

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

**EFEITOS DO ÁCIDO CAFÉICO NA ATIVIDADE DAS ECTOENZIMAS  
NTPDASE, 5'-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA DESAMINASE EM  
RATOS DIABÉTICOS TIPO 1**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Luana Paula Pelinson**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**EFEITOS DO ÁCIDO CAFEICO NA ATIVIDADE DAS ECTOENZIMAS  
NTPDASE, 5'-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA DESAMINASE EM  
RATOS DIABÉTICOS TIPO 1**

**Luana Paula Pelinson**

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Rosa Chitolina Schetinger**  
**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Schmatz**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO ÁCIDO CAFEICO NA ATIVIDADE DAS ECTOENZIMAS  
NTPDASE, 5'-NUCLEOTIDASE E ADENOSINA DESAMINASE EM  
RATOS DIABÉTICOS TIPO 1**

elaborada por  
**Luana Paula Pelinson**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Rosa Chitolina Schetinger**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Bitencourt Rosa Leal**

---

**Prof. Dr. Alexandre Alberto Tonin**

Santa Maria, 27 de julho de 2015.

*Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, verdadeiros exemplos de bravura e incentivadores desde os meus primeiros passos até hoje, pelo amor e confiança que em mim depositaram e por me ensinarem a dar valor às pessoas e à vida. Se cheguei até aqui foi porque vocês vieram segurando a minha mão.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por me iluminar, me dar força interior, guiar meus passos e por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Foi a minha jornada de tropeços, vitórias e derrotas, que me fez enxergar a verdadeira grandiosidade da vida.

Agradeço a minha querida família, meu pai Gildor, minha mãe Elida e meu irmão Samuel, por serem meu suporte, por todo o amor, apoio e valores a mim ensinados.

Um agradecimento especial a minha orientadora professora Maria Rosa, pela dedicação, compreensão, atenção e pela orientação deste trabalho. Sou eternamente grata a vocês, Professoras Rosa e Vera, pela oportunidade que me deram de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora, Roberta Schmatz, por todos os ensinamentos, pelo incentivo e atenção.

À minha “mãe de laboratório” Daniela Zanini, por todos os ensinamentos, amizade, receptibilidade e acolhimento desde os tempos de iniciação científica até agora.

Agradeço à Karine Paula Reichert, minha colega e amiga, pela grande ajuda na realização dos experimentos, pela disposição e pela amizade. Juntas nessa jornada científica aprendemos e nos amparamos muito. Agradeço à Naiara, Juci e Carla por toda a ajuda, pelo tempo que me ofereceram e por me orientarem infinitas vezes.

Agradeço às minhas amigas Diéssica, Lizi, Karine, Aline, Ani, Nathi e Pauline pela amizade, pelos momentos de descontração, pelo apoio, pelos conselhos e ajuda de sempre.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório Jessié, Gustavo, Michelli, Andréia, Fátima, Juliano, Fábio, Aline, Juliana, Taís, Nadyne, Camille, Mariana, Thauan, Julia e Jordana pela ajuda e por compartilhar comigo dúvidas, momentos e experiências.

Eternamente grata às minhas amigas Sah e Fabi, que sem dúvidas também fazem parte deste momento, que mesmo distantes estiveram sempre presentes, apoiando, incentivando e me dando forças ao longo deste tempo.

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação científica.

Aos membros da banca examinadora desta dissertação, professora Daniela e professor Alexandre, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o seu aprimoramento.

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

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro a esse trabalho.

E a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar do calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver."

**Amyr Klink**, em *Mar sem Fim*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### EFEITOS DO ÁCIDO CAFEICO NA ATIVIDADE DE ECTOENZIMAS E NO TEMPO DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA EM RATOS DIABÉTICOS TIPO 1

AUTORA: LUANA PAULA PELINSON  
ORIENTADORA: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER  
CO-ORIENTADORA: ROBERTA SCHMATZ  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de julho de 2015.

O diabetes mellitus (DM) é um importante problema de saúde que afeta a população mundial. Alterações na morfologia e na função das plaquetas, observadas no estado diabético, têm sido consideradas agravantes importantes para as complicações vasculares desta patologia. As plaquetas apresentam propriedades relevantes na trombogênese, como a liberação de ADP, molécula capaz de induzir a agregação plaquetária. A adenosina, proveniente da hidrólise do ATP e ADP, por sua vez, possui propriedades antiagregantes. O controle dos níveis extracelulares destas moléculas e a consequente sinalização purinérgica por elas induzidas é realizado pelas ectoenzimas NTPDase (Nucleotídeo Trifosfato Difosfoidrolase), 5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA). Nesse contexto, estudos têm revelado que os compostos fenólicos possuem a capacidade de modular a atividade das ectoenzimas. Dentre estes compostos, o ácido caféico, encontrado naturalmente no café e em diversas frutas, legumes e ervas, tais como alcachofra, maçã e pêra, possui um amplo espectro de atividades farmacológicas, como propriedades antiplaquetárias. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do tratamento com ácido caféico na atividade das ectoenzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA em plaquetas, bem como no tempo de coagulação sanguínea de ratos diabéticos do tipo 1. Para isso, ratos machos Wistar foram divididos em seis grupos (n=8-10): Controle/óleo, Controle ácido caféico 10mg/kg, Controle ácido caféico 50mg/kg, Diabético/óleo, Diabético/ácido caféico 10mg/kg, Diabético/ácido caféico 50mg/kg. Os animais foram tratados via oral durante 30 dias. Os resultados obtidos demonstraram uma redução significativa na hidrólise do ADP e AMP, assim como no tempo de coagulação sanguínea, além de um aumento significativo na atividade da ADA em ratos diabéticos quando comparamos com o grupo controle. O tratamento com o ácido caféico aumentou a hidrólise do ADP e AMP e o tempo de coagulação sanguínea, enquanto preveniu o aumento da atividade da ADA. Assim, os resultados obtidos indicam que o ácido caféico foi capaz de modular a atividade das ectoenzimas e aumentar o tempo de coagulação sanguínea em ratos Wistar diabéticos tipo 1.

**Palavras-chave:** Diabetes, complicações vasculares, ectoenzimas, compostos naturais, ácido caféico.



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post-Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### EFFECTS OF CAFFEIC ACID ON ECTOENZYMES ACTIVITIES AND BLOOD COAGULATION TIME IN DIABETIC RATS TYPE 1

AUTHOR: LUANA PAULA PELINSON  
ADVISER: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER  
CO-ADVISER: ROBERTA SCHMATZ  
Date and Place of the Defense: Santa Maria, July 27<sup>th</sup>, 2015.

Diabetes mellitus (DM) is an important health problem that affects worldwide human population. Changes in the platelet morphology and function observed in diabetes have been considered an important aggravating to the vascular complications in this pathology. Platelets have relevant properties to thrombogenesis, such as the release of ADP, a molecule capable of inducing platelet aggregation. Adenosine, derived from the hydrolysis of ATP and ADP, in turn has antiagreggant properties. The control of extracellular levels these molecules and subsequent purinergic signaling induced by them is carried out by enzymes NTPDase (Nucleotide Triphosphate Diphosphohydrolase), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA). In this context, studies have revealed that the phenolic compounds have capacity of modulate the activity of the ectoenzymes. Among these compounds, caffeic acid, found naturally in coffee and in various fruits, vegetables and herbs, such as artichoke, apple and pear has a wide spectrum of pharmacological activities, such as antiplatelet properties. Thus, the aim of this study was to evaluate the treatment effect of caffeic acid on ectoenzymes NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activity in platelets as well as the blood coagulation time of diabetic rats type 1. For this, male wistar rats are divided into 6 groups (n= 8-10): Control/Oil; Control/Caffeic acid 10mg/kg; Control/Caffeic acid 50mg/kg; Diabetic/Oil; Diabetic/Caffeic acid 10 mg/kg and Diabetic/Caffeic acid 50 mg/kg, treated during 30 days, via gavage. The results demonstrated a significant decrease on ADP and AMP hydrolysis, as well as on blood coagulation time, besides a significant increase on ADA activity in diabetic rats compared to control group. Treatment with caffeic acid increased ADP and AMP hydrolysis and blood coagulation time, while prevented the increase in ADA activity. With this experiment, it was possible to demonstrate that the caffeic acid was able to modulate the ectoenzymes activities and increase the blood coagulation time in type 1 diabetic rats.

**Keywords:** Diabetes, vascular complications, ectoenzymes, natural compounds, caffeic acid.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>FIGURA 01</b> – Mecanismos de ação da estreptozotocina.....	18
<b>FIGURA 02</b> - Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos de adenina.....	21
<b>FIGURA 03</b> – Estrutura das enzimas da família NTPDase.....	22
<b>FIGURA 04</b> – Estrutura da 5' – nucleotidase.....	23
<b>FIGURA 05</b> – A) Estrutura da ADA B) Estrutura tridimensional da enzima, com o sitio ativo no centro, e as cadeias laterais polares a apolares representadas em rosa e amarelo, respectivamente .....	24
<b>FIGURA 06</b> – Estrutura química do ácido caféico.....	26

### MANUSCRITO

<b>FIGURA 01</b> – E-NTPDase activity in platelets of rats using ATP as substrate. Bars represent means $\pm$ SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; n=10).....	35
<b>FIGURA 02</b> – E-NTPDase activity in platelets of rats using ADP as substrate. Bars represent means $\pm$ SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; n=10).....	36
<b>FIGURA 03</b> - 5'-Nucleotidase activity in platelets of rats using AMP as substrate (nmol Pi/min/mg of protein). Bars represent means $\pm$ SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; n=10).....	36
<b>FIGURA 04</b> – E-ADA activity in platelets of rats. Bars represent means $\pm$ SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; n=10).....	37
<b>FIGURA 05</b> - Coagulation time in platelets of rats. Bars represent means $\pm$ SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; n=10).....	37

## LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

<b>TABLE 01</b> – Effects of treatment with caffeic acid on body weight and blood glucose levels of STZ-induced diabetic rats.....	35
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACRs – Regiões conservadas da apirase  
ADA – Adenosina Deaminase  
ADP – Adenosina Difosfato  
AMP – Adenosina monofosfato  
ATP – Adenosina Trifosfato  
DM – Diabetes Mellitus  
DM 1 – Diabetes Mellitus tipo 1  
DM 2 – Diabetes Mellitus tipo 2  
DMG – Diabetes Mellitus Gestacional  
E- 5'-NT – Ecto-5'-nucleotidase  
E-ADA – Ecto – Adenosina Desaminase  
E-NTPDase – Ecto – Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase  
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio  
GPI – Glicosil Fosfatidilinositol  
NAD- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo  
NTPDases – Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolases  
STZ – Estreptozotocina  
TOTG - Teste oral de tolerância à glicose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>3 MANUSCRITO.....</b>	<b>29</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, situando-se entre as cinco principais causas de morte (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013). A estimativa da Organização Mundial da Saúde é de que cerca de 347 milhões de pessoas no mundo tenham diabetes e que esse número possa dobrar até 2030 e que, anualmente, mais de 1 milhão de pessoas morrem devido às complicações diabéticas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). No Brasil, estima-se que 12 milhões de pessoas sejam portadoras da doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012), sendo que boa parte das pessoas que têm diabetes desconhece a sua própria condição, tornando necessário entender essa patologia e suas consequências letais.

Em condições metabólicas normais, os níveis sanguíneos de glicose são mantidos dentro de uma estreita faixa, através de mecanismos homeostáticos realizados por modulação hormonal. Dois hormônios são os reguladores básicos: glucagon e insulina, secretados e liberados pelas células alfa e beta pancreáticas, respectivamente. Nos períodos de jejum, o glucagon, é responsável pelo estímulo da gliconeogênese e glicogenólise pelo fígado, e após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos, a insulina, principal modulador da homeostase glicêmica, estimula a captação e utilização da glicose pelos diferentes tecidos, mantendo os níveis de glicose sanguínea dentro de seus limites aceitáveis (TIWARI & RAO, 2002).

A insulina, potente hormônio anabólico, é secretada pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas após as refeições, quando ocorre um aumento da concentração de glicose e aminoácidos no sangue. Esse hormônio ainda promove a síntese e armazenamento, além de inibir a quebra e liberação de carboidratos, proteínas e lipídios para a corrente sanguínea (PESSIN & SALTIER, 2000; SALTIER & KAHN, 2001).

Quando ocorre uma destruição das células  $\beta$  do pâncreas com consequente redução na secreção da insulina ou então uma resistência dos tecidos corporais a esse hormônio, a captação da glicose sanguínea pelos tecidos fica comprometida, o que resulta em um acúmulo de glicose no sangue (hiperglicemia), quadro que caracteriza a desordem metabólica chamada DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

A subdivisão do DM segundo a American Diabetes Association (ADA, 2012) compreende quatro classes clínicas:

- DM Tipo 1 (DM1): caracterizado pela deficiência absoluta de insulina resultante da destruição das células  $\beta$  pancreáticas;
- DM Tipo 2 (DM2): associado à resistência insulínica, resultante de um defeito em sua secreção;
- DM gestacional (DMG): diagnosticada durante a gravidez;
- Outros tipos de diabetes devido a diversas causas, tais como: defeitos genéticos nas células  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas e indução química por drogas.

A grande maioria dos pacientes diabéticos pertence a uma das duas primeiras classes etiopatogênicas (DM 1 e DM 2) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

O DM1 (antigamente denominado diabetes *mellitus* dependente de insulina), que compreende cerca de 10% do total de casos, manifesta-se principalmente quando o paciente é ainda jovem e caracteriza-se pela severa ou total destruição das células  $\beta$  pancreáticas, geralmente causada por processo autoimune, levando ao estágio de deficiência absoluta de insulina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Apesar de menos frequente, esse tipo de DM representa uma preocupação significativa de saúde, visto que comumente se desenvolve em pessoas com menos de 30 anos de idade, as quais se tornam dependentes da administração de insulina durante toda a vida (DANEMAN, 2006).

O DM 2 (previamente conhecido como diabetes *mellitus* não dependente de insulina) afeta cerca de 90% dos pacientes diabéticos e manifesta-se geralmente em pessoas adultas com idade superior aos 40 anos. É resultante principalmente da resistência à insulina (liberam o hormônio normalmente, mas este não consegue exercer seus efeitos corretamente) e/ou da deficiência na secreção deste hormônio pelas células beta pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Sua incidência está aumentando dramaticamente e está associada às alterações comportamentais do ser humano, ao estilo de vida sedentário e a obesidade (LAAKSO, 2001; INZUCCHI & SHERWIN, 2010b; HU, 2011). Ao contrário do que acontece com os portadores de DM1, o DM2 não necessita de reposição de insulina (GIACCO & BROWNLEE, 2010).

A maioria dos pacientes com diabetes manifestam a curto-prazo um quadro clássico de poliúria, polidipsia, perda de peso e polifagia. Esses sintomas são frequentes na população diabética, porém a ausência dos mesmos é comum em muitos pacientes e não descarta a possibilidade de existência de hiperglicemia e consequentes alterações funcionais antes mesmo do diagnóstico ser estabelecido (ATKINSON & EISENBARTH, 2001).

Em longo-prazo, o diabetes pode ocasionar danos em vários órgãos, especialmente: olhos, rins, vasos sanguíneos, coração, nervos periféricos e cérebro (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009), o que pode acarretar em complicações como retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica e amputações, que estão relacionadas com as altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, os diabéticos apresentam um aumento da agregação plaquetária, elevando o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, causa de redução de sobrevida nesses pacientes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

A retinopatia diabética, resultado do dano cumulativo nos pequenos vasos, é uma das mais importantes causas de cegueira. Aproximadamente 10% das pessoas desenvolvem grave prejuízo visual e cerca de 2% tornam-se cegas após 15 anos do diagnóstico de diabetes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). O DM é uma das maiores causas do desenvolvimento de nefropatia com evolução para insuficiência renal, importante causa de morbidade e mortalidade, particularmente em pacientes com DM1, dos quais 30 a 35% estão suscetíveis a esta complicação (INZUCCHI & SHERWIN, 2010a). Além disso, a doença pode resultar em neuropatia, que pode levar ao desenvolvimento de úlceras nos pés e amputações (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Adicionalmente, o risco do desenvolvimento de doença cardiovascular e acidente vascular cerebral é muito elevado em diabéticos quando comparamos com indivíduos aparentemente saudáveis. Essas duas principais complicações do estado diabético são responsáveis por 50% das mortes desses indivíduos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Além disso, o risco de morte entre os portadores de diabetes é pelo menos o dobro do risco constatado para pessoas com semelhantes características, mas que não apresentam a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O diagnóstico do DM deve ser feito precocemente já que as complicações diabéticas podem ser evitadas com mudanças no estilo de vida e correções na



hiperglicemia (GROSS et al., 2002). O diagnóstico do DM 1 geralmente acontece logo após o aparecimento da hiperglicemia, visto que esses pacientes apresentam sintomas agudos e o nível glicêmico marcadamente elevado. Diferentemente, o DM 2 é dificilmente diagnosticado até que suas complicações apareçam (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

Na prática clínica, o diagnóstico é realizado através de testes de glicemia e de testes de hemoglobina glicada (A1c). Os testes de glicemia (glicose de jejum e teste oral de tolerância à glicose – TOTG) refletem o nível glicêmico no momento exato do teste, já os testes de hemoglobina glicada refletem a glicemia média dos últimos dois a quatro meses (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2008).

Como a hiperglicemia define o diagnóstico do DM, o controle glicêmico é fundamental no manejo da doença. No DM 1 o foco principal é a reposição diária de insulina e monitorização, além de um estilo de vida saudável, o que aprimora a saúde e facilita a terapia insulínica. Existe uma variedade de preparados insulínicos altamente purificados disponíveis no mercado. Entretanto, o mesmo preparado pode apresentar respostas diferentes em um único paciente, já que o local da administração e a magnitude da dose de insulina influenciam a duração e o pico da maioria dos preparados insulínicos (INZUCCHI & SHERWIN, 2010a).

Para os pacientes com DM 2 é frequentemente indicada a prescrição de antidiabéticos orais, os quais são escolhidos levando em conta aspectos individuais do indivíduo. Além do uso desses fármacos, mudanças no estilo de vida, como alimentação saudável, prática de exercícios físicos, redução de peso e abandono de vícios (fumo, álcool, entre outros) são de extrema importância (INZUCCHI & SHERWIN, 2010b).

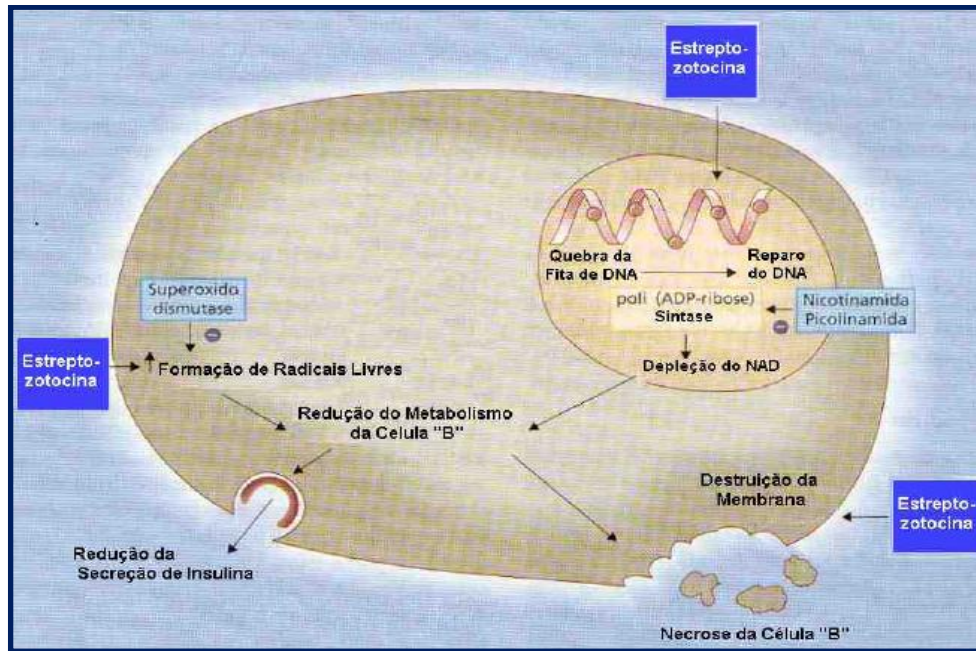
O crescente aumento da incidência do diabetes e suas complicações catastróficas que se traduz tanto em mortes prematuras e incapacidade para o trabalho, quanto por custos elevados associados ao seu controle e tratamento, têm estimulado diversas pesquisas nessa área da endocrinologia. Dessa forma, modelos experimentais têm sido amplamente utilizados a fim de colaborar para aprimorar a compreensão das causas, consequências e tratamento desta endocrinopatia.

Agentes diabetogênicos como a estreptozotocina (STZ) têm sido muito utilizados em estudos experimentais por reproduzirem nos animais um quadro de alterações metabólicas e sintomas semelhantes aos que ocorrem no diabetes naturalmente adquirido (WU & HUAN, 2008).

A STZ é um antibiótico de amplo espectro, que, quando administrado em animais causa destruição seletiva nas células  $\beta$  pancreáticas, resultando em severa deficiência de insulina e instalação do quadro de hiperglicemia (MARITIM et al., 2003; WU & HUAN, 2008). Essa toxicidade dirigida para as células  $\beta$  é devida à similaridade de sua estrutura com a da glicose, o que permite que a STZ seja transportada para interior da célula  $\beta$  através do transportador de glicose GLUT-2, o qual é altamente expresso pelas células produtoras de insulina (SCHNEDL et al., 1994).

O mecanismo de ação da STZ está relacionado com a morte das células pancreáticas através da toxicidade causada pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que acarreta em deficiência de insulina (WU & HUAN, 2008; AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009). Após administrado, esse antibiótico destrói as células  $\beta$  pancreáticas e induz a quebra do DNA pelas EROs. A poli sintase (ADP-ribose), enzima responsável pelo reparo do DNA é ativada e necessita de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para realizar essa função. O aumento na atividade desta enzima pode levar a uma depleção de NAD, o qual é necessário para a produção de insulina. Desta forma, torna-se impossível produzir insulina nas células pancreáticas (Figura 1) (TAKAMA et al., 1995).

Como já mencionado anteriormente, uma das principais complicações diabéticas é o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (RAHIMI et al., 2005; SINGER et al., 2014) No estado diabético, as anormalidades favorecem o estado pró-trombótico, o que é capaz de alterar a atividade de muitas células, entre elas as plaquetas e o endotélio, o que eleva o risco de evolução para aterosclerose, importante fator de risco cardiovascular (STRATMANN; TSCHOEPE, 2005; ALEXANDRU; POPOV; GEORGESCU, 2012).



**Figura 1.** Mecanismo de ação da estreptozotocina. Fonte: Pickup & Williams (1997) com adaptações.

As plaquetas são corpúsculos anucleados presentes no sangue e derivados de células gigantes multinucleadas da medula óssea que desempenham importante função no processo de coagulação sanguínea (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). Suas principais funções incluem a adesão, a agregação e a secreção de substâncias contidas nos grânulos citoplasmáticos (LORENZI et al., 2003).

Comumente, as plaquetas encontram-se em seu estado inativo (EVERTS et al., 2006). Quando ocorre lesão de um vaso sanguíneo, as plaquetas são expostas ao colágeno e são ativadas, iniciando-se uma série de processos que visam evitar a hemorragia. Uma vez ativadas, as plaquetas se modificam morfológicamente, passando da forma discóide a irregular, desenvolvem pseudópodes a partir da membrana que promovem a agregação plaquetária, e, posteriormente, ocorre a liberação de seus grânulos (EVERTS et al., 2006). Dessa forma, as plaquetas são responsáveis pela hemostasia, pois promovem a agregação plaquetária, evitando a hemorragia e auxiliando na reparação dos vasos sanguíneos lesionados (GACHET, 2006).

Uma série de estudos têm demonstrado que as plaquetas de pacientes diabéticos apresentam alterações na sua morfologia e na sua função, além de exibir hiper-reatividade com exagerada adesão, ativação e agregação, fato este que tem sido considerado agravante importante para a patogênese das complicações

vasculares desta endocrinopatia (HAOUARI & ROSADO, 2008; FERREIRO; ANGIOLILLO, 2011; ROZALSKI et al., 2014).

Nesse contexto, a sinalização purinérgica tem sido associada a uma variabilidade de desordens relacionadas ao sistema cardiovascular e é uma importante via de comunicação celular mediada por nucleotídeos e nucleosídeos (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

A sinalização purinérgica envolve três principais constituintes: os nucleotídeos de adenina e seu nucleosídeo correspondente; os receptores através dos quais eles exercem suas funções e as ectoenzimas responsáveis pela hidrólise e controle dos níveis extracelulares destas moléculas (ATKINSON et al., 2006).

Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP, ADP e o seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, representam um importante grupo de moléculas sinalizadoras, que modulam diversos processos fisiológicos e patológicos em diversos tecidos através de seus receptores localizados na superfície celular (ILLES E RIBEIRO, 2004). Essas moléculas estão envolvidas em muitos eventos que acontecem no sistema vascular, incluindo a agregação plaquetária, o tônus vascular e as funções cardíacas (ANFOSSI et al., 2002; ROZALSKI; NOCUN; WATALA, 2005; YEGUTKIN, 2008). A concentração extracelular destas moléculas varia de acordo com fatores como quantidade liberada, dispositivos de recaptção, situações de lise celular e hidrólise pelas ectoenzimas (RATHBONE et al., 1999).

Os nucleosídeos são moléculas resultantes da união de uma base púrica ou pirimídica a uma pentose. Como exemplo de nucleosídeos podemos citar a guanosina, a timina, a inosina e a adenosina. Quando esses nucleosídeos são fosforilados por quinases específicas ocorre a formação de um nucleotídeo. Os principais nucleotídeos envolvidos nos processos biológicos são o ATP, ADP e AMP (ATKINSON et al., 2006).

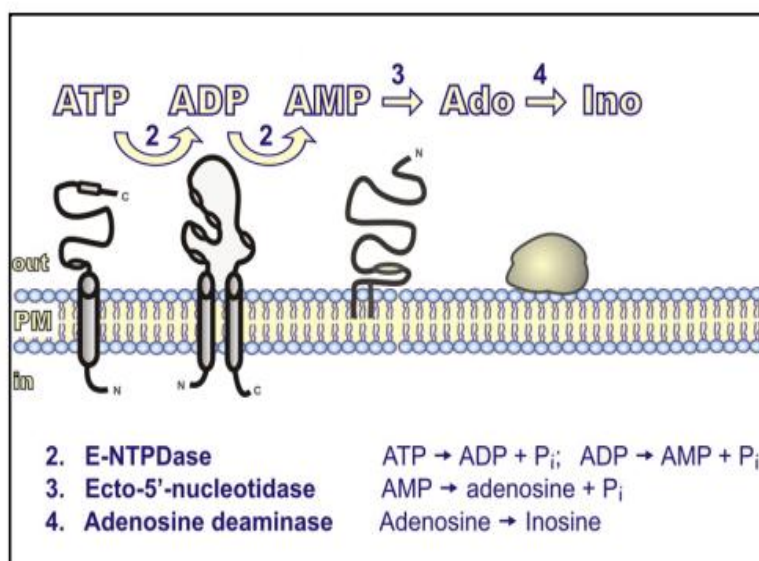
O ATP é considerado um inibidor dos efeitos induzidos pelo ADP. Entretanto, evidências indicam que este nucleotídeo está envolvido de forma complexa nos mecanismos de regulação da agregação plaquetária e exibe efeitos opostos dependendo da concentração, da célula e do receptor que atua. Quando este nucleotídeo está em altas concentrações, atua ativando, entretanto, em baixas concentrações atua inibindo a agregação plaquetária induzida pelo ADP (BIRK et al., 2002; ROZALSKI et al., 2005).

Por outro lado, o ADP tem sido considerado o mais importante agente que modifica e amplifica a ativação das plaquetas, assumindo papel funcional na estimulação do recrutamento e da agregação das plaquetas nos locais de lesão vascular, sendo que concentrações micromolares deste nucleotídeo já são suficientes para a indução da agregação plaquetária (ROZALSKI et al., 2005).

A adenosina, importante nucleosídeo componente do sistema purinérgico, pode ser tanto precursor quanto metabólito dos nucleotídeos de adenina (SHRYOCK & BELARDINELLI, 1997). Presente em todos os tecidos dos vertebrados, possui efeitos inibitórios sobre a agregação plaquetária (ROZALSKI et al., 2005). Este nucleosídeo exerce diversos efeitos protetores, tais como ação cardioprotetora durante a hipertensão e contra a arteriosclerose por meio da vasodilatação e redução da pressão cardíaca (SATO et al., 2005), além de atenuar a liberação de catecolaminas, inibir a ativação de plaquetas e leucócitos e aumentar o fluxo sanguíneo (KINUGAWA et al., 2006). Ademais, a adenosina ainda exerce efeito no metabolismo da glicose e na modulação da ação da insulina (RUTKIEWICZ & GORSKI, 1990). Outro enfoque importante que exemplifica o papel protetor da adenosina é sua ação na ativação de enzimas importantes do sistema antioxidante, tais como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (MAGGIRWAR et al., 1994).

Os níveis extracelulares dessas moléculas são controlados por meio da atividade de uma cascata de enzimas que agem sequencialmente denominadas ectoenzimas, tais como a Ecto-Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDase), a Ecto-5'-Nucleotidase e a Ecto-Adenosina Desaminase (E-ADA), como é possível observar na figura 2. (ZIMMERMANN et al., 2007).

A cadeia enzimática tem início com a ação da enzima NTPDase, a qual é responsável pela catálise da hidrólise das moléculas de ATP e ADP resultando em AMP. Em seguida, a enzima 5'-nucleotidase catalisa a hidrólise do AMP gerando adenosina, a qual é finalmente desaminada, através da ação da enzima ADA, formando inosina (ZIMMERMANN et al., 2007; YEGUTKIN, 2008).



**Figura 2.** Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos de adenina. Fonte: YEGUTKIN (2008) com adaptações

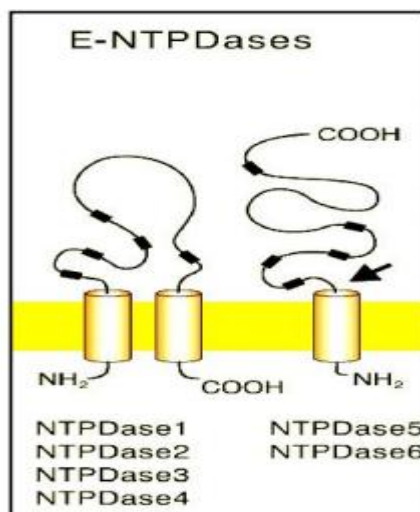
As NTPDases são um grupo de enzimas caracterizadas pela sua capacidade de catálise da hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN et al., 2007), pela dependência de cátions divalentes para exercer sua função (PILLA et al., 1996) e por apresentarem um elevado grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões, conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs) as quais são de extrema importância para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999).

Até o momento, já foram identificados oito diferentes membros da família das E-NTPDases, NTPDase 1 a 8, as quais diferem entre si quanto à especificidade ao substrato, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIOGENESE et al., 2004).

Quatro destas NTPDases (NTPDases 1, 2, 3 e 8) estão localizadas de forma acoplada à membrana plasmática celular, exibindo seu sítio catalítico extracelularmente e são as principais responsáveis pela metabolização dos nucleotídeos no meio extracelular. Enquanto que as NTPDases 4, 5, 6 e 7 apresentam-se localizadas na face interna da célula (Figura 3) (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

Somente na metade da década de 90, a identidade molecular da primeira enzima da família das NTPDases, a NTPDase 1 (ATP difosfohidrolase, Apirase, EC 3.6.1.5, CD39), foi revelada (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Essa

enzima hidrolisa nucleotídeos extracelulares di e trifosfatados, preferencialmente ATP e ADP (LEAL et al., 2005) e encontra-se ancorada na superfície celular por meio de dois domínios transmembrana N e C-terminal, apresentando o sítio catalítico voltado para a face extracelular (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

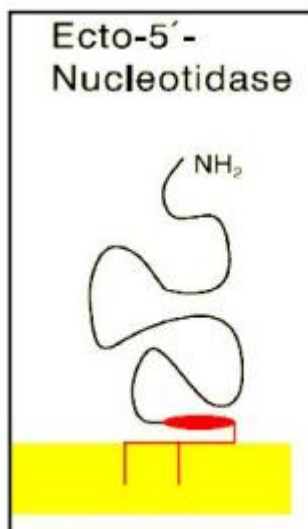


**Figura 3.** Estrutura das enzimas da família E-NTPDase. Fonte: ZIMMERMANN (2001) com adaptações.

A NTPDase 1, expressa em plaquetas de humanos, parece estar envolvida na regulação da concentração dos nucleotídeos, na circulação e no tônus vascular (ENJYOJI,1999). Estudos indicam que a NTPDase 1 tem a capacidade de inibir a agregação plaquetária devido ao fato de participar da cascata de degradação do ATP e ADP, promovendo a formação de adenosina (molécula anti-agregante) juntamente com a enzima 5'-nucleotidase (SCHETINGER et al., 2008). Além disso, a solução purificada de CD39 bloqueou a agregação plaquetária induzida por ADP *in vitro* e inibiu a reatividade plaquetária induzida pelo colágeno (GAYLE et al., 1998; ENJYOJI et al.,1999). Dessa forma, estudos demonstram que o CD39 solúvel constitui um potente agente terapêutico para inibição de processos trombóticos mediados por plaquetas (GAYLE et al., 1998; ENJYOJI et al.,1999).

Outra ectoenzima importante é a ecto-5'-nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5, E-5'NT), a qual está ligada à membrana plasmática via uma molécula de GPI (glicosil fosfatidilinositol) e exibe seu sítio catalítico para o meio extracelular (Figura 4). Essa enzima é responsável pela catálise da hidrólise éster fosfórica do 5'-ribonucleotídeo

para o correspondente nucleosídeo e fosfato. O nucleotídeo mais eficientemente hidrolisado por ela é o AMP, sendo, dessa forma, a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 2001).



**Figura 4.** Estrutura da Ecto-5'-nucleotidase. Fonte: ZIMMERMANN (2001) com adaptações

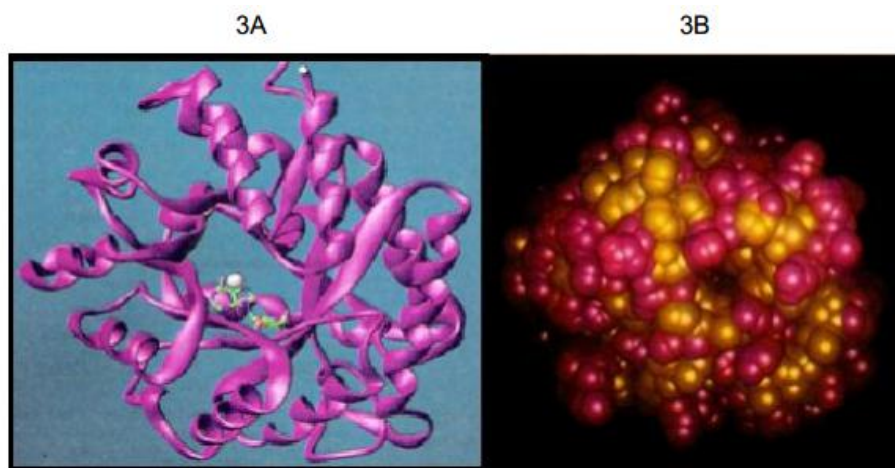
Sete sub-tipos da enzima ecto-5'-nucleotidase já foram isoladas e descritas em humanos até o momento, (HUNSUCKER et al., 2005) as quais são largamente difundidas em uma diversidade de tecidos como fígado, rim, pulmão, células do sistema imune, endotélio vascular e plaquetas (COLGAN et al., 2006).

De acordo com sua localização tecidual, a E-5'NT exerce funções fundamentais como, por exemplo, o controle da agregação plaquetária, a regulação do tônus vascular e também a neuromodulação e neuroproteção no sistema nervoso. Essas funções da E-5'NT correlacionam-se diretamente a sua habilidade em formar adenosina (KAWASHIMA et al., 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

Da mesma forma que as ectonucleotidasas, a enzima E-ADA (E.C.3.5.4.4) também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela hidrólise sequencial dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina (YEGUTKIN, 2008).

A E-ADA (Figura 5) é uma importante enzima da cascata de inativação de purinas, a qual catalisa a desaminação irreversível da adenosina e da desoxiadenosina em inosina e desoxinosina, respectivamente. Sendo assim objeto de considerável interesse devido à sua função na regulação das concentrações extracelulares de adenosina (BLACKBURN; KELLEMS, 2005; YEGUTKIN, 2008).





**Figura 5.** A) Estrutura da E-ADA. B) Estrutura tridimensional da enzima, com o sítio ativo no centro, e as cadeias laterais polares a apolares representadas em rosa e amarelo, respectivamente. Fonte: FRANCO (1998) com adaptações.

Nosso grupo de pesquisa possui estudos bem consolidados na área de DM envolvendo a desordem do sistema purinérgico na patologia e apostando em estratégias preventivas e de tratamento através da associação de compostos naturais provenientes da alimentação (MUSHTAQ et al., 2014; SCHMATZ et al., 2011; STEFANELLO et al., 2014). Estratégia interessante visto que os pacientes diabéticos geralmente precisam obter cuidados nutricionais e uma ferramenta importante e essencial no tratamento da doença é a intervenção na dieta, especialmente se esta for eficiente em prevenir e reduzir as complicações causadas por esta patologia (SHARMA et al., 2006).

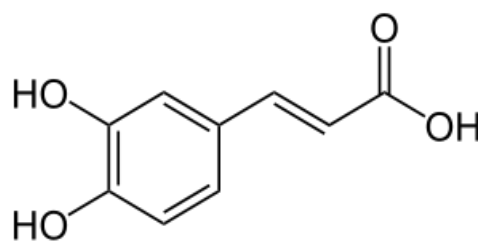
Desde os tempos remotos, as plantas medicinais e seus princípios ativos têm sido utilizados para o tratamento do DM. Na medicina chinesa, cerca de 80 plantas medicinais têm sido usadas naturalmente no tratamento do diabetes e suas complicações (LI et al., 2004). Ao serem avaliadas, a maioria dessas plantas expressou atividade hipoglicemiante e apresentou substâncias em sua constituição que podem ser utilizadas como modelos para a formulação de novos agentes hipoglicemiantes (LAMBA et al., 2000; PÉREZ GUTIÉRREZ, 2002).

Neste contexto, a utilização de compostos naturais provenientes da alimentação parece contribuir positivamente, e os compostos fenólicos são, por certo, as substâncias com maior representatividade, atuando através de diferentes mecanismos de ação. Diversos estudos evidenciaram que esses compostos apresentam ação protetora, exibindo uma diversidade de efeitos benéficos tais

como: antioxidante, hipoglicêmico, hipolipidêmico, anti-inflamatório, imunoestimulante, ansiolítico, neuroprotetor, entre outros (KONO et al., 1998; THOM, 2001; SANTOS et al., 2006; BOUAYED et al., 2007; BASSOLI et al.; 2007). Tais compostos são amplamente encontrados em diversas frutas, verduras, cereais e legumes, assim como em algumas bebidas tais como o vinho, o chá e o café (FARAH & DONANGELO, 2006).

Os compostos fenólicos são estruturalmente fenóis simples e sua divisão se dá em duas classes: os ácidos hidroxicinâmicos e os ácidos hidroxibenzóicos. Além disso, podem aparecer sob duas formas nos alimentos: na forma livre ou na forma conjugada. A forma conjugada pode apresentar-se sob a forma de ésteres, glicosídeos e complexos conjugados e é a mais comumente encontrada (CLIFFORD, 2003). Dentre os ácidos hidroxibenzóicos podemos citar o ácido gálico, o ácido elágico e o ácido 4-hidroxibenzóico. Já dentre os ácidos hidroxicinâmicos, os quais são encontrados em maiores concentrações que os ácidos hidroxibenzóicos em plantas no geral, podemos destacar os ácidos p-cumarínico, ferrúlico, caféico e sináptico (MANACH, 2004; LAFAY & GIL-IZQUIERDO, 2008).

Os ácidos hidroxicinâmicos constituem a maior classe dos compostos fenólicos e o composto mais representativo desta classe é o ácido caféico (TAPIERO et al., 2002). O ácido caféico, encontrado naturalmente em diversas frutas e vegetais, tais como ameixa, maçã, alcachofra, berinjela, uva, pêra e tomates, assim como em chás, ervas e no café e no vinho, (CLIFFORD, 1999; SHI et al., 2003) pode ser isolado de plantas como a *Alsophila spinulosa*, pteridófito originária da China (CHIANG; LO; LU, 1994).



**Figura 6.** Estrutura química do ácido caféico

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0625?lang=pt&region=BR>

A presença do ácido caféico nos componentes da dieta humana demonstra que a biodisponibilidade e os benefícios biológicos deste composto são originados a partir de sua absorção no trato digestivo seguida de sua metabolização. A absorção deste composto tem sido relatada no intestino delgado tanto em humanos como em animais (AZUMA et al., 2000; OLTHOF et al., 2001). É absorvido pelo intestino através de um sistema de transporte após a administração oral (KONISHI et al., 2005).

Os estudos acerca de seu papel biológico incluem um amplo espectro de atividades farmacológicas que incluem prevenção do câncer de pele (KANG et al., 2009), ação antitumoral contra o câncer de cólon (OLTHOF et al., 2001), bloqueio seletivo de leucotrienos, que são componentes envolvidos em doenças imunorreguladoras (REINKE et al., 2002), mecanismo de defesa de plantas (RIAHI et al., 2009), atividade antioxidante (SUN WATERHOUSE, 2011), atividade neuroprotetora (PINHEIRO FERNANDES et al., 2014)) e ação contra a agregação plaquetária (LEE et al., 2014). Contudo, os mecanismos envolvidos nestas propriedades benéficas do ácido cafeico ainda não foram totalmente compreendidos. Estudos têm demonstrado que o ácido caféico é capaz de inibir a agregação plaquetária tanto *in vivo* quanto *in vitro* (OSTERTAG et al., 2011; ANWAR et al., 2013; LEE et al., 2014), além de reduzir a produção de tromboxano A<sub>2</sub> e os níveis de Ca<sup>2+</sup>, moléculas de agregação plaquetária (LEE et al., 2014).

Alguns estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa envolvendo o ácido caféico já foram realizados. Os estudos avaliaram as alterações na atividade das ectoenzimas em linfócitos e plaquetas, assim como o perfil de agregação plaquetária de ratos após o tratamento com este composto. Os resultados demonstraram que o ácido caféico altera a atividade dessas enzimas, bem como reduz a agregação plaquetária induzida por ADP (ANWAR et al., 2013), revelando um possível papel protetor deste composto contra processos trombóticos e, conseqüentemente, contra doenças cardiovasculares.

Em nosso grupo de pesquisa foram realizados vários estudos na área de DM abrangendo compostos naturais fenólicos e polifenólicos, tais como resveratrol (SCHMATZ et al., 2011) ácido clorogênico (STEFANELLO et al., 2014) e ácido rosmarínico (MUSHTAQ et al., 2014). Estes compostos demonstraram capacidade de modular a atividade de ectoenzimas, bem como em reduzir a agregação plaquetária, o que pode vir a contribuir para a prevenção de anormalidades

plaquetárias e, conseqüentemente, complicações vasculares que acontecem no estado diabético (SCHMATZ et al., 2013) .

Adicionalmente, alguns destes compostos apresentaram habilidade em prevenir o aumento da peroxidação lipídica e o aumento da atividade da acetilcolinesterase, demonstrando que podem modular a neurotransmissão colinérgica e prevenir os danos oxidativos no cérebro de ratos diabéticos (MUSHTAQ et al., 2014; STEFANELLO et al., 2014).

Entretanto, apesar de vários estudos envolvendo DM e compostos fenólicos, estudos abrangendo ácido caféico e DM ainda não foram desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. Assim, tendo em vista a interação deste composto com diferentes tecidos e as diversas funções biológicas, incluindo modulação de enzimas e ação contra a agregação plaquetária tiveram papel significativo no interesse à investigação dos efeitos do ácido caféico no sistema purinérgico no estado diabético.

# **OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Verificar o efeito do tratamento com ácido caféico na atividade das ectoenzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA em plaquetas de ratos Wistar diabéticos tipo 1.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar o efeito do tratamento com ácido caféico na atividade da E-NTPDase em plaquetas de ratos diabéticos;
- Avaliar o efeito do ácido caféico na atividade da E-5'-nucleotidase em plaquetas de ratos diabéticos;
- Determinar a atividade da E-ADA em plaquetas de ratos diabéticos tratados com ácido caféico;
- Verificar o tempo de coagulação sanguínea em ratos diabéticos tratados com ácido caféico.

### 3 MANUSCRITO

CAFFEIC ACID MODULATES THE HYDROLYSIS OF THE ADENINE NUCLEOTIDES  
AND INCREASE BLOOD COAGULATION TIME IN SREPTOZOTOCIN-INDUCED  
DIABETIC RATS

Luana Paula Pelinson<sup>a</sup>, Roberta Schmatz<sup>b</sup>, Karine Paula Reichert<sup>a</sup>, Naiara Stefanello<sup>a</sup>, Jucimara Baldissarelli<sup>a</sup>, Carla Polachini<sup>a</sup>, Fátima Abdala Hussein<sup>a</sup>, Diéssica Padilha Dalenogare<sup>a</sup>, Vera Maria Morsch<sup>a</sup>, Maria Rosa Chitolina Schetinger<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul IFRS – Campus Ibirubá.

\*Corresponding author:

Address correspondence and reprint requests to:

Maria Rosa Chitolina Schetinger ([mariachitolina@gmail.com](mailto:mariachitolina@gmail.com))

Tel: + 55-55-3220-9557

Fax: + 55 55 322089

## **Abstract**

This study was designed to assess the potential effect of caffeic acid on E-NTPDase (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase), E-5'-nucleotidase and E-adenosine deaminase (ADA) activities in platelets and blood coagulation time from streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. Male wistar rats are divided into 6 groups (n= 8-10): Control/Oil; Control/Caffeic acid 10mg/kg; Control/Caffeic acid 50mg/kg; Diabetic/Oil; Diabetic/Caffeic acid 10 mg/kg and Diabetic/Caffeic acid 50 mg/kg. Treatments were administered during 30 days and after this period the blood was collected for enzymatic assay. Results showed that ADP and AMP hydrolysis and blood coagulation time were decreased, while ADA activity in platelets were increased in diabetic/oil group compared to the control/oil group. Treatment with caffeic acid increased ADP and AMP hydrolysis and blood coagulation time, while prevented the increase in ADA activity in the diabetic/caffeic acid 10 mg/kg and diabetic/caffeic acid 50 mg/kg groups . These results suggest that caffeic acid was able to modulate the ectoenzymes activities and increase the blood coagulation time in type 1 diabetic rats.

Key words: Diabetes, platelet dysfunction, caffeic acid, ectoenzymes, blood coagulation.

## **Introduction**

Diabetes mellitus has been considered one of the major public health problems of the world. This endocrinopathy, is associated with alterations in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins resulting from defects in insulin secretion, decrease insulin sensitivity, or both and it is characterized by high blood glucose levels [1]. Hyperglycemia plays a major role in platelet hyper reactivity in diabetic patients, which leads to greater sensitivity to aggregating agents, platelet adhesion, activation, and aggregation. Moreover, altered platelets morphology and function observed in these patients have been considered aggravating to the pathogenesis of vascular complications [2].

In this context, purinergic signaling, composed of extracellular nucleotides ATP, ADP, AMP and adenosine nucleoside, regulates several physiological processes in the vascular system including platelet aggregation, vascular tone and cardiac function [3, 4, 5]. ADP is the main agonist of platelet aggregation, while the adenosine is a potent inhibitor of this aggregation and modulator of vascular tone inducing vasodilatation. Since, ATP has a complex role in the regulation of platelet aggregation [6].

Extracellular levels of these molecules is controlled by a cascade of enzymes, called ectonucleotidases such as Ecto-Nucleotide triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), Ecto-5'-nucleotidase and Ecto-Adenosine Deaminase (E-ADA). E-NTPDase is responsible for the hydrolysis of ATP and ADP resulting to AMP [7]. AMP is hydrolyzed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase, which is finally deaminated to inosine through of E-ADA [5].

These ectoenzymes constitute an enzymatic cascade capable to regulate the extracellular concentration of adenine nucleotides and nucleosides playing a key role in maintaining blood homeostasis through the regulation of platelet aggregation [5]. Thereby, the purinergic signaling has been studied by our research group and alterations in extracellular nucleotides and nucleosides hydrolysis have been demonstrated in different pathologies in special in the diabetes [8, 9].

In the last years, various preventive strategies and treatment by natural compounds from the feed have been investigated [10]. In this context, the use of foods containing phenolic compounds seems to contribute positively acting through different mechanisms of action. Several studies showed that these compounds act against cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes mellitus and cancer in humans [11, 12, 13].

Among these compounds, caffeic acid (3,4-dihydroxy cinnamic acid) is a phenolic compound naturally present in fruits, vegetables, teas and herbs, such as coffee, artichokes, basil, and apple [14]. It is known to have a wide spectrum of pharmacological activities, including anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory, (15, 16, 17, 18). However, the mechanisms involved in these properties caffeic acid are not yet fully understood.

Thus, considering the beneficial effects of phenolic compounds and diabetic complications, it is important to investigate the effect of caffeic acid on ectoenzymes and coagulation time in streptozotocin-induced diabetic rats to order to contribute to the search of new therapies that can bring benefits in the prevention and treatment of diabetes.

## **Material and methods**

The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine, STZ, trizma base, sodium azide, HEPES, caffeic acid and coomassie brilliant blue G were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of purity and of the highest analytical grade.



### *Animals*

Adult male Wistar rats (70–90 days, 150-250g) were obtained from the Central Animal House of Federal University of Santa Maria (UFSM). Animals were housed under controlled environmental conditions ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$  and 12 h light/dark cycle), with free access to food and water. The protocol of this study was approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 1954240315).

### *Experimental induction of diabetes*

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 55 mg/kg streptozotocin (STZ) [19] diluted in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5). The age- matched control rats received an equivalent amount of the sodium-citrate buffer. STZ-treated rats received 5% of glucose instead of water for 24 h after diabetes induction in order to reduce death due to hyperglycemic shock. Blood samples of fasting rats were taken from the tail vein 7 days after STZ or vehicle injection. Glucose levels were measured with a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO,USA). Only animals with fasting glycemia over 250 mg/dL were considered diabetic and used for the present study.

### *Treatment with caffeic acid*

Animals were divided randomly into six groups: Control/oil; Caffeic acid 10mg/kg; Caffeic acid 50 mg/kg; Diabetic/oil; Diabetic/caffeic acid 10 mg/kg; Diabetic/caffeic acid 50 mg/kg; One week after diabetes induction, the animals belonging to the group 2 and 5 received 10mg/kg body weight of caffeic acid and the animals belonging to the group 3 and 6 received 50 mg/kg body weight of caffeic acid. Animals of group 1 and 4 received canola oil. Caffeic acid was diluted in canola oil and the solutions were freshly prepared and administrated via gavage once a day during 30 days .

The choice of the doses of 10 and 50 mg/kg of caffeic acid was made based in previous works of our research group, in which rats were treated with caffeic acid in the concentrations of 10 and 50 mg/Kg [20, 21] and also in several studies that used these same concentrations of caffeic acid and obtained beneficial results [22, 23, 24].

It is important to clarify that the chosen vehicle (canola oil) does not interfere in the parameters analyzed, which we observed in a previous study by our research group. This work showed no significant difference on the same methods analyzed in our study between the group treated with oil and the control group (group that received saline) [21].

### *Platelet preparation*

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al. (2004) [25]. Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160g for 15 min. Next, PRP was centrifuged at 1400 g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer and adjusted to 0.4–0.6 mg of protein/mL.

### *E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activity determination*

E-NTPDase enzymatic assay was performed as described by Lunkes et al. (2004) [25]. For AMP hydrolysis, E-5'-nucleotidase activity was carried out as previously described by Lunkes et al. (2004) [25], except that the 5 mM CaCl<sub>2</sub> was replaced by 10 mM MgCl<sub>2</sub>. All samples were performed in triplicate. To each triplicate, two controls without addition of enzyme were carried out for correct non-enzymatic hydrolysis of nucleotides. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (1986) [26]. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

### *Ecto-Adenosine deaminase activity determination (E-ADA)*

The ADA activity was measured in platelets using the method of Guisti and Galanti (1974) [27]. This method is based on the production of ammonia when adenosine deaminase acts in excess of adenosine. Results are expressed in units per milligram of protein (U/mg protein).

### *Coagulation time*

We also evaluated the time for whole blood visual coagulation in all the groups of this experiment. This method determines how long the recently extracted blood lingers takes to clot. Blood was incubated at 30°C and the blood coagulation was monitored carefully. Results are expressed as time (s) spent in coagulations.

### *Protein determination*

Protein content was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) [28] using bovine serum albumin as standard.

### Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. and were analyzed statistically by One-Way ANOVA, followed by Newman Keuls test. Differences between groups were considered to be significant when  $P \leq 0.05$ .

## Results

It is important to point out that seven days after the diabetes induction we observed symptoms associated with diabetes such as polyphagia, polydipsia and weight loss in diabetic rats (Table 1). After diabetes induction and in the end of the treatment, blood glucose levels in the diabetic/oil group were significantly increased compared to control/oil group. On the other hand, caffeic acid had no effect on glucose levels in either diabetic or non-diabetic rats. Besides, the body weight was decreased in diabetic rats compared to control group in both times. At the end of 30 days, however, no differences were observed between the diabetic non-treated and treated rats.

**Table 1** Effects of treatment with caffeic acid on body weight and blood glucose levels of STZ-induced diabetic rats.

Groups	Body weight (g)		Blood glucose levels (mg/dL)	
	Onset	End	Onset	End
Control/oil	402 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	449 $\pm$ 3.93 <sup>a</sup>	79 $\pm$ 2.21 <sup>a</sup>	152 $\pm$ 11.12 <sup>a</sup>
Caffeic acid 10mg/kg	402 $\pm$ 3.23 <sup>a</sup>	460 $\pm$ 5.05 <sup>a</sup>	77 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	159 $\pm$ 10.58 <sup>a</sup>
Caffeic acid 50 mg/kg	398 $\pm$ 4.88 <sup>a</sup>	457 $\pm$ 8.42 <sup>a</sup>	79 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	152 $\pm$ 6.95 <sup>a</sup>
Diabetic/oil	295 $\pm$ 6.76 <sup>b</sup>	266 $\pm$ 7.72 <sup>b</sup>	279 $\pm$ 16.43 <sup>b</sup>	476 $\pm$ 19.75 <sup>b</sup>
Diabetic/caffeic acid 10 mg/kg	295 $\pm$ 8.17 <sup>b</sup>	273 $\pm$ 11.28 <sup>b</sup>	277 $\pm$ 19.92 <sup>b</sup>	432 $\pm$ 25.87 <sup>b</sup>
Diabetic/caffeic acid 50 mg/kg	283 $\pm$ 7.86 <sup>b</sup>	245 $\pm$ 9.57 <sup>b</sup>	274 $\pm$ 23.06 <sup>b</sup>	455 $\pm$ 10.41 <sup>b</sup>

Data represent mean values  $\pm$  S.E.M. Mean values followed by the same letters in the column did not differ significantly by One-Way Anova followed by Newmann Keuls post-hoc test (<sup>a,b</sup> $P \leq 0.05$ , n = 5–10)

The findings of the present study demonstrate that the cascade of ecto-enzymes was altered both in the diabetic state and after treatment with caffeic acid. The figure 1 shows E-NTPDase activity using ATP as substrate. No significant differences were observed in the hydrolysis of this nucleotide.

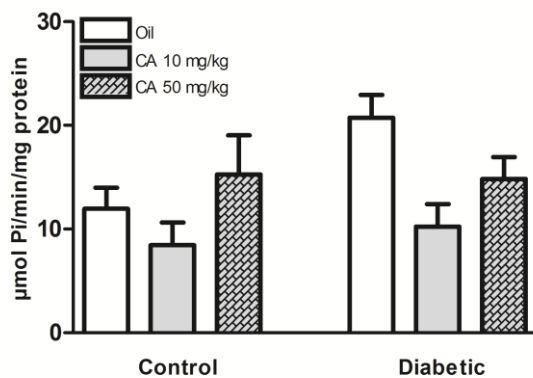


Fig. 1. NTPDase activity in platelets of rats using ATP as substrate. Bars represent means  $\pm$  SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ;  $n=10$ ).

Statistical analysis of ADP hydrolysis data showed a significant decrease on the hydrolysis of this nucleotide in the diabetic group when compared to the control group. No significant differences were observed in the diabetic/caffeic acid 10 mg/Kg and diabetic/caffeic acid 50 mg/Kg groups when compared to the diabetic group (Figure 2).

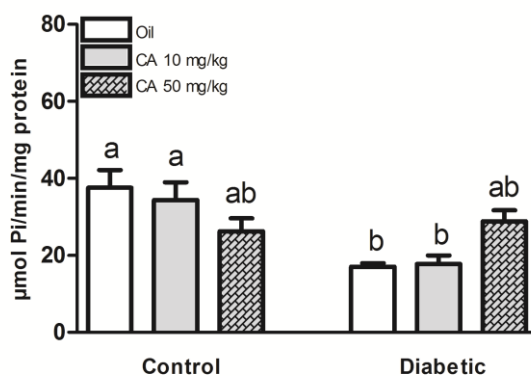


Fig. 2. E-NTPDase activity in platelets of rats using ADP as substrate. Bars represent means  $\pm$  SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P \leq 0.05$ ;  $n=10$ ).

In relation to the E-5'-nucleotidase activity can be observed a significant decrease in the diabetic/oil group when compared with the control/oil group (Figure 3). Treatment with caffeic acid significantly increased AMP hydrolysis in the diabetic/caffeic acid 10 mg/Kg and diabetic/caffeic acid 50 mg/Kg groups when compared to the diabetic group.

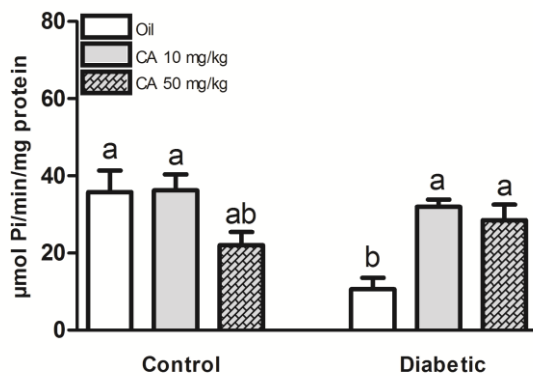


Fig. 3. E-5'-Nucleotidase activity in platelets of rats using AMP as substrate. Bars represent means  $\pm$  SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ).

The results obtained for E-ADA activity are presented in figure 4. E-ADA activity was significantly increased in the diabetic/oil group when compared to control/saline group. However, treatment with caffeic acid significantly prevented the increase in E-ADA activity in the diabetic/caffeic acid 10 and diabetic/caffeic acid 50 groups when compared to the diabetic/oil.

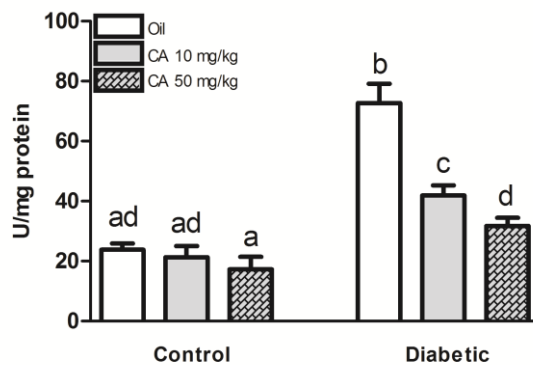


Fig. 4. E-ADA activity in platelets of rats. Bars represent means  $\pm$  SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ).

The whole blood visual coagulation time (Fig. 5) significantly decreased in the diabetic/oil group when compared to control/oil group. However, the treatment with caffeic acid 10 mg/kg and 50 mg/kg significantly prevented this decrease when compared to the diabetic/oil.

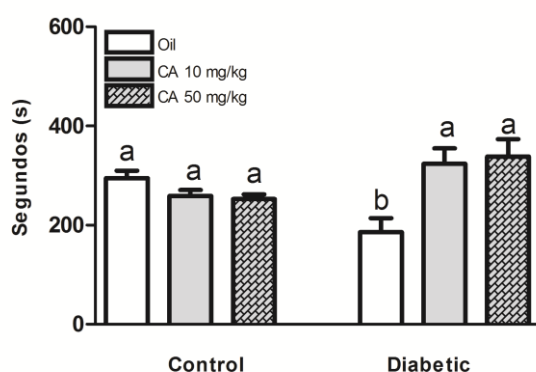


Fig. 5. Coagulation time in platelets of rats. Bars represent means  $\pm$  SEM. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0,05$ ;  $n=10$ ).

## Discussion

Around 17 million of people worldwide die from cardiovascular diseases every year [29]. Cardiovascular disorders are more frequent and early in people who have diabetes and complications in the short and long term caused by this disease, result in high morbidity and mortality [30].

Multiple studies have reported that platelets of diabetic patients presented hyperactivity with exaggerated adhesion, aggregation and thrombin generation favoring the development of vascular complications associated with this pathology [2]. Although some studies have investigated the wide spectrum of biologic effects of caffeic acid (31, 15, 32, 17, 33, 34], the effects of this compound in hydrolyzing of the nucleotides and nucleosides from platelets, in animal models of diabetes still remain unknown. Thus, the present study was carried out to evaluate the effects of caffeic acid on ectonucleotidase activities and coagulation time in platelets of streptozotocin-induced diabetic rats.

Results of several studies clearly demonstrate that the hydrolysis of nucleotides is altered in platelets of diabetic rats, well as in patients with diabetes type 2. In line with this, the results of the present study demonstrated that the ADP hydrolysis was decreased in platelets of diabetic rats (Figure 2). It is important to point out that a reduction in ADP hydrolysis can favor the accumulation of ADP in the extracellular environment. This process can contribute to development of a thrombotic state in diabetes, taking account that the nucleotide ADP is directly involved in activation of the platelets and promoting their aggregation [6, 35].

On the other hand, in the present study the ATP hydrolysis was not altered. No changes in the ATP hydrolysis could be a compensatory mechanism created by the organism

as a way to prevent platelet aggregation, since an increase in ATP hydrolysis can contribute to elevate the levels of ADP, which is a potent pro-aggregator agent [6].

Similarly to the results observed for the hydrolysis of ADP, AMP hydrolysis also presented a reduction, which may result in a lower production of nucleoside adenosine. Adenosine produced by nucleotide catabolism is recognized as a potent vasodilator and inhibitor of platelet aggregation [36, 37]. Thus, with a decrease in adenosine production, this nucleoside cannot exert its protective effects contributing to the development of vascular injury in diabetic state.

In addition, our results demonstrated that E-ADA activity was increased in platelets of diabetic rats (fig. 4). The elevation in E-ADA activity in tissues of diabetic rats induced with STZ was also observed by Rutkiewicz & Górski (1990) [38] and Schmatz et al. (2009) [39]. Furthermore, studies have shown that insulin appears to be involved in the regulation of E-ADA activity in diabetes, and insulin administration is capable of decreasing the elevated activity of this enzyme in these tissues [38, 40, 41]. Thus, it is possible suggested that the increase in E-ADA activity in diabetes found in our study could be explained in part by drastic reduction in the synthesis and secretion of insulin caused by STZ administration, which has destructive actions on pancreatic  $\beta$ -cells.

Additionally, the rapid deamination of adenosine by E-ADA can result in a decrease in adenosine levels in the extracellular medium and may be associated with the development of vascular complications observed in diabetes, since adenosine plays an important role in preventing the thrombotic process.

In parallel the alterations in adenine nucleotides hydrolysis found in this research, the coagulation time showed a significant decrease in diabetic rats compared to the control group. Corroborates with our results El Gendy & Abbas (2004) [42] also showed that the blood coagulation time decreased while platelet aggregation increased in diabetic rats compared to control group. Furthermore, we can suggest that this decrease in coagulation time may be due to the ADP hydrolysis decrease found in our study, which can result in an accumulation of ADP on the extracellular medium.

When treatment with caffeic acid (10 and 50mg/kg) was associated with diabetes an increase on E-5' nucleotidase activity in platelets was found (fig. 3). This result demonstrated that the modulation of this enzyme caused by caffeic acid has a beneficial effect on the diabetic state, since the increase in AMP hydrolysis can enhance the adenosine levels in extracellular means. This nucleoside protects platelets from spontaneous aggregation and thus

can play an important role in homeostatic mechanisms that maintain circulating platelets in a resting, inactivated state and prevents pro-thrombotic process observed in diabetes.

Another important aspect to be discussed is that the treatment with caffeic acid prevented the increase in the ADA activity in platelets of diabetic rats (Figure 4). Studies have suggested that an inhibition of the ADA activity can leads to an increase in adenosine levels in the circulation and intensify the action of this nucleoside on their receptors [43, 44]. Based on our findings, we may suggest that the caffeic acid is able to maintain a high level of adenosine in circulation, which can inhibit platelet aggregation and promote vasodilatation, exerting an important protective role in the prevention of the pathophysiological conditions caused by the hyperglycemic state [3,6].

Similarly to our results, Schmatz, et al. (2013) showed inhibitory effects of different phenolic compounds on adenosine deaminase activity [45]. This study have shown that, *in vitro*, the caffeic acid and other polyphenols decreased significantly the ADA activity in platelets of diabetic rats compared to no treated diabetic group, suggesting that the effects of these polyphenols can contribute to the increase the levels of adenosine in the circulation, playing an important cardioprotective role in diabetic state [45].

An important datum of this study is that the caffeic acid (10 e 50 mg/kg) increased significantly the blood coagulation time in diabetic rats (fig. 5). Previous works of our research group also demonstrated an increase in blood coagulation time in the presence of caffeic acid [21]. This study showed that the time of blood visual coagulation of rats treated with caffeic acid increased significantly compared to control group. Together, these results suggest that this compound can contribute to the decrease of platelet aggregation. Among the several mechanisms proposed it is possible to infer that the caffeic acid may increase the blood coagulation time and consequently reduce platelet aggregation by increasing the ADP and AMP hydrolysis and inhibit the ADA activity, decreasing ADP levels and increasing adenosine levels.

## **Conclusion**

In conclusion, the results found in the present study demonstrate alterations in the blood coagulation time as well as in the adenine nucleotide and nucleoside hydrolysis in platelets of STZ-induced diabetic rats. Furthermore, the compound caffeic acid modulated the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleosides in platelets and consequently increased blood coagulation time in diabetic rats. This way, we propose that the alterations in enzymes



activities observed in this work may indicate some beneficial effects of treatment of caffeic acid on platelet function and it can be one of the mechanisms that this compound can prevent the platelet dysfunction and consequently vascular complications in diabetic state.

## References

- [1] American diabetes association. (2012) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 35, 64-71.
- [2] Stratmann, B., Tschoepe, D. (2005). Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 2, 16–23.
- [3] Anfossi, G., Russo, I., Massuco, P., Mattiello, L., Cavalot, F., Balbo, A., et al. (2002). Adenosine increases human platelets levels of cGMP through nitric oxide: possible role in its antiaggregating effect. *Thrombosis Research*, 105, 71-78.
- [4] Rozalski, M., Nocun, M., Watala, C. (2005). Adenosine diphosphate receptors on blood platelets: potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta BiochimicaPolonica*, 52(2), 411-415.
- [5] Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 673-694.
- [6] Birk, A. V., Bubman, D., Broekman, M. J., Robertson, H. D., Drosopoulos, J. H., Marcus, A. J., et al. (2002). Role of a novel soluble nucleotide phosphohydrolase from sheep plasma in inhibition of platelet reactivity: hemostasis, thrombosis, and vascular biology. *J Lab Clin Med*, 139, 116–24.
- [7] Zimmermann, H., Mishra, S. K., Shukla, V., Langer, D., Gampe, K., Grimm, I., et al. (2007). Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An R Acad Nac Farm*, 73, 537-566.
- [8] Spanevello, R. M., Mazzanti, C. M., Bagatini, M., Correa, M., Schmatz, R., Stefanello, N., et al. (2010). Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol*, 257, 24–30.
- [9] Bagatini, M. D., Martins, C. C., Gasparetto, D., Spanevello, R. M., Becker, L. V., Rosa, C. S., et al. (2011). Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. *Clin Chim Acta*, 412, 159–164.
- [10] Iriti, M., Faoro, F. (2009). Bioactivity of grape chemicals for human health. *Natural Product Communications*, 4, 611-634.

- [11] Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M., Dolara, P. (2001). Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 39(12), 1205-1210.
- [12] McKay, D. L., Blumberg, J. B. (2002). The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1), 1-13.
- [13] Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73(2), 341-347.
- [14] Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6(4), 291-299.]
- [15] Chang, J. H., Ho, C. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxy cinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374–2378.
- [16] Sun Waterhouse, D., Thakorlal, J., Zhou, J. (2011). Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(8), 1575-1585.
- [17] Ban, J. Y., Cho, S. O., Koh, S. B., Song, K. S., Bae, K., Seong, Y, H. (2006). Protection of amyloid beta protein (25-35) induced neurotoxicity by methanol extract of *Smilacis chinae* rhizome in cultured rat cortical neurons. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 230-237.
- [18] Reinke, R. A., King, P. J., Victoria, J. G., Mcdougall, B. R., Ma, G., Mao, Y., et al. (2002). Dicafeoyltartaric Acid Analogues Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Integrase and HIV-1 Replication at Nontoxic Concentrations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(17), 3669-3683.
- [19] Kumar, A., Kaundal, R. K., Iyer, S., Sharma, S. S. (2007). Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sciences*, 80(13), 1236–1244.
- [20] Anwar, J., Spanevello, R. M., Thomé, G., Stefanello, N., Schmatz, R., Gutierrez, J., et al. (2012). Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 103, 386-394.
- [21] Anwar, J., Spanevello, R. M., Pimentel, V. C., Gutierrez, J., Thomé, G., Cardoso, A. et al. (2013). Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 459-466.
- [22] Li, Y., Jiang, F., Chen, L., Yang, Y., Cao, S., Ye, Y., et al. (2015). Blockage of TGFb-SMAD2 by demethylation-activated miR-148a is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cell-like properties in vitro and in vivo. *FEBS Open Bio*, 5, 466-475.

- [23] Jeon, Y. D., Kee, J. Y., Kim, D. S., Yo, H. H., Sung, H. K., Su, J. K., et al. (2015). Effects of *Ixeris dentata* water extract and caffeic acid on allergic inflammation in vivo and in vitro. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 15, 196.
- [24] Genaro-Mattos, T. C., Maurício, A. Q., Rettori, D., Alonso, A., Hermes-lima, M. (2015). Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach. *Plos One*.
- [25] Lunkes, G., Lunkes, D., Morsch, V., Mazzanti, C., Morsch, A., Miron, V., Schetinger, M. R. (2004). NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan-induced diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 65(1), 1–6.
- [26] Chan, K., Delfert, D., Junger, K.D. (1986). A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Analytical Biochemistry*, 157(2), 375–378.
- [27] Guisti, G., Galanti, B. (1984). Colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 315–323.
- [28] Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- [29] World health organization (WHO). (2014). Cardiovascular diseases. <http://www.euro.who.int/en/healthtopics/noncommunicablediseases/cardiovascular-diseases>. Acessado em janeiro de 2015.
- [30] Ministério da saúde. (2013). *Cadernos de Atenção Básica. Diabetes Mellitus*, 36, 19-30.
- [31] Yamada J., Tomita Y. (1996). Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(2), 328-329.
- [32] Chung, T.W., Monn, S. K., Chang, Y. C., Ko, J. H., Lee, Y. C., Cho, G., et al. (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal*, 18(14), 1670–1681.
- [33] Gulcin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid. *Toxicology*, 217, 213–220.
- [34] Kang, N. J., Lee, K. W., Shin, B. J., Jung S. K., Hwang, M. K., Bode, A. M., et al. (2009). Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*. 30(2), 321-330.

- [35] Remijn, J. A., Wu, Y., Jeninga, E. H., Ijsseldijk, J., Willigen, G., Groot, P., et al. (2002). Role of ADP receptor P2Y<sub>12</sub> in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 686–691.
- [36] Atkinson, B., Dwyer, K., Enjyoji, K., Robson, S.C. (2006). Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol.Dis*, 36, 217–222.
- [37] Robson, S., Sévigny, J., Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, 2, 409–430.
- [38] Rutkiewicz, J., Gorski, J. (1990). On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. *FEBS Lett*, 271, 79–80.
- [39] Schmatz, R., Schetinger, M. R., Spanevello, R. M., Mazzanti, C. M., Stefanello, N., Maldonado, P. A., et al. (2009). Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, 84, 345-350.
- [40] Kurtul, N., Pence, S., Akarsu, E., Kocoglu, H., Aksoy, Y., Aksoy, H., et al. (2004). Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Medica*, 47(1), 33–35.
- [41] Prakash, M. S., Chennaiah, S., Murthy, Y. S. R., Anjaiah, E., Rao, S. A., Suresh, C. (2006). Altered adenosine deaminase activity in type 2 diabetes mellitus. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*, 7(2), 114–121.
- [42] ElGendy, A. A., Abbas, M. A. (2004). Effects of warfarin and L-carnitine on hemostatic function and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Physiol Biochem*, 70(2), 535-546.
- [43] Melzig, M. F. (1996). Inhibition of adenosine deaminase activity of aortic endothelial cells by selected flavonoids. *Planta Medica*, 62(1), 20–21.
- [44] Koch, H. P., Jager, W., Groh, U., Plank, G. (1992). In vitro inhibition of adenosine deaminase by flavonoids and related compounds. New insight into the mechanism of action of plant phenolics. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 14(6), 413–417.
- [45] Schmatz, R., Mann, T., Spanevello, R., Machado, M. M., Zanini, D., Pimentel, V. C., et al. (2013). Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Biophys*, 65, 129-143.

## 4 CONCLUSÃO

- ✓ A atividade da E-NTPDase para o ADP foi significativamente menor nas plaquetas de ratos diabéticos podendo levar ao acúmulo deste nucleosídeo no meio extracelular e, conseqüentemente, favorecer a agregação plaquetária, bem conhecida no estado diabético.
- ✓ A atividade da E-5'-nucleotidase foi significativamente reduzida nas plaquetas de ratos diabéticos e o tratamento com ácido caféico aumentou significativamente a atividade desta enzima em ratos diabéticos contribuindo provavelmente para a formação da adenosina, a qual possui um importante papel antiagregante e vasodilatador.
- ✓ A atividade da ADA apresentou-se significativamente maior nas plaquetas de ratos diabéticos e o tratamento com o ácido caféico preveniu este aumento contribuindo possivelmente para a manutenção dos níveis de adenosina no meio extracelular.
- ✓ O tempo de coagulação sanguínea reduziu significativamente nos ratos diabéticos e o tratamento com ácido caféico aumentou significativamente, o que poderia reduzir a ocorrência de complicações vasculares em decorrência da agregação plaquetária e poderia estar relacionado ao sistema purinérgico.
- ✓ Em conjunto, esses resultados sugerem que o ácido caféico foi capaz de modular a hidrólise dos nucleotídeos de adenina, contribuindo para o controle da sinalização purinérgica.

## REFERÊNCIAS

ADA – AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.34, s.1, p.62-69, 2011.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potencial therapeutic effects of curcumin , the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, n.1, p.40-59, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, p. 64-71, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2009. **Diabetes Care**, v. 32, p. 13-61, 2009.

ANFOSSI, G. et al. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through nitric oxide possible role in its antiaggregating effect. **Thrombosis Research**, vol. 105, p. 71-78, 2002.

ATKINSON, M. A; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **The Lancet**, v. 358, p. 221-229, 2001.

ATKINSON B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 36, p. 217-222, 2006.

BIGONESSE, F., LÉVESQUE, S.A., LULKUSKI, F., LECKA, J., ROBSON, S.C., FERNANDES, M.J., SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, vol. 43, p. 5511-5519, 2004.

BIRK, A., BROEKMAN, M., GLADEK, E., ROBERTSON, H., DROSOPOULOS, J., MARCUS, A., SZETO, H. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 40, p. 166-175, 2002.

BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Advances in Immunology**, v. 86, p. 1-41, 2005.

BOUAYED, J. et al. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, p. 77-84, 2007.

BURNSTOCK, G., KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. **International Review of Cytology**, vol. 240, p.31-304, 2004.

CHIANG, H. C.; LO, Y. J.; LU, F.J.; Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. **Jour Enzyme Inhib.** v. 8, n.1, p. 61-71, 1994.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinamates: nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT N. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900 -2911, 2003.

COLGAN, S.; ELTZCHIG, H.; ECKLE, T.; THOMPSON, L. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 351-360, 2006.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v.367, p.847-858, 2006.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013/2014. Disponível em <http://www.diabetes.org.br/images/pdf/diretrizes-sbd.pdf> Acesso em janeiro de 2015.

DUNWIDDIE, T., MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31-55, 2001.

ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v. 5, p. 1010-1017, 1999.

EVERTS, P. A. et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. **Growth Factors**, v. 24, n. 3, p. 165-171, 2006.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FERREIRO, J. L., ANGIOLILLO. D. J. Diabetes and Antiplatelet Therapy in Acute Coronary Syndrome. **Circulation**, vol. 123, p. 798-813, 2011.

GACHET, C. Regulation of Platelet Functions by P2 Receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol.46, p.277-300, 2006.

GAYLE III, R.B.; MALISZEWSKI, C.R.; GIMPEL, S.D.; SCHOENBON, M.A.; GAPARV, R.G.; RICHARDS, C.; BRASSEL, K.; PRICE, V.; DROSOPOULOS, J.H.F.; ISLAN, N.; ALYONYCHEVA, T.N.; BROEKMAN, M.J.; MARCUS, A.J. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.9, p.1851-1859, 1998.

GIACCO, F., BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **National Institutes of Health**, v. 9, p. 1058-70, 2010.

GROSS, J.L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.1, p.16-26, 2002.

HAOUARI, M. E.; ROSADO, J. A. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 41, n. 1, p. 119-123, 2008.

KAWASHINA, Y., NAGASAWA, T., NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5´nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v. 96, p. 2157-2162, 2000.

HU, F.B. Globalization of diabetes. The role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v.34, p.1249-1257, 2011.

HUNSUCKER, S., MITCHELL, B., SPYCHALA, J. The 5´-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 107, p. 1-30, 2005.

ILLES, P., RIBEIRO, A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, p. 5-17, 2004.

INZUCCHI, S.E.; SHERWIN, R.S. Diabetes mellitus tipo 1. In: GOLDMAN,L.; AUSIELLO, D. Cecil Tratado de Medicina Interna, 23ed. Rio de Janeiro:Elsevier, v.2, cap. 247, p.1988-2013, 2010a.

INZUCCHI, S.E.; SHERWIN, R.S. Diabetes mellitus tipo 2. In: GOLDMAN,L.; AUSIELLO, D. Cecil Tratado de Medicina Interna, 23ed. Elsevier, v.2, cap.248, p.2013-2028, 2010b.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANG, N. J.; LEE, K. W.; SHIN, B. J.; JUNG S. K.; HWANG,M. K.; BODE, A. M.; HEO Y.; LEE, H. J.; DONG, Z. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. **Carcinogenesis**. v. 30, n. 2, p. 321-330, dez. 2009.

KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of Resveratrol. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, p. 65-70, 2006.

KINUGAWA, T. et al. Catabolism of adenine nucleotides favors adenosine production following exercise in patients with chronic heart failure. **J Card Fail**, v. 12, p. 720-725, 2006.

KONO, B. et al. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 22-27, 1998.

LAAKSO, M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes: challenge for treatment and prevention. **Journal of Internal Medicine**, v.249, p.225-235, 2001.



LAMBA, S. S. et al. Phytochemicals as potencial hypoglycemic agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.21, 457-495, 2000.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemical Reviews**, v. 7, p. 301-311, 2008.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase 1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1721, p. 9-15, 2005.

LEE, D. H.; KIM, H. H.; CHO, H. J.; BAE, J. S.; YU, Y. B.; PARK, H. J. Antiplatelet effects of caffeic acid due to Ca(2+) mobilizationinhibition via cAMP-dependent inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor phosphorylation. **J Atheroscler Thromb**, v. 21, n. 1, p. 23-37, 2014.

LI, W. L. et al. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol**, v. 92, p. 1-21, 2004.

LORENZI, T.F.; AMICO, E.; DANIEL, M.M.; SILVEIRA, P.A.A.; BUCCHERI, V. Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica. 3ª ed., Ed. Medsi., Rio de Janeiro, 2003.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MAGGIRWAR, S. B. et al. Adenosine acts an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 201, p. 508-515, 1994.

MARITIM, A.C. et al. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.17, n.1, p.24-38, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica. Diabetes Mellitus, Brasília, vol. 36, p. 19-30, 2013.

MUSHTAQ, N et al. Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem Funct**, v. 32, n. 3, p, 287-293, 2014.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Hum. Nutr. Metabol.** v. 131, n. 1, p.66-71. Jan. 2001.

OSTERTAG, L. M.; O'KENNEDY, N.; HORGAN, G. W.; KROON, P. A.; DUTHIE, G. G.; DE ROSS, B. In vitro anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high, non-physiological concentrations. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, n. 11, p. 1624-1636, 2011.

PEREZ GUTIÉRREZ , R. M. Compuestos aislados de plantas com actividad antiinflamatoria, antiviral e hipoglucemiante. **México: Instituto Politécnico Nacional**, p. 139-185, 2002.

PESSIN, E.J.; SALTIEL, R.A. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The journal of Clinical Investigation**, v.106,n.2, 2000.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S.S.; BATTASTINI, A.M.O.; DIAS, R.D.; SARKIS, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225–230, 1996.

PINHEIRO FERNANDES, F. D. et al. Caffeic acid protects mice from memory déficits induced by focal cerebral ischemia. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 7, p.637-647, 2014.

RAHIMI, R. et al. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 59, p. 365-73, 2005.

RATHBONE, M., MIDDLEMISS, P., GYSBERS, J. ET AL. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 663-690, 1999.

REINKE, R. A.; KING, P. J.; VICTORIA, J. G.; MCDUGALL, B. R.; MA, G.; MAO, Y.; REINECKE, M.G.; ROBISON, W. E. JR. Dicaffeoyltartaric Acid Analogues Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Integrase and HIV-1 Replication at Nontoxic Concentrations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 17, p. 3669-3683, July, 2002.

RIAHI, S.; GANJALI, M. R.; KHAJEHSHARIFI, H.; NOROUZI, P.; TAGHIPOOR, S.Theoretical and Experimental Studies on Some Anticancer derivatives: Electrochemical investigation. **Int. J. Electrochem. Sci.** v. 4, n. 1, 122 -133, 2009.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

ROZALSKI, M. et al. Platelet activation patterns are different in mouse models of diabetes and chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Thrombosis Research**, vol. 133, p. 1097-1104, 2014.

ROZALSKI, M., NOCUN, M., WATALA, C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets — potential new targets for antiplatelet therapy. **Acta Biochimica Polonica**, vol.52, p. 411-415, 2005.

RUTKIEWICZ, J.; GÓRSKI, J. On the role of insulin in regulation adenosine deaminase activity in rat tissues. **FEBS Lett**, v. 271, p. 79-80, 1990.

SALTIER, A. R.; KAHN,R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v..414, p. 799 – 812, dez. 2001.

SATO, A. et al., Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, p. 1633-1640, 2005.

SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; BONAN, C.; WYSE, A.T.S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31(2), p. 77-98, 2008.

SCHMATZ, R. Efeitos do resveratrol, do suco de uva e do vinho tinto nos biomarcadores de estresse oxidativo e na atividade de ectoenzimas em ratos diabéticos. 2011. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SCHMATZ, R et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem Biophys**, v. 65, n. 2, p. 129-143, 2013.

SCHNEDL, W. J., et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. **Diabetes**, v. 43, p. 1326-1333, 1994.

SHARMA, S. et al. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.33, n.10, p.940-945, 2006.

SHI, J., KUKAR, T., WANG, C., LI, Q., CRUZ, P. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 17471-17478, 2001.

SHI, J. et al. Polyphenolics in grape seeds biochemistry and functionality. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.

SHRYOCK JC, BELARDINELLI L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 79: 02-10, 1997.

SINGER, J. et al. Effect of intensive glycemic control on platelet reactivity in patients with long-standing uncontrolled diabetes. **Thrombosis Research**, vol. 134, p. 121-124, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. São 12 milhões de diabéticos no Brasil. . Abr, 2012. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/2116-sao-12-milhoes-de-diabeticos-no-brasil> . Acesso em janeiro de 2015.

STEFANELLO, N et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, v. 388, p. 277-286, 2014.

SUN WATERHOUSE, D.; THAKORLAL, J.; ZHOU, J. Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 46, n. 8, p. 1575-1585, 2011.

TAKAMA, Y.; SHIMIZU, H.; SATO, N.; MORI, M.; SHINOMURA, Y. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. **Pharmacology**, v. 50, p. 69-73, 1995.

THOM, E. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effects on body mass when used long-term in overweight and obese people. **Journal of International Medical Research**, v. 35, p. 900-908, 2007.

TIWARI, A.K.; RAO, J.M. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. **Current Science**, v. 83, n.1, p. 30-38, 2002.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –Molecular Cell Research**, v. 1783, p. 673-694, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 facts about diabetes. Disponível em: < <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/index.html> > . Acesso em janeiro de 2015.

WU, K.K; HUAN, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v.40, p.1-5, 2008.

ZIMMERMANN, H. **Two novel families of ectonucleotidases: molecular structure, catalytic properties and a search for function.** Trends in Pharmacological Sciences 1999; 20: 231-236.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v.52, p.44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H. et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537-566, 2007.