para a manutenção da integridade do tecido, especialmente quando atuam regulando mecanismos associados a inflamação e tromboregulação (YEGUTKIN, 2008; DEAGLIO & ROBSON, 2011).

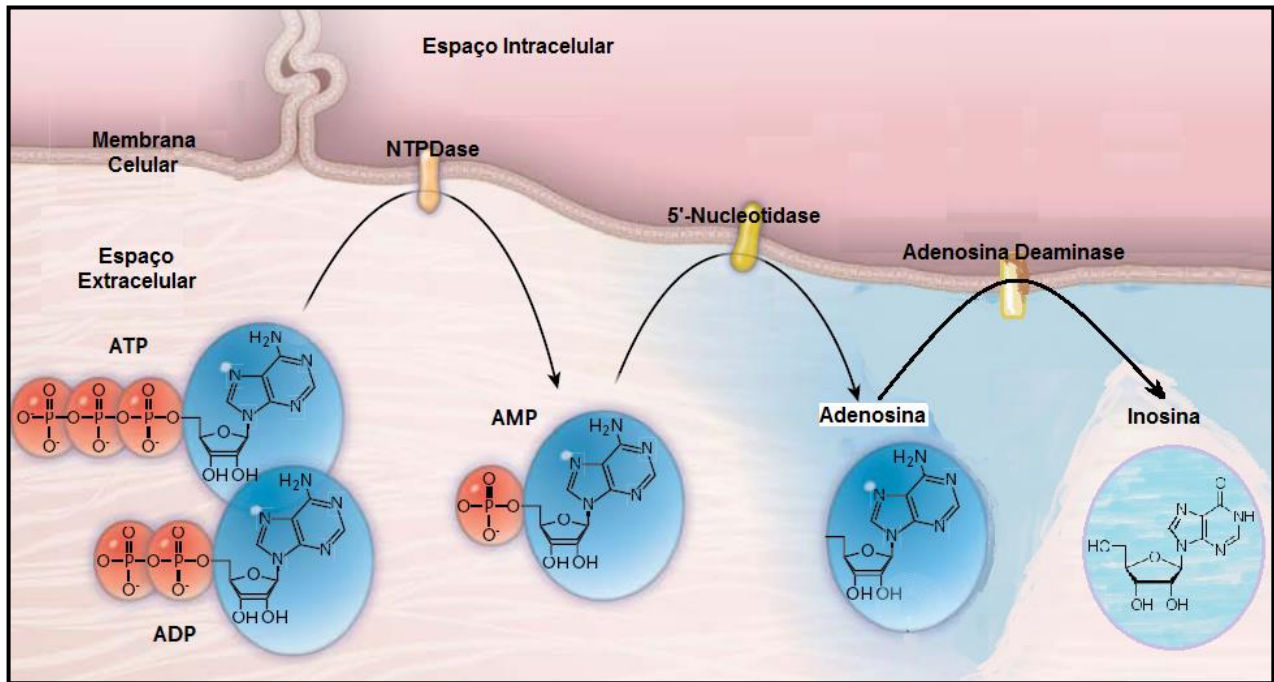


Figura 2: Enzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (Holger, 2012).

As NTPDases são uma família de enzimas composta por oito membros: NTPDase1-8. As NTPDases 1, 2, 3 e 8 são ectoenzimas com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, as NTPDases 5 e 6 são intracelulares e as NTPDases 4 e 7 são enzimas intracelulares presentes no lúmen de organelas. Estas enzimas são dependentes de íons de Ca^{2+} ou Mg^{2+} para exercerem suas atividades enzimáticas e diferem entre si pela afinidade entre os nucleotídeos tri e di fosfatados (KUKULSKI et al., 2005; ROBSON, 2006). A NTPDase 1 (E.C.3.6.1.5, apirase, ecto-NTPDase1, CD39) é uma proteína integral de membrana capaz de hidrolisar tanto ATP quanto ADP em AMP. Essa enzima é composta por 510 aminoácidos possuindo dois domínios transmembranas sendo um próximo ao grupamento amino e o outro próximo ao grupamento carboxi terminal. A NTPDase1 é responsável pelo término da ativação dos receptores purinérgicos P2Y_{1,12,13} pois ela não permite a acumulação de ADP durante a hidrólise do ATP extracelular (KUKULSKI et al., 2011). Além disso, a CD39 tem sido evidenciada como um potente marcador de ativação de linfócitos (DWYER et al., 2007).

A ecto - 5'- nucleotidase (E.C.3.1.3.5, CD73) é a enzima responsável pela hidrólise de AMP a adenosina. Essa ectoenzima é encontrada ancorada

na membrana celular sendo que sua atividade catalítica é dependente de Mg^{2+} , isto é, ela liga os cátions divalentes ao domínio N - terminal e está ancorada na membrana celular ao domínio C-terminal por glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (HUNSUCKER et al., 2005). Esta enzima está presente em vários órgãos como rim, cérebro, fígado, coração e pulmão. No sistema vascular a CD73 está predominantemente associada ao endotélio de grandes vasos como as artérias aorta, carótida e coronária (ZIMMERMAN,1996; THOMPSON et al., 2004) sendo encontrada também na membrana de plaquetas e linfócitos T e B (BOURS et al., 2006).

Outra enzima que possui um papel muito importante relacionada ao sistema purinérgico é a ADA. Essa enzima é responsável pela desaminação de adenosina a inosina (DEAGLIO & ROBSON, 2011). A ADA juntamente com a 5'-nucleotidase são as principais enzimas responsáveis pela geração e manutenção dos níveis extracelulares de adenosina, uma molécula que exerce efeitos antitrombóticos via receptores A2A e A3, particularmente durante processos isquêmicos ou ateroscleróticos (SITKOVSKY et al., 2004) além de possuir ação anti-inflamatória e imunossupressora (SITKOVSKY & LUKASHEV, 2005).

A atividade destas enzimas em linfócitos e plaquetas tem sido avaliada em diferentes patologias e condições experimentais tais como hipertensão (CARDOSO et al., 2015), esclerose múltipla (SPANEVERELLO et al., 2010), síndrome de Down (FERREIRA et al., 2015), infarto agudo do miocárdio (LAVALL et al., 2015), síndrome metabólica (MARTINS et al., 2016), artrite reumatóide (CASTILHOS et al., 2015), hipotireoidismo (BALDISSARELLI et al., 2016) e doença de Chagas (SOUZA et al., 2012). Em relação ao DM, trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa também demonstraram alterações na atividade da NTPDase, 5'- nucleotidase e ADA tanto em pacientes diabéticos quanto em modelos animais dessa endocrinopatia (LUNKES et al., 2004; SCHMATZ et al., 2009; STEFANELLO et al.,2016).

Evidências científicas demonstram a importância do estudo de novas alternativas coadjuvantes para minimizar, contribuir e prevenir disfunções associadas ao DM. Neste contexto o uso de substâncias antioxidantes tem se mostrado uma estratégia promissora associada ao tratamento convencional

desta doença metabólica (HUANG et al., 2016). Além disso, considerando que alterações no sistema purinérgico estão presentes no DM, trabalhos prévios também tem avaliado o impacto de compostos naturais como resveratrol (SCHMATZ et al., 2013), quercetina (MACIEL et al., 2016), ácido clorogênico e cafeína (STEFANELLO et al., 2016) na modulação da sinalização purinérgica em modelos animais desta endocrinopatia.

Em um modelo experimental de DM1 induzido por estreptozotocina foi observado um aumento na atividade de ectonucleotidases em plaquetas de ratos diabéticos, sendo que o tratamento com resveratrol não foi capaz de reverter as alterações na atividade das enzimas NTPDase e 5-nucleotidase mas diminuiu a atividade da ADA, possivelmente sendo este importante mecanismo de ação do composto para aumentar os níveis de adenosina nesta condição patológica (SCHMATZ et al., 2009). STEFANELLO et al., (2016) também evidenciou um aumento na atividade de ectonucleotidases em plaquetas bem como na agregação plaquetária de ratos diabéticos, sendo que o tratamento com ácido clorogênico, cafeína ou café foram capazes de reverter estas alterações. Por fim, o tratamento com quercetina também foi capaz de prevenir alterações na sinalização purinérgica em sistema nervoso em um modelo experimental de DM1 (MACIEL et al., 2016). Esses estudos sugerem fortemente que disfunções na sinalização purinérgica estão envolvidas na progressão e no desenvolvimento de complicações associadas ao DM e que compostos capazes de interferir com essa sinalização podem ser promissores candidatos terapêuticos para o tratamento de portadores desta endocrinopatia.

Os flavonóides são compostos naturais presentes em uma variedade de plantas como frutas e produtos alimentícios, como chocolate, chá e vinho. Estes compostos têm diversas propriedades farmacológicas importantes, especialmente antitumoral, anti-alérgica, anti-úlceras, antioxidante e atividades antivirais (GARCIA et al., 1997; GALATI et al., 2004). Dentre estes compostos pode-se destacar o ácido gálico (GA), conhecido também como ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, o qual pode ser encontrado em algumas plantas, como semente de uva, bagas, frutos avermelhados, cebolas, folhas de chá (verde e preto), erva mate e manga (XIA et al., 2010; SANHUEZA et al., 2017; MORALES et al., 2014; AKYOL et al., 2016).

O ácido gálico é formado por um anel aromático, três grupos hidroxila e um grupo ácido carboxílico (Figura 3). Os três grupos hidroxila estão ligados ao aromático anel na posição orto em relação um ao outro (SROKA; CISOWSKI, 2003). O ácido gálico é conhecido também como galato, geralmente denominado assim pelos seus ésteres de propilo, octilo e dodecilo. Ele é utilizado na indústria alimentícia em gorduras e óleos para rancidez e deteriorização, na indústria de cosmética e materiais de embalagem, como aditivo alimentar, doces, gomas de mascar e leite em pó (KUBO et al., 2002; MUNOZ et al., 2002; OW; STUPANS, 2003).

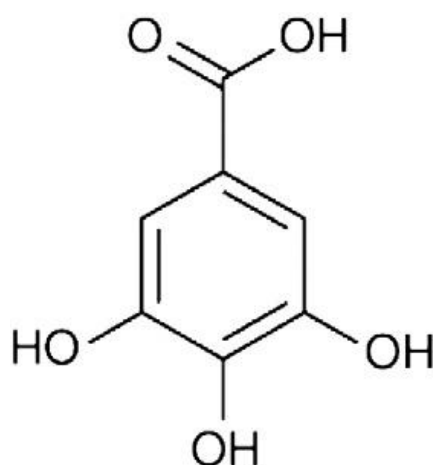


Figura 3: Estrutura química do ácido gálico (3,4,5-triidroxibenzoico)

Fonte: Punithavathi et al, 2011.

O ácido gálico tem recebido muita atenção nos últimos anos por apresentar um potente efeito antioxidante, anti-inflamatório e atividade antihiperlipidêmica (PUNITHAVATHI et al., 2011; KADE & ROCHA, 2013, DE OLIVEIRA et al., 2016). Outros estudos também relataram efeito antitumoral deste composto e sua citotoxicidade seletiva contra uma variedade de células tumorais (SERRANO et al., 1998; SALUCCI et al., 2002).

Estudos prévios já tem avaliado o efeito do ácido gálico em modelos experimentais de diabetes onde foi demonstrado que o tratamento com este composto foi capaz de diminuir os níveis de glicose e de hemoglobina glicada e reverter alterações em parâmetros de estresse oxidativo induzido pelo DM (KIM et al., 2006; PUNITHAVATHI et al., 2011; LEE et al., 2015; HUANG et al., 2016). Outro estudo também demonstrou que o ácido gálico foi capaz de

promover uma proteção cardíaca diminuindo os produtos de glicação avançada e os níveis de citocinas inflamatórias em cultura de miofibroblastos (UMADEVI; GOPI & VELLAICHAMY, 2013).

Esse composto fenólico também foi capaz de prevenir a diminuição de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e os níveis de vitamina C em fígado e rim de ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes (DE OLIVEIRA et al., 2016). Também foi relatado em um estudo feito por LEE et al., (2015), que o ácido gálico promoveu uma inibição na produção de citocinas, induzida pela hiperglicemia, em monócitos através de alterações epigenéticas envolvendo o fator nuclear NF κ -B em ratos diabéticos. Além disso, HUANG et al., (2016) também demonstraram que o ácido gálico é capaz de melhorar a captação de glicose nos hepatócitos de ratos resistentes a insulina.

Dessa forma, levando em consideração a incidência do diabetes em todo o mundo, e como suas implicações podem agravar a qualidade de vida dos pacientes, é de suma importância acrescentar novas alternativas terapêuticas coadjuvantes para o tratamento dessa doença. Considerando também as propriedades biológicas, antioxidantes e anti-inflamatórias já descritas do ácido gálico, é de extrema relevância avaliar os efeitos desse composto na sinalização purinérgica em linfócitos, plaquetas e soro de ratos diabéticos com o objetivo de contribuir na busca de novas alternativas terapêuticas, que possam minimizar os efeitos deletérios dessa endocrinopatia, utilizando compostos naturais.

4. Metodologia e resultados

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um manuscrito. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

4.1 Manuscrito

Effects of gallic acid on purinergic signalling in lymphocytes, platelets and serum of diabetic rats: relation with haematological parameters

Aline da Silva Pereira¹, Lizielle Souza de Oliveira¹, Thauan Faccin Lopes¹, Karine Paula Reichert¹, Jucimara Baldissareli¹, Taís Vidal Palma¹, Vera Maria Morsch¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Cinthia Mellazo de Andrade^{1,2}, Roselia Maria Spanevello^{3*}

¹ Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, Pelotas, RS, Brazil.

*** Corresponding author:**

Roselia Maria Spanevello: Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

Phone: +55 53 32757355 E-mail: rspanevello@gmail.com

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is associated with hyperglycemia, changes in lymphocyte functions and platelet hyperactivity. The NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA) are important enzymes involved in the generation of the antiaggregant and antiinflammatory microenvironments and thus are the suitable therapeutic targets in DM. Gallic acid has many biological effects such as anti hyperglycaemic, antioxidant, anti-inflammatory and antiaggregant properties. The aim of this study was to evaluate the effect of gallic acid on the hematological parameters and ectonucleotidases activities in platelets and lymphocytes from diabetic rats. Male rats were divided in groups: control, gallic acid, diabetic and diabetic plus gallic acid. DM was induced in the animals by intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/kg). Gallic acid (30 mg/kg) was administered orally for 21 days. Our results showed that gallic acid did not was capable of decrease the hyperglycaemia in diabetic rats. In regard to haematological parameters, the concentration of mean corpuscular hemoglobin was decreased while that red cell distribution was increase in the diabetic group. Gallic acid was capable to revert these alterations. When diabetic rats were treated with gallic acid was observed a decrease in hemoglobin levels, hematocrit and mean corpuscular volume. Gallic acid also reverted the increase in ATP and ADP hydrolysis and ADA activity in lymphocytes of diabetic animals. In platelets, gallic acid prevented the increase in the NTPDase activity and decreased the ADA activity in diabetic rats. A decrease in ATP hydrolysis and an increase in ADP and AMP hydrolysis in diabetic rats were observed in serum and gallic acid treatment was capable to revert only changes in ATP hydrolysis. Our results suggest that gallic acid has beneficial effects on immune and thromboregulatory responses in DM, and that these effects may be related to the modulation of purinergic signaling in lymphocytes, platelets and serum.

Keywords: Ectonucleotidases, Diabetes mellitus, Gallic acid, Lymphocytes, Platelets

1. Introduction

The gallic acid (GA) also known as 3,4,5-trihydroxybenzoic acid is found in plants such as grape seeds, berries, fruit reddish, onion and tea leaves (green and black). GA has received much attention by presenting many biological effects such as antioxidant and anti-inflammatory properties [1,2]. The particular importance, studies have demonstrated that GA has anti hyperglycaemic effects by decrease the levels of glucose and glycosylated hemoglobin and increase the insulin levels in experimental models of diabetes [3].

Diabetes mellitus (DM) is a multifactorial clinical disease associated with hyperglycemia and is considered a risk factor for many others pathologies [4,5]. Data from literature have demonstrated that components of the immune system are altered in DM. These immunological alterations include changes in lymphocytes metabolism and their functions and altered levels of specific cytokines [6,7]. In addition, low grade inflammation, platelet hyperactivity, endothelial dysfunction and abnormalities in coagulation have been implicated for the increased atherothrombotic risk in DM [7,8,9].

Purinergic molecules such as ATP, ADP and adenosine can act as positive or negative signals modulating the immune and thromboregulatory responses [10]. The balance between ATP, ADP and adenosine concentrations depends of the ectonucleotidases activities on the cell surface [11]. The conversion of the ATP and ADP to AMP is catalized by NTPDase 1 (CD39) whereas that the 5'-nucleotidase enzyme (CD73) catalyzes the dephosphorylation of AMP into adenosine. The adenosine is subsequently degraded by the action of adenosine deaminase (ADA) into inosine [11]. The CD39, CD73 and ADA are enzymes considered pivotal in the generation of the antiaggregant and immunosuppressive microenvironments [12].

Previous studies of our research group has demonstrated alterations in the activity of NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA in both diabetic patients and in experimental models of this endocrinopathy [13-17]. In this line, these ectoenzymes are suitable therapeutic targets for the management of vascular and immunological complications associated with diabetes. Therefore, the evaluation of the compounds capable to modulate purinergic signaling can

opened the door strategies of treatment to reduce the severity of the complications in this metabolic disease.

In this context, the aim of the present study was evaluated the effects of gallic acid treatment in hematological parameters and in the NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities in lymphocytes, platelets and serum of diabetic rats.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Adult male Wistar rats were used in this experiment. They were kept on a 12 h light/12 h dark cycle at a temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food and water. All animal procedures were previously approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (protocol number: 007/2015).

2.2 Experimental induction of diabetes

A type 1 diabetes model was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a concentration of 65 mg/kg, diluted in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5). The control group received an equivalent dose of sodium citrate buffer. Animals submitted to STZ injection received 5% glucose solution instead of water for 24 h after diabetes induction, in order to reduce mortality due to hypoglycaemic shock. Blood samples were drawn six days after STZ/vehicle injection through the tail vein in order to assess blood glucose. Glucose levels were determined with a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO, USA). Only animals with a high fasting glucose (250 mg/dL) were considered as diabetic and used for the present study. The glucose levels were determined on the first and last days of treatment.

2.3 Treatment with gallic acid (GA)

The animals were randomly divided into four groups: control/saline, control/GA, diabetic/saline and diabetic/GA. GA treatment started one week after the induction of diabetes. Control/saline and diabetic/saline animals

received saline solution for oral via. The animals of the control/GA and diabetic/GA groups received GA by oral administration at a concentration of 30 mg/kg/day, once a day at 11:00 am during 21 days (Figure 1). The dose of GA and time of treatment were based in previous studies [2,3].

2.4 Samples preparation for biochemical tests

Twenty-four hours after the last day of treatment, the animals were anaesthetized with halothane and submitted to euthanasia. Blood was collected by cardiac puncture in tubes contain sodium citrate or ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) as anticoagulant. Lymphocytes were isolated from blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum [18]. The platelet-rich plasma (PRP) were prepared from blood collected with sodium citrate the according to method of Pilla et al. [19] modified by Lunkes et al. [14]. Whole blood also was collected in tubes without an anticoagulant system and centrifuged for 15 min at room temperature. The clot was discarded and the serum was obtained. In the whole blood with EDTA and serum was evaluated also the haematological parameters.

2.5 Haematological parameters analysis

The red blood cells and total leucocytes counts and hemoglobin quantification were performed with an automatic counter Mindray BC 2800 VET®. The determination of hematocrit was obtained in a micro-hematocrit centrifuge after 5 min in rotation of 19.720g. The measurement of total plasma proteins was performed by refractometry and the result obtained in milligrams per deciliter (mg/dL). The mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were determinate by indirect calculations. The leucocytes differential was performed on blood smears stained with Diff Quick.

2.6 NTPDase and ADA assays in lymphocytes

After lymphocyte isolation, NTPDase activity was determined as described by Leal et al. [20] where the reaction medium contained 0.5 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM the Tris HCl buffer pH 8.0, at a final

volume of 200 μ L. Lymphocytes suspended in saline solution were added to the reaction medium (2-4 μ g of protein) and pre-incubated for 10 min at 37^o C and incubation was conducted for 70 minutes. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [21] using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. The specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Adenosine deaminase activity was measured in lymphocytes by the method of Giusti and Gakis [22]. Briefly, lymphocytes reacted with 21 nmol/L of adenosine (pH 6.5) and the incubation was carried out at 37^oC for 60 min. The reaction was interrupted at the end of the incubation by the addition of nitroprusside and phenol solution. In this assay, ammonia reacts with hypochlorite and phenol to form the intense blue indophenol. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indophenol at 620 nm. The specific activity was reported as units per liter (U/L). One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia from adenosine per minute at standard assay conditions.

2.7 NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA assays in platelets

The reaction medium for NTPDase activity contained 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 as described by Lunkeset al. [14]. For AMP hydrolysis, the medium reaction was used as previously described, except that the 5 mM CaCl₂ was replaced by 10 mM MgCl₂. Platelets preparation (8-12 μ g of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37^oC for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM and incubation proceeded for 60 minutes. For AMP hydrolysis, 5'-nucleotidase activity was carried out as previously described and the final concentration of the nucleotide AMP added was 2 mM. The reaction was stopped with TCA 10% and the released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [21]. The specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein. The

ADA activity also was evaluated the according to Giusti and Gakis [22] and expressed as in units per liter (U/L).

2.8 NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA assays in serum

The activity of enzymes NTPDase and 5'-nucleotidase in serum was determined the according to Fürstenau et al. [23]. The reaction mixtures contained 112.5 mM Tris HCl, pH 8.0 and the content of the protein was 1.0 mg per tube. To start the reactions, substrates (ATP, ADP and AMP) were added to the medium in a final concentration of 3.0 mM. The reaction was stopped with TCA 10% after 40 minutes of incubation. The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [21] and the specific activity is reported as nmol Pi released/min/mg of protein. ADA activity in serum was determined according to Giusti and Gakis [22] as previously described. Results were expressed in units per liter (U/L).

2.9 Protein Determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [24] using serum albumin as standard.

2.10 Statistics Analyses

Statistics analyses were performed by Two and one way ANOVA, statistical program GraphPad Prism 5, followed by Bonferroni post-test. Differences were considered significant when $P < 0.05$ and variables are presented as mean \pm standard deviation (SD).

3. Results

Initially our findings showed that STZ administration increased the blood glucose levels in the animals when compared to control groups [$F_{(1,19)} = 20.14$ $P = 0.0001$]. However, the gallic acid treatment during 21 days, was not capable to decrease the hyperglycaemia in diabetic rats (end treatment) [$F_{(1,19)} = 1.50$ $P = 0.234$ Figure 2).

The results the haematological parameters are showed in the Table 2. As can be observed no alterations occurred in the erythrocytes number and protein levels in any of the groups evaluated in this study. In the group diabetic and treated with gallic acid was observed a decreased in hemoglobin levels [$F_{(1,16)}= 6.79$, $P= 0.019$), hematocrit [$F_{(1,16)}= 21.56$, $P= 0.0003$] and mean corpuscular volume (MCV) [$F_{(1,16)}= 4.60$, $P= 0.047$] when compared to others groups. The concentration of mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) decreased in the diabetic group and gallic acid was capable to revert this alteration [$F_{(1,16)}= 15.16$ $P= 0.0014$]. In addition, we also observed a decrease in the red cell distribution (RDW) in diabetic rats and gallic acid treatment reverted this change [$F_{(1,16)}= 15.10$ $P= 0.0016$]. There are no alterations in the leucogram parameters in any group evaluated in this study (data not shown).

The findings of ectonucleotidases activities in lymphocytes are showed in Figure 3. Our results demonstrated an increase in ATP and ADP hydrolysis in lymphocytes of diabetic animals and gallic acid treatment was capable to revert these effects. ATP: gallic acid treatment: [$F_{(1,18)}= 11.09$ $P= 0.0037$], STZ [$F_{(1,18)}= 5.35$ $P= 0.0320$], interaction [$F_{(1,18)}= 9.65$ $P= 0.0061$], ADP: gallic acid treatment: [$F_{(1,18)}= 8.62$ $P= 0.0088$], STZ [$F_{(1,18)}= 16.31$ $P= 0.0008$], interaction [$F_{(1,18)}= 5.38$ $P= 0.032$]. Similar results were observed in relation to ADA activity. STZ administration induced an increase in this enzyme activity in lymphocytes and gallic acid treatment also was capable to revert this alteration: gallic acid treatment: [$F_{(1,18)}= 5.43$ $P= 0.031$], STZ [$F_{(1,18)}= 7.43$ $P= 0.013$], interaction [$F_{(1,18)}= 18.99$ $P= 0.0004$] (Figure 3).

Statistical analysis also showed an increase in the ATP and ADP hydrolysis in platelets of diabetic animals and gallic acid treatment was capable to revert these effects. ATP: gallic acid treatment: [$F_{(1,20)}= 15.43$ $P= 0.0008$], STZ [$F_{(1,20)}= 11.20= 0.0032$], interaction [$F_{(1,20)}= 30.54$ $P< 0.0001$], ADP: gallic acid treatment: [$F_{(1,20)}= 10.77$ $P= 0.0037$], STZ [$F_{(1,20)}= 27.65$ $P< 0.0001$], interaction [$F_{(1,20)}= 10.68$ $P= 0.0039$] (Figure 4). On the other hand, gallic acid treatment not reverted the inhibition in the 5'-nucleotidase activity induced by experimental diabetes: gallic acid treatment: [$F_{(1,18)}= 1.79$ $P= 0.1976$], STZ [$F_{(1,18)}= 38.25$ $P< 0.0001$], interaction [$F_{(1,18)}= 1.70$ $P= 0.2083$] (Figure 4). In regard the ADA activity in platelets, our results demonstrated that occurred the inhibition in this

enzyme activity only in the group diabetic treated with gallic acid when compared to the others experimental groups: gallic acid treatment [$F_{(1,20)}= 15.51$ $P= 0.0008$], STZ [$F_{(1,18)}= 0.8114$ $P< 0.3784$], interaction [$F_{(1,18)}= 2.48$ $P= 0.1307$] (Figure 4).

In serum our results showed a decreased in ATP hydrolysis in diabetic animals and this alteration was reverted by gallic acid administration: gallic acid treatment [$F_{(1,18)}= 32.40$ $P<0.0001$], STZ [$F_{(1,18)}= 5.32$ $P=0.0361$], interaction [$F_{(1,18)}= 71.54$ $P<0.0001$] (Figure 5). On the other hand, gallic acid (30mg/kg) not reverted the increase in ADP and AMP hydrolysis induced by hyperglycemic status. ADP: gallic acid treatment [$F_{(1,18)}= 1.954$ $P=0.6634$], STZ [$F_{(1,18)}= 29.15$ $P<0.0001$] interaction [$F_{(1,18)}= 0.4342$ $P=0.5179$], AMP: gallic acid treatment $F_{(1,18)}= 0.0840$ $P=0.7751$], STZ [$F_{(1,18)}= 6.73$ $P=0.0180$], interaction [$F_{(1,18)}= 0.032$ $P=0.8598$]. No alterations were observed in the ADA activity in serum in the groups evaluated in this study: gallic acid treatment $F_{(1,18)}= 1.18$ $P=0.2920$], STZ [$F_{(1,18)}= 1.29$ $P=0.2713$], interaction [$F_{(1,18)}= 2.97$ $P=0.1039$] (Figure 5).

4. Discussion

The effects of experimental model of DM induced by STZ are well known. STZ causes lesions in Langerhans islets interfering to synthesis and insulin liberation [25,26]. Corroborating with others studies, our findings shows an increase in the glucose levels in rats submitted to experimental diabetes induced by STZ [2,15,17].

In first time we evaluated the effects of gallic acid treatment in blood glucose levels in diabetic rats. Although previous studies have related that gallic acid (10, 20 and 25 mg/kg) increase the insulin levels and decrease the glucose levels in diabetic rats [3,27] the antihyperglycaemic effect of this natural compound was not observed in our study. Similar findings were described by Oliveira et al. [2] that demonstrated that gallic acid also not decrease the glucose levels in diabetic rats and that the protective effects of this compound could be associated with antioxidant properties [2]. The inconsistent data regarding the effects of the gallic acid on diabetes can be explained by the doses of STZ administered, diabetes type induced and time of gallic acid treatment [2,3,27].

In our study we observed a decrease in hemoglobin levels, hematocrit and mean corpuscular volume (MCV) in diabetic rats treated with gallic acid. Interestingly, Niho et al. [28] in a study evaluating the subchronic toxicity of gallic acid in rats feeding by diet containing 0, 0.2, 0.6, 1.7 and 5% gallic acid by for 13 weeks, also demonstrated a reduction in hemoglobin levels, hematocrit and red blood cells suggesting the anemia development. In fact, in our study no changes were observed in these parameters in animals control/gallic acid, however is important to consider that alterations such as a decrease in spleen weight liver dysfunctions in diabetic state can contributed to this effects of gallic acid in this hematological parameters.

The increased susceptibility to infections in diabetic patients has been associated to both humoral and cellular immune responses [29]. Accumulating evidences supports that DM causes marked changes in lymphocyte metabolism [7] and decreased functions (chemotaxis, phagocytosis killing) of polymorphonuclear cells and monocytes/macrophages [29]. Previous investigations also showed altered levels of specific cytokines, changes in the number e activation state of various leukocyte populations and increased apoptosis [7,29,30,31,32].

In the present study we also demonstrated that purinergic signaling is altered in lymphocytes from diabetic rats. The enzymes NTPDase and ADA act as a checkpoint that determines whether the extracellular environment is proinflammatory (ATP mediated responses) or anti-inflammatory (adenosine mediated responses) [11]. In this line, an increase in the NTPDase activity may be responsible by decrease of the ATP levels, while that an increase in the ADA activity can promote a reduction of adenosine levels (an anti-inflammatory molecule).

In this context, our findings appointed that these changes in purinergic signaling in lymphocytes may contribute to disruption of inflammatory and immunological response in DM. However, gallic acid treatment was capable to revert the increase of NTPDase and ADA activities in lymphocytes caused by hyperglycemic state. In fact, an anti-inflammatory and immunological property of gallic acid has been described [1]. Gallic acid inhibits production of IL-6 in macrophages culture [33], interferes with function of polymorphonuclear

leukocytes and myeloperoxidase activity [1] and inhibited the cytokine production induced by hyperglycemia in monocytes through epigenetic changes involving NF- κ B [34]. In addition, pretreatment of lymphocytes with gallic acid also inhibit lipid peroxidation and apoptosis induced by oxidative stress [35]. Based on this, our results sustain and corroborate the benefits effects of gallic acid on immune system in DM and suggest that other possible mechanism involved in this effect is although to modulation of purinergic signaling in lymphocytes.

Corroborating with previous studies from our laboratory [16] we also showed an increase in the NTPDase in platelets from diabetic rats. The up - regulation of this enzyme activity implies that it also plays a crucial role in thrombotic process in hyperglycemic state. The increase in the NTPDase activity could deplete the ADP levels, a main agonist of platelet aggregation; on the other hand, a decrease in the 5'-nucleotidase could decrease the extracellular adenosine levels (an antiaggregant molecule). In this line, our findings are consistent with other report that showed an increase de 70-80% in the platelet aggregation in diabetic animals using ADP as agonist [17].

Preliminary results of experimental studies have demonstrated that gallic acid inhibit platelet aggregation, P- selectin expression and platelet-leukocyte aggregation [36]. Besides, this natural compound is capable to prevent the elevation of intracellular calcium and attenuated phosphorylation of PKC α /p38 MAPK and Akt/GSK3 β on platelets stimulated [36]. Lim et al. [37] also showed that gallic acid inhibited the platelet aggregation induced by collagen and by arachidonic acid. An important aspect to be discussed is that the decrease in the ADA activity by gallic acid in blood platelets of diabetic rats may be an important factor underlying in platelet hyperactivity and aggregation in the course of DM.

In conclusion, the results of this study showed that gallic acid may provide effective protection against complications associated to immunological and thromboregulatory mechanisms in DM although to modulation of purinergic signaling in lymphocytes, platelets and serum. These findings provide evidence that gallic acid may be useful for the treatment of DM and raise the possibility of a new application as a complementary therapy associated with hypoglycaemic

drugs. However, more studies are necessary to investigate time, dose and possible mechanisms involved in alterations of hematological parameters during chronic hyperglycemia associated to gallic acid treatment.

Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Legends of Figures

Figure 1 – Experimental protocol the treatment of gallic acid (30 mg/kg) in a model of diabetes mellitus type 1 (DM1).

Figure 2 – Blood glucose levels of the diabetic and control rats at the onset (A) and the end (B) of the gallic acid treatment. Data were expressed as mean \pm SD. *** Denotes $P < 0.001$ as compared to the others groups (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test $n = 6$).

Figure 3 – NTPDase and Adenosine deaminase (ADA) activities on lymphocytes from STZ-induced diabetic rats and treated with gallic acid (30 mg/kg). Data were expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ as compared to the saline group. ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ as compared to the diabetic group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $n = 5-6$).

Figure 4 – NTPDase, 5`- nucleotidase and Adenosine deaminase (ADA) activities on platelets from STZ-induced diabetic rats and treated with gallic acid (30 mg/kg). Data were expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ as compared to the saline group. ### $P < 0.001$ as compared to the diabetic group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $n = 5-6$).

Figure 5 – NTPDase, 5`- nucleotidase and Adenosine deaminase (ADA) activities on serum from STZ-induced diabetic rats and treated with gallic acid (30 mg/kg). * $P < 0.05$ as compared to the saline group. ### $P < 0.001$ as compared to the diabetic group. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $n = 5-6$).

Figure 6 – Changes in haematological parameters and ectonucleotidases activities in lymphocytes, platelets and serum found in rats submitted to diabetes experimental model and gallic acid intake.

6. References

1. B.H. Kroes, A.J. Van den Berg, H.C. Quarles, H. Van Ufford, H. Van Dijk, R.P. Labadie, Anti-inflammatory activity of gallic acid, *Planta Med.* 58 (1992) 400-504.
2. L. Oliveira, G. Thomé, T. Lopes, K. Reichert, S. Oliveira, A. Pereira, J. Balsissareli, C. Krewer, V. Morsch, M. Schetinger, R. Spanevello, R. Effects of gallic acid on delta aminolevulinic dehydratase activity in biochemica, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats, *Biomed. Pharmacot.* 84 (2016)1201-1299.
3. V.R. Punithavathi, P.S. Prince, R. Kumar, J. Selvakumari, Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats, *Eur. J. Pharmacol.* 650 (2011) 465–471.
4. M. Laakso, Insulin resistance and its impact on the approach to therapy of type 2 diabetes, *Int J Clin Pract Suppl.* 121 (2001) 8-12.
5. D. Daneman, Type 1 diabetes, *Lancet* 367 (2006) 847-858.
6. S. Shruthi, V. Mohan, A. Amutha, V. Aravindhana, Increased serum levels of novel T cell cytokines IL-33, IL-9 and IL-17 in subjects with type-1 diabetes, *Cytokine* 86 (2016) 6-9.
7. L. Szablewski, A. Sulima , The structural and functional changes of blood cells and molecular components in diabetes mellitus, *Biol Chem.* 398 (2017) 411-423.
8. A.M. Cerbone, N. Macarone-Palmieri, G. Saldalamacchia, A. Coppola, G. Di Minno, A.A. Rivellese, Diabetes, vascular complications and antiplatelet therapy: open problems, *Acta Diabetol.* 46 (2009) 253-261.
9. R. Demirtunc , D. Duman, M. Basar, M. Bilgi, M. Teomete, T. Garip. The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus, *J Diabetes Complications* 23 (2009) 89-94.

10. J. Sévigny, M. Martín-Satué, J. Pintor, Purinergic Signalling in Immune System Regulation in Health and Disease, *Mediators Inflamm.* 2015 (2015) 1-3.
11. S. Savio, M. Giorgi, S. Robson, Ectonucleotidases in Immunobiology, *Encyc Immunobiol.* 2 (2016) 424-431.
12. M.R. Bono, D. Fernández, F. Flores-Santibáñez, M. Roseblatt, D. Sauma D, CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: beyond immunosuppression, *FEBS Lett.* 589 (2015) 3454-3460.
13. G. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, Schetinger, M.R, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies, *Thromb Res.* 109 (2003) 189-194.
14. G. Lunkes, D. Lunkes, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, A. Morsch, V.R. Miron, Schetinger, M.R., NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65 (2004)1-6.
15. R. Schmatz, C.M. Mazzanti, R. M. Spanevello, N. Stefanello, J. Gutierrez P. A. Maldonado, M. Corrêa, C. Rosa, L. Becker, M. Bagatini, J. Gonçalves J. Jaques, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol, *Brain Res. Bull.* 80 (2009) 371-376.
16. R. Schmatz, T. R. Mann, R. M. Spanevello, M. M. Machado, D. Zanini, V.C. Pimentel, N. Stefanello, C.C. Martins, A. M. Cardoso, M. Bagatini, J. Gutierrez, C. A. Leal, L.B. Pereira, C. Mazzanti, M.R.Schetinger, V.M. Morsch, Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cell Biochem. Biophys.* 65 (2013)129-14
17. N. Stefanello, R. Schmatz, L. Pereira, A. Cardoso, S. Pasamonti, R. Spanevello, G. Thomé, G. Oliveira, L. Kist, M. Bogo, V. Mosrch, M. Schetinger, Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components

- of the purinergic system of streptozotocin induced diabetics rats, *J. Nutr. Biochem.* 38 (2016) 145-153.
- 18.A. Böyum, of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Invest.* 97 (1968)77-89.
- 19.C. Pilla, T. Emanuelli, S. S. Frassetto, A. M. O. Battastini, R. D. Dias, J. J. F. Sarkis, ATP diphosphohydrolase activity (apyrase E.C. 3.6.1.5) in human blood platelets, *Platelets* 7 (1996) 225-230.
- 20.D.B.R. Leal, C. A. Streher, T.N. Neu, F.P Bittencourt, C.A.M.Leal, J.E.P Silva, V.M Morsch, M.R.C. Scheringer, Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1721(2005) 9-11.
- 21.Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986;157:375-78.
- 22.G. Giusti, C. Gakis, Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues, *Enzyme* 12 (1971):417-425.
23. C. Fürstenau, S. Trentin, A. Gossenheimer, D. Ramos, E. Casali, M. Barreto-Chaves, J. Sarkis. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats, *Blood Cell Mol. Dis.* 41 (2008) 223-239.
- 24.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- 25.N. Morgan, H. Cable, N. Newcombe, G Williams, Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis, *Biosci Rep.* 14 (1994) 243-250.

26. Z. Hakim, B. Patel, R. Goyal, Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats, *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 41(1997) 353–360.
27. I. J. Kade, J. B. T. Rocha, Gallic Acid Modulates Cerebral Oxidative Stress Conditions and Activities of Enzyme-Dependent Signaling Systems in Streptozotocin-Treated Rats, *Neurochem. Res.* 38 (2013) 761-771.
28. N. Niho, M. Shibutani, T. Tamura, K. Toyoda, C. Uneyama, N. Takahashi, M. Hirose, Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats, *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 1063-1070.
29. S. E. Geerlings, A. Hoepelman, Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM), *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26 (1999) 259-265.
30. E. Hatanaka, P. Monteagudo, M. Marrocos, A. Campa, Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes, *Clin. Exp. Immunol.* 146 (2006) 443-447.
31. M. Donath, S. Shoelson, Type 2 diabetes as an inflammatory disease, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 98-197.
32. M. P. Nekoua, R. Fachinan, A. K. Atchamou, O. Nouatin, D. Amoussou-Guenou, M.K. Amoussou-Guenou, K. Moutairou, A. Yessoufou, Modulation of immune cells and Th1/Th2 cytokines in insulin-treated type 2 diabetes mellitus, *African Health Sci.* 16 (2016) 712-724.
33. L. BenSaad, K. Kim, C. Quah, W. Kim, M. Shahimi, Anti inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*, *BMC Complement . Altern. Med.* 14 (2017) 47.
34. W. Lee, Y.J. Son, J.M. Yun, Gallic acid decreases inflammatory cytokine secretion through histone acetyltransferase/histone deacetylase regulation in high glucose-induced human monocytes, *J. Med Food* 18 (2015) 793-801.

35. K. Sohi, N. Mittal, M. Hundal, L. Khanduja, Gallic Acid, an Antioxidant, Exhibits Antiapoptotic Potential in Normal Human Lymphocytes: A Bcl-2 Independent Mechanism, *J. Nutr. Sci. Vit.* 49 (2003) 221-227.
36. S. Chang, V. Lee, Y. Tseng, K. Chang, K. Chen, Y. Chen, C. Li, Gallic Acid Attenuates Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregation: Involving Pathways of Akt and GSK3 β , *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012 (2012) 683 -872.
37. M. Lim, Park, Y.; M. Kim, H. Lee, D. Son, Antiplatelet activity of gallic acid and methyl gallate, *Food Sci. Biotechnol.* 2004.

Table 1: Effects of gallic acid in hemogram of the diabetic and control rats. Values are expressed as mean \pm SD. Denotes statistical differences for * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ when compared to others groups. (Two way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test $n = 5-6$). MCV (Mean Corpuscular Volume), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) and RDW (Red Blood Cells Distribution Width).

	Control	Gallic Acid	Diabetes	Diabetes/Gallic acid
Erythrocytes number ($10^6/\mu\text{l}$)	8.5 \pm 0.23	8.6 \pm 0.12	8.4 \pm 0.29	8.0 \pm 0.25
Hemoglobin (g/dl)	17.30 \pm 0.49	16.78 \pm 0.20	16.86 \pm 0.41	15.32 \pm 0.26*
Hematocrit (%)	48.00 \pm 0.31	47.6 \pm 0.32	48.20 \pm 1.2	38.6 \pm 0.63***
MCV (fl)	56.20 \pm 1.4	55.40 \pm 1.18	56.80 \pm 1.43	49.82 \pm 1.33*
MCHC (g/dl)	34.11 \pm 0.89	34.19 \pm 0.37	33.76 \pm 0.93*	38.38 \pm 0.98***
RDW%	11.72 \pm 0.22	12.42 \pm 0.23	13.24 \pm 0.23**	11.92 \pm 0.33
Protein (mg/dl)	7.84 \pm 0.22	7.76 \pm 0.04	7.52 \pm 0.28	7.20 \pm 0.14

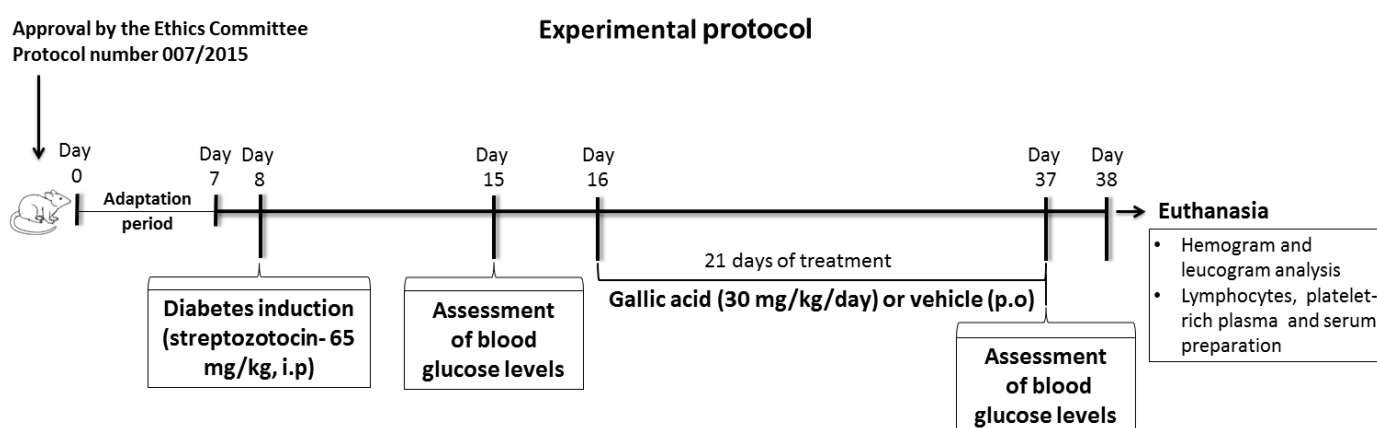


Figure 1

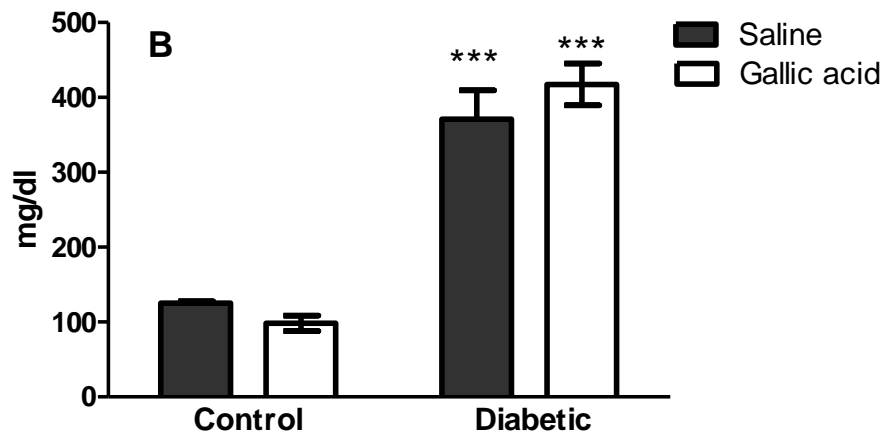
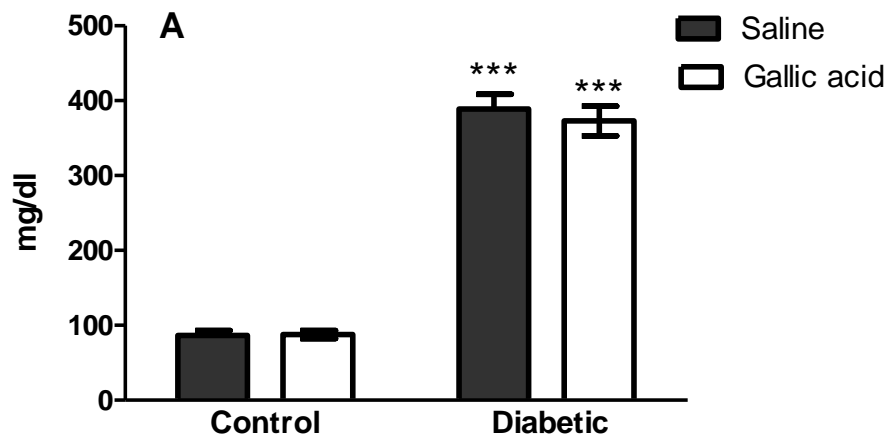


Figure 2

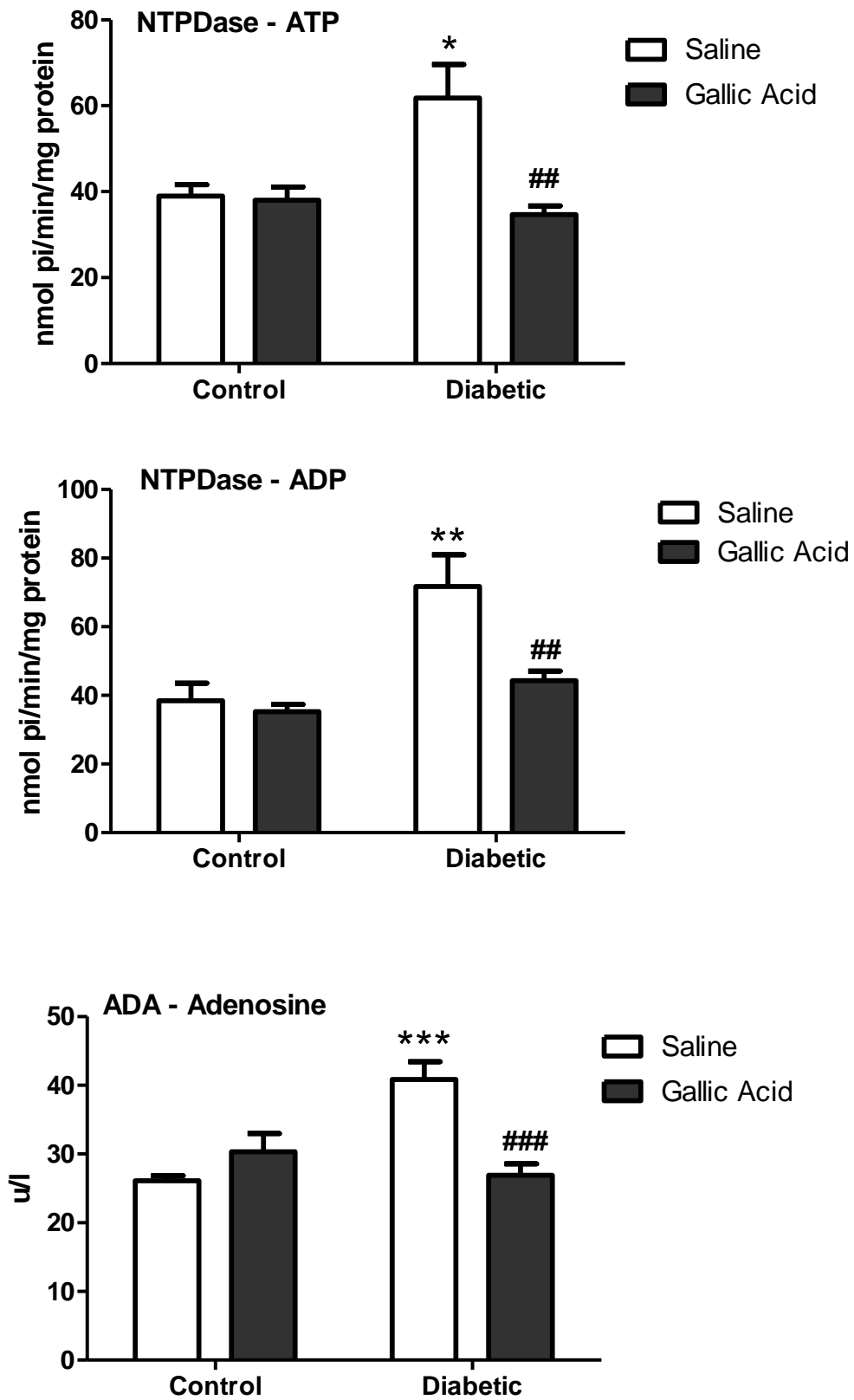


Figure 3

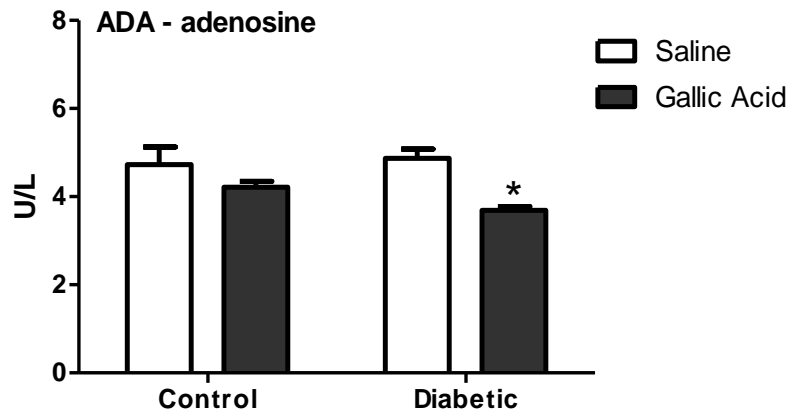
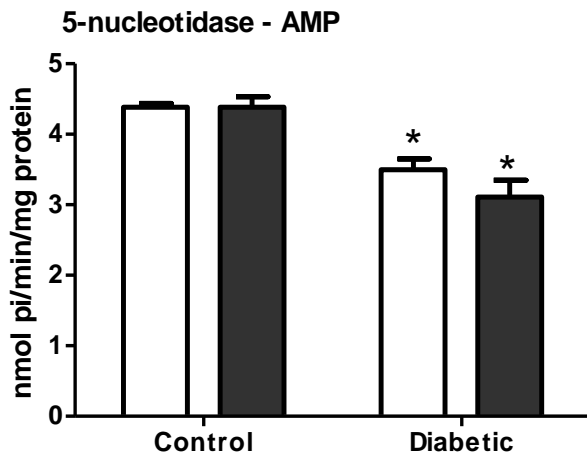
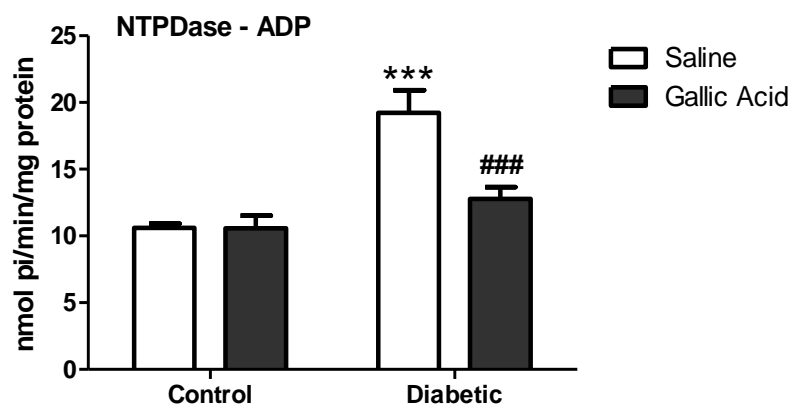
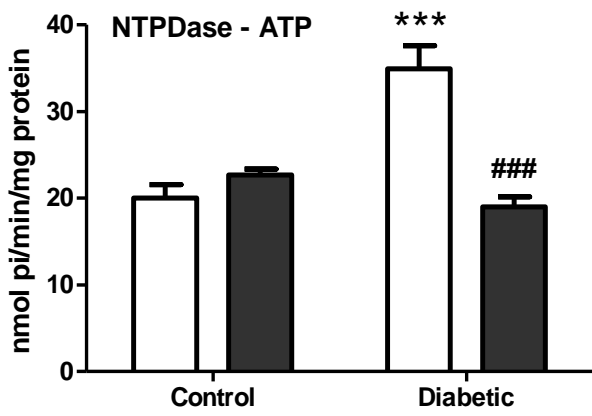


Figure 4

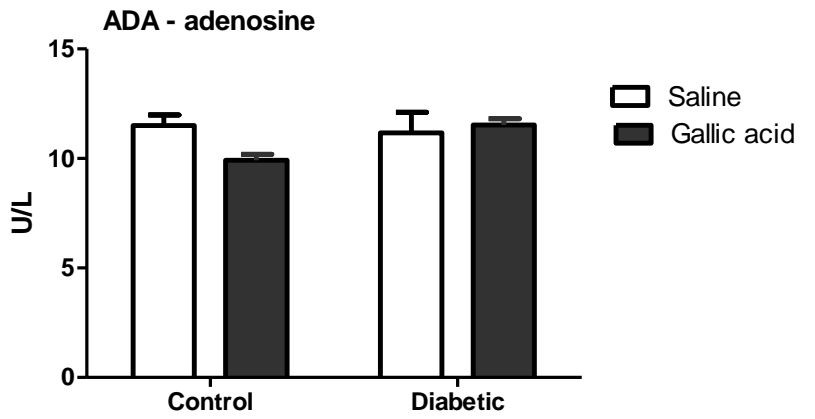
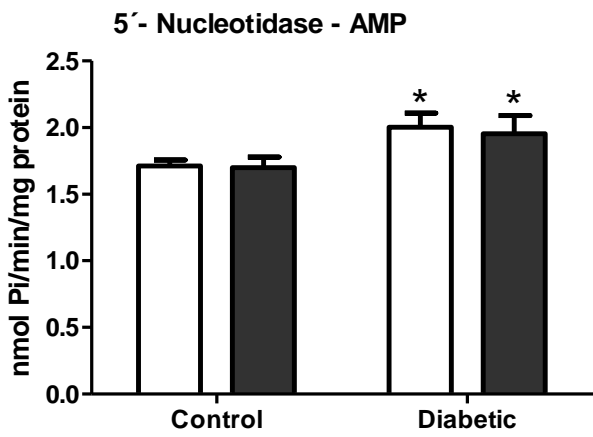
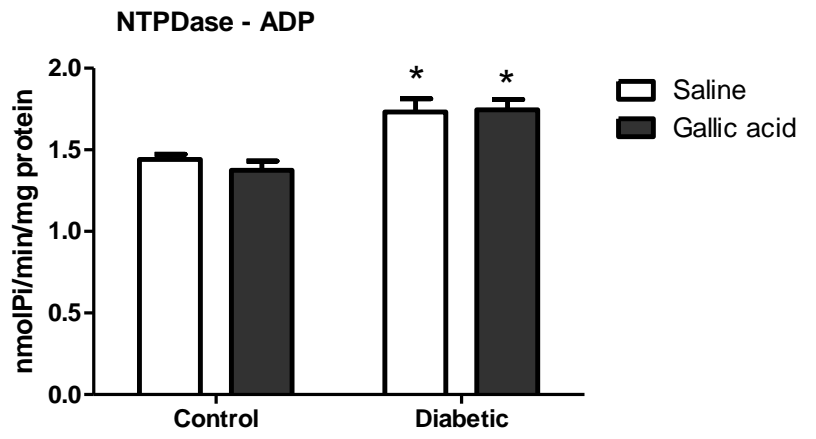
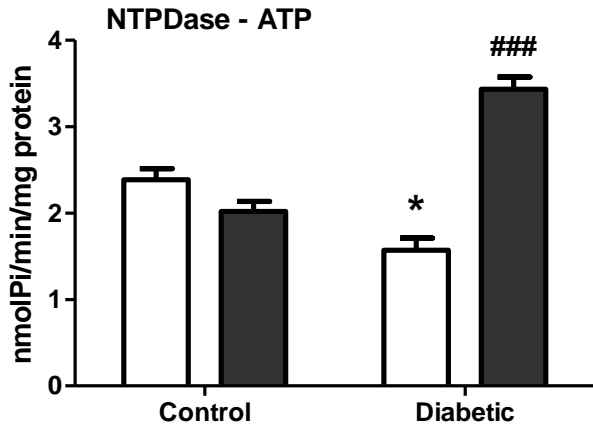


Figure 5

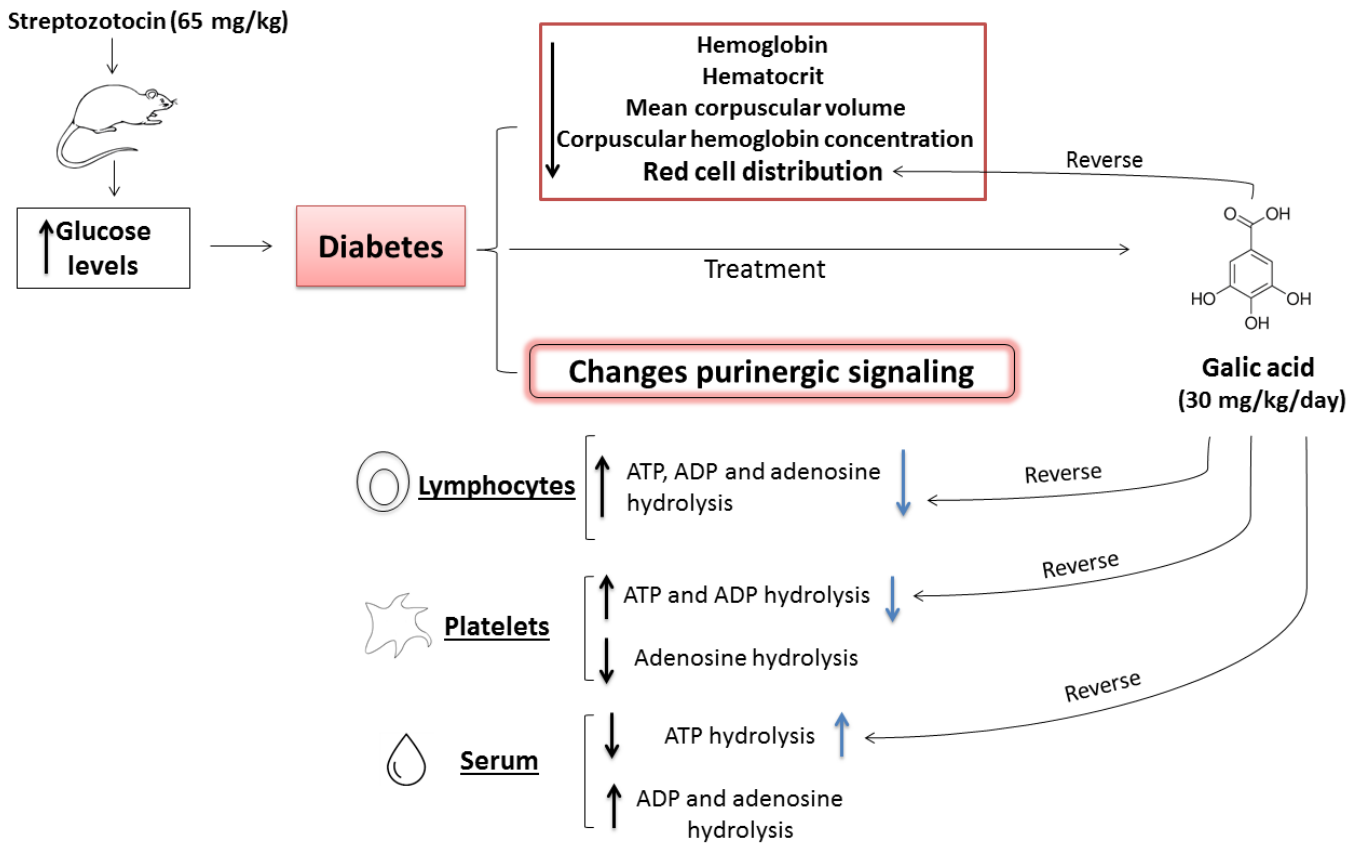


Figure 6

5. Conclusão

- Nos parâmetros hematológicos nos animais diabéticos tratados com ácido gálico, foram observados uma diminuição nos níveis de hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio (VCM), sugerindo ter desencadeado anemia nesses animais. Isso se deve possivelmente a uma diminuição nas funções do fígado e do baço nos animais diabéticos, o que pode ter contribuído para esse possível efeito do ácido gálico.
- Os efeitos benéficos do ácido gálico sobre o sistema imunológico no DM, sugere que a sinalização purinérgica está envolvida na modulação das funções dos linfócitos e pode contribuir para a interrupção da resposta inflamatória e imunológica no DM.
- O ácido gálico foi capaz de reverter o aumento da atividade da enzima NTPDase e diminuir a atividade da ADA em plaquetas de ratos diabéticos. Esse efeito pode estar contribuindo para aumentar os níveis de adenosina, uma molécula com ações antiagregantes.
- Não ocorreram alterações no leucograma em nenhum dos grupos avaliados, sugerindo que os benefícios do ácido gálico estão associados a modulação enzimática e não a alterações no número de células que expressão as enzimas NTPDase, 5'- nucleotidase e adenosina desaminase em linfócitos e plaquetas.

6. Referências Bibliográficas

AKK A. Response of plant parts and age on distribution of secondary metabolites on plants in Quetta. **Pakistan Journal Botanical**, v. 41, n.5, p. 2129–2135, 2009.

AKYOL H, et al., Phenolic compounds in the potato and its byproducts: An overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p.835, 2016.

ARMSTRONG, E. J.; RUTLEDGE, J. C.; ROGERS, J. H.. Coronary artery revascularization in patients with diabetes mellitus. **Circulation**, v.128, n.15, 1675–1685, 2013.

AYELET, KAMINITZ.; SHIFRA, A. S.H.; NADIR ASKENASY. Neutralization Versus Reinforcement of Proinflammatory Cytokines to Arrest Autoimmunity in Type 1 Diabetes. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology** , 2016.

BRADFORD, MARION, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n.1-2, p. 248-254, 1976.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v.10, n. 4, p. 529-564, 2014.

BURNSTOCK, GEOFFREY. Purinergic signalling: from discovery to current developments, **Experimental Physiology**, v.99, n. 1, p. 16–34, 2014.

BURNSTOCK, GEOFFREY. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential. **The Keio Journal of Medicine**, v. 62, n. 3, p. 63-73

CERBONE, A. M. et al., Diabetes, vascular complications and antiplatelet therapy: open problems. **Acta Diabetologica**, v.49, n. 1,p. 1 - 13, 2009.

CERF, M. E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology , Diabetes**, v. 4, n. 36, p. 1-12, 2013.

CHEN J. F.; ELTZSCHIG H. K. ; FREDHOLM B. B. Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 4, p. 265-286, 2013.

Daly JW. Adenosine receptors. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation*. **Medline**, v. 82, n. 1, p. 242–247, 1985.

DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 31–40, 2011.

DEAGLIO, S.; ROBSON, S. C. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. **Advances in Pharmacology**, v. 61, p.301-332, 2011.

DEFRONZO, R. A. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773–795, 2009.

DEMIRTUNC, R. et al., The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.23, n.2, p.89-94, 2009.

DI VIRGILIO, F. Hyde: the dual role of extracellular ATP. **Journal of the Autonomic Nervous System** , v. 81, n. 1-3, p. 59-63, 2000.

DI VIRGILIO, F.; BOREA, P. A.; ILLES, P. P2 receptors meet the immune system. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 2, n. 14, p. 1-9, 2015.

Diretrizes Brasileiras De Diabetes, 2015-2016.

ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 34-45, 2013.

FREDHOLM, B. B, et al., J: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Medline**, v. 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

GRANT, P. J. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 2, p. 157–172, 2007.

GUISTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. **Verlag Chemie, Weinheim**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 1984.

HANDWERGER, S.; FREEMARK, M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. **Journal Pediatric Endocrinology & Metabology**, v. 13, n. 4, p. 343–356, 2000.

HAOUARI, M. E., & ROSADO, J. A. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: A review. **Blood Cells, Molecules, & Diseases**, v. 32, n. 4, p. 528–530, 2008.

HERTER, J. M.; ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Platelets in inflammation and immunity, **Journal of thrombosis and homeostasis**, v. 13, n. 3, p. 490, 2014.

HUNSUCKER, S.A. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. **Sciences Signalling**, v. 1, n. 39, p. 1-13, 2008.

JINDAL, S. Platelet indices in diabetes mellitus: indicators of diabetic microvascular Complications. **Hematology**, v. 16, n. 2, p. 86-89, 2011.

KADE, I. J.; ROCHA, J. B. T. Gallic Acid Modulates Cerebral Oxidative Stress Conditions and Activities of Enzyme-Dependent Signaling Systems in Streptozotocin-Treated Rats. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 761-771, 2013.

KIM, S. H. et al. Anti-diabetic effect of cinnam on extracton blood glucose in db/db mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 119-123, 2006.

KOLTAI K, eta al., The effect of blood glucose levels on hemorheological parameters, platelet activation and aggregation in oral glucose tolerance tests. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 35, n. 4, p. 517-525, 2006.

KUBO, I. et al. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3533-3539, 2002.

KUKULSKI, F. et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1,2,3 and 8. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 193-204, 2005.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **European Journal Pharmacology**, v. 616, n. 1-3, p. 7-15, 2009.

LAMEES, A. et al., Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from Punica granatum. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2017.

LEE, W. Gallic Acid Decreases Inflammatory Cytokine Secretion Through Histone Acetyltransferase/Histone Deacetylase Regulation in High Glucose-Induced Human Monocytes. **Journal of medicinal food**, v. 21, n. 5, p. 416-433, 2015.

LIU LIU, et al., Hypoglycemic effect of the polyphenols rich extract from Rose rugosa Thunb on high fat diet and STZ induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyzes adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v.1740, n. 3, p. 421-426, 2003.

MAEDLER, K. et al., Glucose-induced beta-cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **The Journal of the Clinical Investigation**, 2002.

MAHA, H. et al., Attenuation of insulin resistance in rats by agmatine: role of SREBP-1c, mTOR and GLUT-2. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 1, p. 45-56, 2015.

MARCUS, A. J; BROEKAM, M.; DROSOPOULOS, J. HETEROLOGOUS cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by

CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.31, n. 2, p. 234-246, 2003.

MARISCO, P. C. Piracetam prevents scopolamine-induced memory impairment and decrease of NTPDase, 50-nucleotidase and adenosine deaminase activities. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 8, p. 1704–1714 , 2013.

MELPOMENI, P.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products and diabetic complications: A General overview MHO. **Hormones**, v. 4, n.1, p. 28-37, 2005.

MICHNO, A. Alterations of Adenine Nucleotide Metabolism and Function of Blood Platelets in Patients With Diabetes. **DIABETES**, v. 56, n. 2, p. 462-467, 2007.

MORALES, V. M. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 23, p. 5281-5289, 2014.

MUDALIAR, S. Intense Management of Diabetes Mellitus: Role of Glucose Control and Antiplatelet Agents. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 6, p. 1364–1379, 2004.

MUNOZ, D. et al. Dermatitis de contacto por galatos. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 17, p. 173-177, 2002.

NDISANG, J. F.; VANNACCI, A.; RASTOGI, S. Oxidative Stress and Inflammation in Obesity, Diabetes, Hypertension, and Related Cardiometabolic Complications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-3, 2014.

OW, Y. Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, v. 43, n. 3, p. 241- 248, 2003.

PLACIDO, R. P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis reducing the intracellular bacterial viability. **Cellular Immunology**, v. 244, n. 1, p. 10-18, 2006.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, , 2006.

RUGGERI, Z.M. Platelets in atherothrombosis. **Nature Medicine**, v.8, n. 11, p. 1227-1234, 2002.

SALUCCI, M, et al., Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 10, p. 1645-1651, 2002.

SAMANIDOU, V. Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek Sideritis species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 4, p. 608-615, 2012.

SANHUEZA, L. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **PLOS ONE**, p. 1-15, 2017.

SANTILLI, F. Platelets and diabetes mellitus. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 120, p. 28-39, 2015.

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

SERRANO, A. et al., Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 350, n. 1, p. 49-54, 1998.

SITKOVSKY, M.; LUKASHEV, D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 9, p. 712-721, 2005.

SOAITA, I.; YIN, W.; DAVID, A. RUBENSTEIN .Glycated albumin modifies platelet adhesion and aggregation responses. **Platelets**, p. 1-9, 2017.

SOUMYA, D.; SRILATHA, B. Late Stage Complications of Diabetes and Insulin Resistance. **Journal Diabetes Metabolism**, v. 2, n. 9, p. 1-7, 2011.

Spanevello, R. M. et. al., The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 3-4, p. 210-214, 2010.

UMADEVI, S. ; GOPI, V.; VELLAICHAMY, E. Inhibitory Effect of Gallic Acid on Advanced Glycation End Products Induced Up-Regulation of Inflammatory Cytokines and Matrix Proteins in H9C2 (2-1). **Cardiovascular Toxicology Journal**, v. 13, n. 4, p. 396-405, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. [internet]. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/publications/>

XIA E; DENG G; GUO Y; LI H. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 622–646, 2010.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system, **Progress in Neurobiology**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 1996.