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

Naiara Stefanello

EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ NAS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E NO SISTEMA PURINÉRGICO EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

Santa Maria, RS
2016

Naiara Stefanello

EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ NAS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E NO SISTEMA PURINÉRGICO DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

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

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS
2016

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

Stefanello, Naiara
EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ NAS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E NO SISTEMA PURINÉRGICO EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA / Naiara Stefanello.- 2016.
212 p.; 30 cm

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Diabetes Mellitus 2. Sistema Purinérgico 3. Estresse Oxidativo 4. Ácido Clorogênico 5. Café I. Chitolina Schetinger, Maria Rosa II. Título.

©2016
Todos os direitos autorais reservados a Naiara Stefanello. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.
Endereço: Rua Lamartine Babo, n.111, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP: 97105-230
Fone (0xx)5591450328; E-mail: naiabioquimica@gmail.com

Naiara Stefanello

EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ NAS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E NO SISTEMA PURINÉRGICO DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

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

Aprovado em 04 de novembro de 2016:

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Drª
(Presidente/ Orientadora)

Denis Broock Rosemberg, Dr° (UFSM)

Elizandra Braganhol, Drª (UFRGS)

Francieli Moro Stefanello, Drª (UFPel)

Sara Marchesan De Oliveira, Drª (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

A minha família, especialmente minha mãe e minha irmã e a meu pai que infelizmente não se encontra mais entre nós para presenciar esse grande momento. Dedico também ao meu mestre de vida que é um exemplo de humanismo e de perseverança. Muito obrigada a todos que torceram por mim e estiveram comigo a cada vitória alcançada e me deram suporte nos momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

As vezes palavras são uma forma muito simples de expressar o que realmente queremos dizer à quem somos gratos depois que uma jornada finaliza. Após esses quatro anos e meio de doutorado, muitas pessoas influenciaram para que esse trabalho finalmente fosse finalizado e é difícil deixar aqui registrado a importância de cada uma delas. De fato, meu *sensei* sempre diz que sem sentirmos gratidão não podemos elevar nosso estado de vida. Talvez posso correr o erro de não citar todas essas pessoas ou agradecer a todas essas pessoas, mas acredito que o universo é regrado por uma poderosa lei que devolve efeitos positivos àqueles que o praticam.

Assim sendo, dando início a essa sessão quero agradecer a minha família, pois é aquela que está do seu lado em todos os momentos e que dispõem sempre de infinito apoio. Minha Mãe Neli Facco Stefanello e minha irmã Nádia Stefanello, e especialmente meu pai, Saulo José Stefanello que precisou se ausentar mais cedo dessa existência, mas que ficaria extremamente orgulhoso por essa conquista. Também aos outros familiares que de alguma forma contribuíram para me incentivar nesse trajeto, especialmente Neiva Maria Stefanello e Grasiela Facco que além de prima foi minha IC durante um longo tempo e pode contribuir de forma direta para esse trabalho.

De forma especial agradeço a minha professora e orientadora Maria Rosa Chitolina Schetinger por acima de tudo possibilitar que eu pudesse desenvolver esse trabalho. Contudo, isso é apenas uma pequena parte, pois sem seu apoio alguns dos meus sonhos não poderiam ter passado apenas disso: sonhos. Muito obrigada mesmo por não desistir desses sonhos quando eu mesmo estava quase lá. Agradeço também por ter sido como uma mãe durante esses 10 anos de pesquisa, além de todo o incentivo dado, agradeço também pelo conhecimento compartilhado. Também agradeço a professora Vera Morsch que também teve papel muito importante em todos esses anos de pesquisa, auxiliando, orientando sempre que era necessário.

Todo esse trabalho não poderia ter sido desenvolvido sem o apoio dos queridos colegas do ENZITOX, não somente os membros de hoje, mas aqueles que já encerraram esse passo. São eles Roberta Schmatz, Luciane Belmonte por também por ter me mostrado os caminhos da pesquisa e me orientado infinitas vezes. Daniela Zanini, Fabiano Barbosa Carvalho, Jessié Gutierres, Juliano M. Vieira e Marília Valvassori que além de queridos colegas são grandes amigos que estiveram nos momentos de dificuldade e me disponibilizaram seu tempo. Ao Eduardo Machado Dutra, Jucimara Baldissarelli, Diéssica Dalenogare, Pauline Costa, Nathieli Bianchini, Thauan Faccin Lopes, Caroline Curry Martins, Karine Reichert, Luana Paula Pelinson, Paula Maldonado, Margarete Dulce Bagattini, Carla Polachini, Jéssica Lemos, Taís Vidal Palma, Aline Pereira, Gustavo Thomé, Vanessa Miron, Julia Pereira por ter compartilhado comigo o espaço, dúvidas, momentos tristes e angustiantes, momentos felizes, indignações, respeito e muitas outras experiências que são divididas em um ambiente de trabalho

Agradeço também as professoras Rosélia Spanevello e Cinthia Melazzo. Cada uma de sua maneira contribuíram muito para que a minha vida ter levado o caminho que levou e não me arrependo um momento se quer das decisões que tomei e do apoio que cada uma de vocês contribui para essas decisões. Através da Profª Cinthia encontrei o mestre de vida que foi fundamental para eu me tornar essa pessoa que sou hoje.

Agradeço aos professores Dr° Denis Broock Rosemberg, Drª Elizandra Braganhol, Drª Francieli Moro Stefanello, Drª Sara Marchesan De Oliveira por terem aceito avaliar esse trabalho e terem contribuído de forma significativa para que ele se tornar-se ainda melhor.

Ao CNPq e a CAPES e principalmente ao programa PSDE pelo apoio financeiro a esse trabalho, uma vez que sem eles eu não poderia ter realizado esse grande sonho de ter estudado no exterior. Pois esse período de doutoramento no exterior contribuiu de forma muito

significativa para repensar minha visão e meu conhecimento como pesquisador. De forma que acredito que os objetivos do programa tenham sido alcançados.

Dessa forma agradeço ao Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale da Università degli Studi di Ferrara. Principalmente ao Prof Drº Francesco Di Virgilio, orientador estrangeiro fonte de amplo conhecimento que instigava à procura do conhecimento e também pela paciência em relação as minhas limitações e dificuldades. Agradeço também a Simonetta Falzoni por ter tido muita paciência com minha falta de conhecimento na área estudada pela paciência com que me explicava e trabalhava junto comigo. Além disso agradeço aos outros alunos de doutorado do grupo do Prof Drº Di Virgilio pelo apoio e recepção: Marina Capece, Erica Salaro, Elena Gnudi, Elena De Marchi e Elena Adinolfi.

Agradeço também a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de poder cursar a pós-graduação e então desenvolver esse trabalho e através do programa pude conhecer pessoas muito importantes para a minha vida profissional e pessoal que contribuíram muito para o meu desenvolvimento como ser humano.

Aprendi com o meu mestre que a gratidão é o melhor sentimento para se preencher o coração. Assim, sem meu mestre Dr. Daisaku Ikeda muitas coisas poderiam ter sido diferentes. Pois um mestre é aquele que nos direciona pelo melhor caminho para que nos certifiquemos de encontrar a felicidade no final do caminho. Com base nisso tenho uma profunda gratidão ao *sensei*.

Muito obrigado a todos que de uma forma ou de outra participaram e contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, meu aprimoramento como pesquisador e ser humano.

“A coragem não se cultiva em algum lugar especial ou por meio de oportunidades incomuns. O importante é desenvolver a coragem intimamente relacionada a nossa vida diária. Por exemplo, a coragem de não desistir, a coragem de não ficar perdido diante das dificuldades, a coragem de agir, a coragem de acreditar nas pessoas.”

Daisaku Ikeda

RESUMO

EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO, CAFEÍNA E CAFÉ NAS ALTERAÇÕES OXIDATIVAS E NO SISTEMA PURINÉRGICO DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

AUTORA: Naiara Stefanello
ORIENTADORA: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Estudos demonstram que a hiperglicemia no diabetes leva a complicações em diferentes tecidos, causadas principalmente pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O ácido clorogênico é um composto fenólico encontrado no café que apresenta atividade antioxidante, neuroprotetora e hipoglicemiante. Além disso, a cafeína também é encontrada em altas concentrações no café e se destaca por sua ação antioxidante, neuroprotetora e psicoestimulante. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ácido clorogênico (ACG), cafeína (CA) e café (CF) sobre os efeitos da hiperglicemia no sistema purinérgico no córtex cerebral e plaquetas, bem como avaliar a contribuição do sistema de defesa antioxidante frente à hiperglicemia no fígado e rim de diabetes induzido pela administração de estreptozotocina (STZ, 60 mg/kg) em ratos. Os animais foram divididos em oito grupos: Controle; Controle/ACG 5 mg/kg; Controle/CA 15 mg/kg; Controle/CF 0,5 g/kg; Diabéticos; Diabético/ACG 5 mg/kg; Diabético/CA 15 mg/kg; e Diabético/CF 0,5 g/kg. Após trinta dias de tratamento com os compostos, os animais foram submetidos a eutanásia e o córtex cerebral, sangue total, fígado e rim foram retirados. Os resultados demonstraram que houve um aumento de 64,5% e 42% na concentração de ATP e ADP, respectivamente, em ratos diabéticos quando comparados com os ratos controles. Foi encontrado um aumento de 173% na atividade da ecto-5'-nucleotidase (eN) em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos diabéticos. O tratamento com CF nos animais diabéticos promoveu um aumento de 51% na hidrólise de ADP pela NTPDase. Em plaquetas, houve um aumento na atividade da eN e NTPDase em ratos diabéticos quando comparados com os animais controles, bem como um aumento na agregação plaquetária. Todos os tratamentos diminuíram o aumento na hidrólise desses nucleotídeos nos grupos diabéticos tratados em relação ao grupo diabéticos, mas somente o tratamento com CF e ACG levou a uma diminuição em torno de 50% e 60%, respectivamente, na agregação plaquetária quando comparado com o grupo diabético. Observou-se um aumento no estresse oxidativo no fígado e rim dos ratos diabéticos de acordo com a redução na atividade das enzimas Superóxido Dismutase (fígado 42% e rim 10,71%), Catalase (fígado 51,46% e rim 65,45%) e nos níveis de vitamina C (fígado de 62,8% e rim 28,6%) e NPSH (fígado 17,5% e rim 32%) nesses animais. Foi observado também que os parâmetros de lesão hepática estavam aumentados no soro dos animais tratados com STZ. Dos tratamentos testados, somente o ACG apresentou ação antioxidante por restaurar os níveis de vitamina C (94,23%) e NPSH (14,6%), bem como restaurar a atividade da catalase (116%) no fígado de ratos diabéticos tratados com ACG. Por sua vez, o tratamento com CA atua restaurando os níveis de NPSH, bem como diminuindo o aumento da atividade da AST e ALT em soro de ratos diabéticos. O tratamento com CF também reduz o aumento da atividade das enzimas AST, ALT e γ-GT em ratos diabéticos quando comparados com ratos diabéticos não tratados. Os resultados mostraram que esses compostos, principalmente o ACG, composto que apresentou melhores efeitos, podem modular a atividade de enzimas do sistema purinérgico e contribuir com a prevenção das complicações decorrentes da hiperglicemia, além de contribuir também para o combate do estresse oxidativo presente no diabetes mellitus.

Palavras-chave: Cafeína. Ácido clorogênico. Café. Diabetes mellitus.

SUMMARY

EFFECT OF CHLOROGENIC ACID, CAFFEINE AND COFFEE IN CHANGES OF OXIDATIVE AND PURINERGIC SYSTEM OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

AUTHOR: Naiara Stefanello
ADVISER: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Studies show that hyperglycemia in diabetes leads to complications in different tissues, mainly caused by the increased production of reactive oxygen species (ROS). The chlorogenic acid is a phenolic compound found in coffee that has antioxidant, neuroprotective and hypoglycemic activity. In addition, caffeine is also found in high concentrations in coffee and it is notable for its antioxidant, neuroprotective and psycho-stimulating action. The objective of this study was to evaluate the effect of chlorogenic acid (ACG), caffeine (CA) and coffee (FC) on hyperglycemia damages in the purinergic system on the cerebral cortex and platelets, as well as evaluate the contribution of the antioxidant defense system facing hyperglycemia in the liver and kidney of diabetes induced by streptozotocin (STZ, 60 mg / kg) in rats. The animals were divided into eight groups: Control; Control/ACG 5 mg/kg; Control/CA 15 mg/kg; Control/CF 0.5 g/kg; Diabetic; Diabetic/ACG 5 mg/kg; Diabetic/CA 15 mg/kg and diabetic/CF 0.5 g/kg. After 30 days of compounds treatment, the animals were euthanized and the cerebral cortex, whole blood, liver and kidney were removed. Our results demonstrated that there was an increase 64.5% and 42% in ATP and ADP concentration, respectively, in diabetic rats when compared to control rats. A increase 173% in ecto-5'-nucleotidase (eN) activity was found in brain cortex synaptosomes of diabetic rats. Treatment with CF promoted an increase 51% in the hydrolysis of ADP by NTPDase in diabetic animals. In platelets, there was an increase in eN and NTPDase activity in diabetic rats when compared to control animals as well as an increase in platelet aggregation in the same group of animals. All treatments decreased the increase in the hydrolysis of these nucleotides in the diabetic groups treated in relation to the diabetic group, but only the treatment with CF and GCA led to a reduction of around 50% and 60%, respectively, in platelet aggregation when compared to untreated diabetic group. We observed an increase in oxidative stress in liver and kidney of untreated diabetic rats according to: reduced activity of SOD (liver 42% and kidney 10.71%), CAT (liver 51.46% and kidney 65, 45%) and vitamin C levels (liver 62.8% and kidney 28.6%) and NPSH (liver 17.5% and kidney 32%) in these animals. It was also observed that liver damage parameters were increased in serum of STZ-treated animals. Of the treatments tested only the ACG treatment showed antioxidant action to restore vitamin C (94.23%) and NPSH (14.6%) levels, as well as to restore catalase activity (116%) in liver of diabetic rats. In turn, CA treatment works by restoring NPSH levels as well as decreasing the increased AST and ALT activity in serum of diabetic rats. CF treatment also reduces the increased activity of AST, ALT and γ-GT enzymes in diabetic rats when compared to untreated diabetic rats. The results showed that these compounds mainly ACG, a compound that presented better effects, can modulate the activity of enzymes of the purinergic system and contribute to the prevention of complications resulting from hyperglycemia and also contribute to the oxidative stress alterations present in diabetes mellitus.

Keywords: Caffeine. Chlorogenic Acid. Coffee. Diabetes mellitus.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 PCR primers design..... 78

Tabela 2 Glucose levels of control and STZ-induced diabetic rats and treated with chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) at the end of treatment (n = 10). Platelet number in plasma-rich platelets of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and CF (n = 5). Serum fructosamine levels (µmol/l) of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and CF. Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control (WT) group, at P < 0.05, n = 10..... 78

Artigo 2

Tabela 1 Number of the pancreatic islets of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and coffee in the end of treatment (n=5)…..... 105

Tabela 2 Serum ALT, AST, γ-GT, uric acid, creatinine of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and coffee in the end of treatment (n=5)……..... 105

Review em preparação

Tabela 1- Effects of caffeine and caffeine sources and caffeic acid on nucleotide hydrolysis in different experimental protocols..... 144

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

Figura 1 Quantification of nucleotides ATP (A), ADP (B), AMP (C) and adenosine (D) in the cerebral cortex of control and STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, at P < 0.05, n = 4..... 83

Figura 2 NTPDase and 5'-nucleotidase activity in synaptosomes of the cerebral cortex of control and STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) using ATP (A), ADP (B) and AMP (C) as substrate (nmol Pi/min/mg of protein). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, at P < 0.05, n = 6–8..... 84

Figura 3 NTPDase1 (A), NTPDase2 (B) NTPDase3 (C) and 5'-nucleotidase expression in the cerebral cortex of control and STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA at P < 0.05, n = 4.....……... 85

Figura 4 In vitro effects of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and CGA+CA on NTPDase and 5'-nucleotidase activity in synaptosomes from the cerebral cortex of control rats. Results are expressed in means ± SEM. Groups with * had significantly decreased activity and # had significantly increased activity when compared to the control (0 concentration) (P < 0.05, n = 5; One-way ANOVA-Bonferroni test)..... 86

Figura 5 Percentage platelet aggregation using agonist ADP at 5 μmol (A) and 10 μmol (B) in plasma-rich platelets from control and STZ-induced diabetic rats and treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a

significant difference in relation to the diabetic control group, at P < 0.05..... 87

Figura 6 NTPDase and 5'-nucleotidase activity in platelets from control and STZ-induced diabetic rats and treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) using ATP (A), ADP (B) and AMP (C) as substrate (nmol Pi/min/mg of protein). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at P < 0.05..... 88

Artigo 2

Figura 1 Histological analysis showed area of the pancreatic islets to A) control group, B) diabetic group, C) Control/CGA, D) Control/CA and E) Control/CF..... 112

Figura 2 Ascorbic acid content in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group; # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group (P < 0.05; n= 10)……..... 113

Figura 3 NPSH values in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group; # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group (P < 0.05; n= 10).....……..... 114

Figura 4 SOD activity in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group (P < 0.05; n= 10).. 115

Figura 5 CAT activity in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group; # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group (P < 0.05; n= 5)..... 116

Figura 6 δ-ALA-D activity in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group (P < 0.05; n= 5)…… 117

Figura 7 RS levels in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group (P < 0.05; n= 5)… 118

Figura 8 Chlorogenic acid structure……. 119

Review em preparação

Figura 1 A) Cafestol; B) Kahweol; C) Caffeine; D) Chlorogenic acid…..... 146

Figura 2 Effect of caffeine and chlorogenic acid on central nervous system. Caffeine is an antagonist of adenosine receptors and can attenuate the dopaminergic toxicity, it decreases the inflammation and upregulate A_1 receptors. The moderate caffeine administration suppresses brain amyloid-β production. Chlorogenic acid improves the impairment of memory, affects the locomotor activity and exerts anxiolytic and antioxidant effects…….. 147

Figure 3 Effect of caffeine (▲), coffee (●) and chlorogenic acid (♦) on components of antioxidant system and in the oxidative stress. Caffeine treatment is able to restore oxygen and nitrogen reactive species. Caffeine (1 g/L) alone increases catalase and superoxide dismutase (SOD) activities. Coffee drinking increases the glutathione (GSH)

levels as well as reduces lipid peroxidation and, it reduces oxidative DNA damage. Chlorogenic acid prevents the hydroxyl radical formation by iron chelation. Abbreviations: NOS: oxide nitric synthase; GSH-Px: glutathione peroxidase; GSSG: reduced glutathione; GR: glutathione reductase.……..……... 148

Apêndice

Figura 1 – Efeito do tratamento com STZ (200mg/kg) em camundongos pmLuc. A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase em animais tratados com STZ (fotos superiores) e controles tratados com citrato (fotos inferiores) nos tempos Basal (antes do tratamento com STZ), 15 minutos, 5 horas e 24 horas após o tratamento com STZ. B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais de fótons/s. C) tabela com os valores de glicemia dos camundongos tratados com STZ e citrato nos tempos de 5 h e 24 h após o tratamento com STZ, os resultados são expressos em mg de glicose por dl de sangue total. Anova de uma via (n=3)..... 210

Figura 2 Efeito do tratamento com STZ (200mg/kg) e ácido clorogênico (100mg/kg) em camundongos pmLuc. A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase nos camundongos antes do tratamento com STZ (fotos superiores) e após 24 horas (fotos inferiores) nos grupos **CTRL** (controles que receberam Citrato e 1 h depois DPBS), **CGA** (que receberam Citrato e 1h depois 100mg/kg de ACG), **STZ** (que receberam 200mg/kg de STZ e 1h depois DPBS) e **STZ+CGA** (que receberam 200mg/kg de STZ e 1h depois 200mg/kg de ACG) da esquerda para a direita, respectivamente. B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais em fótons/s dos grupo CTRL, CGA e STZ. C) tabela com os valores de glicemia dos camundongos tratados com STZ, STZ+ACG, ACG e citrato nos tempos antes e 24 h após o tratamento com STZ, os resultados são expressos em mg de

glicose por dl de sangue total. Os animais controles não foram medidos após 24 h do tratamento com STZ. Anova de uma via (n=3)..... 211

Figure 3 Efeito do tratamento com ACG e STZ na expressão do receptor P2X7 (3A), CD39 (3B) e CD 73 (3C) em pâncreas de camundongos pemLuc após 24 h do tratamento com STZ. Anova de uma via (n=3-5)… Dados apresentados como RQ – Coeficiente entre a razão do grupo teste com um animal do grupo controle. …… 212

Figure 4 Efeito do tratamento com ACG e STZ na expressão do receptor NLRP 3 (4A) e IlL-1β (4B) em pâncreas de camundongos pmLuc após 24 h do tratamento com STZ. Anova de uma via (n=3-5)… Dados apresentados como RQ – Coeficiente entre a razão do grupo teste com um animal do grupo controle. .....…..... 213

Figura 5 Efeito do tratamento com STZ (141mg/kg) em camundongos pemLuc. A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase em animais tratados com citrato (foto superior esquerda) e STZ (foto superior direita) no tempo basal (antes do tratamento com STZ) e 24 horas após o tratamento com citrato (foto inferior esquerda) e STZ (foto inferior direita). B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais em fótons/s. C) tabela com os valores de glicemia dos camundongos tratados com STZ e citrato no tempo de 24 h após o tratamento com STZ, os resultados são expressos em mg de glicose por dl de sangue total. Teste T de Student (n=3)..... 214

Figura 6 *Ex vivo* resultados após eutanásia dos camundongos pmLuc tratados com STZ (141mg/kg). A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase em pâncreas à esquerda e fígado à direita, onde sempre era colocado um órgão do animal controle (à esquerda) e um órgão do animal tratado com STZ (à direita). B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais em fótons/s. Anova de uma via (n=3)…..……... 215

Figura 7 Efeito do tratamento com STZ na expressão do receptor P2X7 (7A), IlL-1β (7B) NLRP 3 (7C) em pâncreas e fígado de camundongos pemLuc após 24 h do tratamento com STZ. Teste T de Student (n=3-5). Dados apresentados como RQ – Coeficiente entre a razão do grupo teste com um animal do grupo controle. 216

LISTA DE ABREVIAÇÕES

•OH	Radical Hidroxila
•NO_2	Dióxido de azoto
A_1R	Receptor de adenosina A_1
$A_{2A}R$	Receptor de adenosina A_{2A}
$A_{2B}R$	Receptor de adenosina A_{2B}
ACG	Ácido clorogênico
ACQ	Ácido cafeoilquínico
ACQL-S	Cafeoilquinico-lactona-sulfato
ADA	Adenosina Desaminase
ADA	Associação Americana de Diabetes
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina Difosfato
AFQ	Ácido feruloilquínico
AGEs	*Advanced glycation end products*
ALA	Ácido delta-aminolevulínico
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato ciclico
AP-1	Proteína ativadora 1
ATP	Adenosina Trifosfato
BACH-1	Proteína de transcrição Bach-1
Ca^{2+}	Íon cálcio
CA	Cafeína
CAT	Catalase
CD	Cluster de diferenciação
C_{max}	Concentração máxima
CO_2	Gás carbônico
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenase
CTP	Citidina Trifosfato
Cu	Cobre
CYP 1A1	Citocromo P450, família 1, membro 1ª
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças Cardiovasculares
δ-ALA-D	Delta aminolevulinato desidratase
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eN	Ecto-5'-nucleotidase
ENPPs	Ectonucleotídeo Pirofosfato/fosfodiesterases
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FOXO	Proteínas FOX
GABA	Ácido gama aminobutírico
GLUT	Transportadores de Glicose
GPI	Glicofosfotidilinositol
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa
GTP	Guanina Trifosfato
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HbA1C	Hemoglobina glicada
IFN	Interferon
IL	Interleucina

IP3	Inositol Trifosfato
JAK/STAT	*Janus kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) proteins*
JNK	*c-Jun N-terminal kinases*
K^+	Íon potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
Mn	Manganês
MODY	*Maturity onset diabetes of the Young*
Na^+	Íon sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzido
NALP3/ NLRP3	*NLR family, pyrin domain containing 3*
NDP	Nucleotideo Difosfato
NFκB	Fator Nuclear kappa B
NH_3	Amônia
NLR	*NOD-Like Receptor*
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Oxido Nítrico
NOS	Oxido Nítrico Sintase
NPSH	Tióis não proteicos
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritrócito 2
NTP	Nucleotídeo Trifosfato
O_2	Oxigênio molecular
O_2^-	Ânion Superóxido
$ONOO^-$	Radical peroxinitrito
$P2X_1R$	Receptor $P2X_1$
$P2Y_1R$	Receptor $P2Y_1$
$P2Y_{12}R$	Receptor $P2Y_{12}$
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBG	Porfibilinogênio
PKA e C	Proteína Cinase A e C
PLC	Fosfolipase C
PP	Polipeptídio Pancreático
PPARs	Receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma.
RAGE	Receptor de AGE
RE	Reticulo Endoplamático
SH	Grupos tióis
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Estreptozotocina
T_{max}	Tempo máximo
TNAP	Fosfatase alcalina não tecidual
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste Oral de tolerância a Glicose
UDP	Uridil Difosfato
UTP	Uridil Trifosfato
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO..... 29

2.REVISÃO DE LITERATURA..... 33

2.1.Justificativa..... 58

3.OBJETIVOS..... 59

3.1.Objetivo Geral..... 59

3.2.Objetivos Específicos..... 59

4.RESULTADOS..... 61

4.1. Artigo 1 aceito para publicação…… 62

4.2. Artigo 2…… 90

4.3 Review em preparação……..... 120

5. DISCUSSÃO……... 161

6. CONCLUSÕES..... 169

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 171

8. APÊNDICE..... 197

9. ANEXO..... 221

1. Introdução

O diabetes mellitus (DM) é um transtorno metabólico de etiologia múltipla, sendo caracterizada pela hiperglicemia e distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, os quais resultam da falta de insulina ou incapacidade desse hormônio em exercer adequadamente seus efeitos em tecidos-alvo (American Diabetes Association, 2016). De acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF), estima-se que o número de pacientes acometidos dessa doença irá crescer 55% até 2035 (IDF Diabetes Atlas). Estudos têm demonstrado que esses índices têm se elevado nas faixas etárias mais jovens, sobretudo entre os brasileiros, levando a um impacto maior sobre a qualidade de vida.

O DM pode ser classificado principalmente em três principais categorias. O diabetes tipo 1 é caracterizado por uma destruição autoimune das células β pancreáticas, levando a uma absoluta deficiência na secreção da insulina. Já o diabetes tipo 2 caracteriza-se por graus variáveis de resistência tecidual à insulina e uma deficiência relativa na secreção desse hormônio. O diabetes gestacional aparece durante a gravidez, pode levar a sérios riscos para a saúde da mãe e seu bebê e aumentar o risco de desenvolver diabetes tipo 2 posteriormente (American Diabetes Association, 2016).

A estreptozotocina (STZ) tem estrutura semelhante à glicose, dessa forma é transportada para o interior da célula β (Schnedl *et al.*, 1994), onde causa a morte celular das células endócrinas (produtoras de hormônios) do pâncreas, levando à diminuição da produção de insulina e induzido a um quadro de hiperglicemia (Furman, 2015), sendo bastante útil em estudos com modelos animais de indução de diabetes.

A hiperglicemia provoca alterações no balanço oxidante na célula, levando a um aumento no estresse oxidativo, o qual pode acarretar alterações em muitas vias sinalizadoras, estando relacionado com o desenvolvimento de complicações que afetam rins, retina, coração, vasos sanguíneos e seus componentes, bem como o sistema nervoso central (SNC) (Herder *et al.*, 2013; Jayanarayanan *et al.*, 2013; Wada e Makino, 2013). Esses tecidos podem sofrer alteração em vias de sinalização, podendo-se destacar a modulação do sistema purinérgico na tromborregulação, inflamação e neurotransmissão (Burnstock *et al.*, 2011; Hechler e Gachet, 2015). O sistema purinérgico caracteriza-se pelo envolvimento de três componentes principais: os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, os receptores através dos quais essas moléculas exercem seus efeitos e as ectoenzimas responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas (Burnstock, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e o nucleosídeo adenosina sinalizam vias importantes para o funcionamento do SNC (Burnstock, 2006; Duarte *et al.*, 2007; Burnstock *et al.*, 2011). O ATP atua como um neurotrasmissor excitatório, além de estar envolvido nas interações entre neurônio–glia, plasticidade e desenvolvimento neuronal. Já a adenosina possui uma função relevante na neuromodulação e neuroproteção do SNC (Pascual *et al.*, 2005; Burnstock *et al.*, 2011). Em nível vascular, o ATP e o ADP atuam estimulando a agregação plaquetária, enquanto a adenosina tem efeito oposto, inibindo esse processo e atuando de forma protetora no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Robson *et al.*, 2005). O ATP e o ADP ligam-se a receptores do tipo P2, enquanto a adenosina se liga a receptores do tipo P1. Estudos demonstram que esses receptores estão amplamente relacionados a várias funções fisiológicas de células neuronais e gliais, bem como nos componentes do sistema cardiovascular e têm sido implicados numa grande variedade de patologias (Robson *et al.*, 2006; Gutierres *et* al., 2012; Burnstock, 2013).

A sinalização purinérgica induzida por essas moléculas correlaciona-se diretamente com a atividade das ectonucleotidases, como: NTPDase, 5'-nucleotidase (eN) e adenosina deaminase (ADA) (Langer *et al.*, 2008). NTPDase hidrolisa ATP e ADP até AMP, o qual é posteriormente hidrolisado pela enzima eN até adenosina. A adenosina formada é finalmente desaminada pela ação da ADA, formando inosina. A ação conjunta dessas enzimas é muito importante na regulação dos níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina na fenda sináptica e nas plaquetas, regulando o sistema purinérgico (Robson *et al.*, 2006; Zimmermann, 2006; Yegutkin, 2014).

A hiperglicemia persistente durante o diabetes leva a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) através da auto-oxidação da glicose e também pela glicosilação não enzimática de proteínas, entre outros fatores (Chetyrkin *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). Estudos apontam que as EROs apresentam um papel central no desenvolvimento de complicações crônicas características do estado diabético (Sheetz e King, 2002; Rochette *et al.*, 2014), de forma que alterações são observadas nos vasos sanguíneos desses pacientes, as quais estão interligadas com as complicações micro e macrovasculares, podendo estar relacionadas também com a hipereatividade plaquetária destacada por alguns estudos (Colwell e Nesto, 2003; Shi e Morrell 2011; Kim *et al.*, 2013).

Evidências experimentais têm apresentado alterações na sinalização purinérgica, bem como aumento na produção de espécies reativas e diminuição nos sistemas de defesa antioxidante no diabetes (Rochette *et al.*, 2014; Antonioli *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015). Por essa razão, vários pesquisadores têm usado modelos experimentais para avaliar o efeito de

antioxidantes na prevenção e no tratamento de diferentes patologias (Schmatz *et al.*, 2012; Gutierres *et al.*, 2014). Antioxidantes naturais identificados em plantas têm mostrado efeitos benéficos no combate do diabetes e parecem representar uma oportunidade empolgante para o desenvolvimento de novas classes terapêuticas (Schmatz *et al.*, 2013; Raffaelli *et al.*, 2015).

O ácido clorogênico é um produto natural encontrado em grandes quantidades no café, frutas cítricas, maçã, pera e tomate (Garambone & Rosa, 2007). Esse composto fenólico é um éster formado entre o ácido cafeico e o ácido quínico e é um dos polifenóis mais abundantemente encontrados em produtos de origem vegetal (Clifford, 1999). Alguns estudos realizados têm sugerido que apresenta atividade anti-inflamatória (Zhang *et al.*, 2010), antioxidante (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2015) e neuroprotetora (Kwon *et al.*, 2010; Mikami e Yamazawa, 2015). Além disso, evidências experimentais apontam que o ácido clorogênico é um potente inibidor da glicose-6-fosfatase, uma enzima importante na regulação da glicemia (Johnston *et al.*, 2003; Bassoli *et al.*, 2008).

Alguns desses efeitos estão relacionados com o amplo consumo de café, uma vez que esse composto é fortemente encontrado nessa bebida. Estudos demonstram que o café tem compostos ativos que possuem efeitos fisiológicos, tais como alterações cardíacas, na atividade antioxidante e no SNC (Del Castillo *et al.*, 2002; Bonita *et al.*, 2007; Mikami e Yamazawa, 2015). Vale destacar que o consumo de café tem sido associado com a tolerância à glicose e com o baixo risco de diabetes tipo 2, sendo esse efeito relacionado principalmente à cafeína e ao ácido clorogênico (Van Dam, 2008).

Contudo, o composto mais conhecido presente no café é a cafeína. Esta é uma metilxantina antagonista dos receptores de adenosina (Costenla *et al.*, 2010). Além de sua atuação bem documentada no sistema purinérgico, a cafeína pode atuar na eliminação de espécies reativas *in vitro* (Bonita *et al.*, 2007). No diabetes, a cafeína atua na prevenção de algumas alterações promovidas pela hiperglicemia no hipocampo de ratos diabéticos (Duarte *et al.*, 2012). Além disso, a ingestão de cafeína também pode levar à melhoria da hiperglicemia e diminuição na gordura hepática (Yamauchi *et al.*, 2010).

No presente estudo, o objetivo foi investigar o efeito do uso do ácido clorogênico, cafeína e café na reversão de alterações induzidas pela hiperglicemia sobre parâmetros oxidativos e em componentes do sistema purinérgico de ratos submetidos ao modelo animal experimental de diabetes induzida pela administração de estreptozotocina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A saúde é uma condição de total bem-estar físico, mental e social, e não simplesmente a ausência de doenças ou males. Em outras palavras, o conceito de boa saúde não é limitado pelo aspecto físico, mas se estende ao espiritual e também social (Gakkai, 2012). Diversas patologias abrangem, além do aspecto físico, o aspecto social. O diabetes e suas complicações trazem perda econômica substancial para os doentes e suas famílias, para os sistemas de saúde e para as economias nacionais, devido aos custos médicos diretos, à perda de trabalho e salários. Além desses aspectos, de acordo com o estatuto da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2014 era estimado que 422 milhões de adultos possuíam diabetes, comparado com 108 milhões em 1980. Esse aumento deve-se principalmente a fatores de risco associados com obesidade e sobrepeso. Dados da OMS demonstram que mais de 1 em 3 adultos acima de 18 anos tem sobrepeso e mais de 1 em 10 é obeso. Além disso, em 2012, o diabetes causou 3,7 milhões de mortes, sendo que 43% desse total ocorreu até a idade de 70 anos (World Health Organization, 2014).

Em 2014, dados reportados pela OMS demonstraram que a taxa de óbitos na população brasileira devido ao diabetes foi de 6%, sendo que a morte por doenças cardiovasculares está no topo da lista, com 31%. O Brasil tem índices mais altos que a Itália, com 4%, e mais altos também que os Estados Unidos, com 3% — em ambos os países, a mortalidade por doenças cardiovasculares também está em primeiro lugar. Contudo, a prevalência dessa patologia difere nos três países, sendo mais baixa no Brasil, com 8,1%, enquanto na Itália é de 8,5% e nos Estados Unidos é de cerca de 9,1% (OMS, 2016). Entre as grandes regiões do país, a maior prevalência de diabetes foi verificada na região Sudeste (7,1%) e a menor, na região Norte (4,3%) (Iser, 2015). Além disso, os impactos econômicos no Brasil com as internações desses pacientes foram de cerca de 65 milhões de reais em 2011, e a regra geral é: quanto mais o número desses pacientes aumentar, maiores serão os gastos em saúde também (RIBEIRO, 2012).

O **diabetes mellitus** (DM) é um grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina e ou na ação da insulina (American Diabetes Association, 2014). A patogênese dessa doença está relacionada a mudanças no metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos graxos que levam a alterações na sinalização do hormônio insulina. Essas alterações são decorrentes da destruição autoimune das células β pancreáticas com deficiência de insulina e também de uma falha na ação da insulina

decorrente da diminuição da sensibilidade à insulina (Gannon, 2001; American Diabetes Association, 2014).

De acordo com diferentes características, pode-se dividir o diabetes nos seguintes grupos. **Diabetes tipo 1** afeta entre 5-10% das pessoas com essa doença. Pode ser conhecida como diabetes insulino-dependente (Gannon, 2001) ou diabetes juvenil (American Diabetes, 2014). É resultado de uma destruição autoimune das células β do pâncreas. Diferentes tipos de autoanticorpos foram encontrados: para as células das ilhotas, insulina, descarboxilase do ácido glutâmico e para o insulinoma-2. Usualmente, um ou mais desses autoanticorpos estão presentes quando a hiperglicemia é detectada nesses pacientes. Essa destruição autoimune é variável, ocorrendo de forma rápida em alguns casos, como em crianças e jovens, e de forma lenta em adultos. Especificamente, alguns pacientes apresentam a cetoacidose como a primeira manifestação da doença. Outros casos apresentam uma modesta hiperglicemia de jejum que rapidamente evolui para uma hiperglicemia severa e associada ou não com a cetoacidose e na presença de algum outro fator desencadeante, como o estresse ou infecções. Em outros casos, a destruição das células β ocorre, mas permanece uma função residual decorrente de uma destruição incompleta dessas células, o que pode prevenir a cetoacidose por muito tempo, contudo eventualmente a pessoa irá desenvolver a dependência à insulina. Esses casos são mais frequentes em adultos do que em crianças (American Diabetes, 2014). Em alguns casos de DM tipo 1, não se sabe a etiologia, pois apresentam insulinopenia e cetoacidose, contudo não apresentam evidências de autoimunidade, nesses casos pode ser classificada como **diabetes idiopática**.

A forma mais predominante é o **diabetes mellitus tipo 2**, devido à sua prevalência em 90-95% dos casos. Também pode ser chamada de diabetes não insulinodependente (Gannon, 2001) ou diabetes do adulto (American Diabetes, 2014). Os pacientes apresentam resistência à insulina e possuem uma relativa deficiência de insulina. Os fatores que levam ao desenvolvimento do DM tipo 2 estão relacionados com a obesidade, a qual por si só pode levar à diminuição da sensibilidade à insulina (Roberts-Toler *et al.*, 2015). Esses pacientes parecem possuir os níveis de insulina normais ou elevados com o intuito de compensar a resistência à insulina. Contudo esta pode ser diminuída com a redução de peso ou tratamento farmacológico. Além disso, o risco de desenvolver diabetes tipo 2 aumenta com a idade e o sedentarismo (Mayor, 2015; Ligthart *et al.*, 2016).

Por muito tempo, o **diabetes mellitus gestacional** (DMG) era definido somente por uma intolerância à glicose durante a gravidez, independente de essa condição persistir ou não depois da gestação. Mulheres com diabetes no primeiro trimestre de gravidez seriam classificadas no

grupo do DM tipo 2. Mulheres grávidas com diagnóstico de diabetes no segundo ou terceiro trimestre de gravidez que não é, claramente, DM tipo 1 ou tipo 2 são classificadas como DM gestacional (American Diabetes, 2016). As características do DMG estão relacionadas com a diminuição da glicose plasmática e com a sensibilidade à insulina, além disso ocorre uma alteração na liberação de citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF-α), o qual pode contribuir para a resistência à insulina (Baz *et al.*, 2016).

Há também outros tipos específicos de diabetes: 1) defeito genético nas células β, que é caracterizado como um diabetes familiar com idade de diagnóstico precoce e transmissão autossômico-dominante (revelado pela presença de três gerações de mesma linhagem afetadas) associado a defeitos no âmbito da secreção de insulina, levando à definição como DM tipo *MODY* (Schober *et al.*, 2009); 2) defeitos genéticos na ação da insulina, que, alguns casos incomuns de diabetes, levam a alterações nos receptores de insulina, o que causa também uma resistência à insulina grave. Outros fatores que podem levar ao desenvolvimento do diabetes são: 3) doenças do pâncreas exócrino, tais como pancreatites, traumas, infecções e cânceres pancreáticos; 4) endocrinopatias, em que alguns hormônios antagonizam o efeito da insulina, então quando em excesso podem levar ao desenvolvimento do diabetes; 5) drogas, algumas das quais podem alterar direta ou indiretamente as ações da insulina, glicocorticoides, agonistas β-adrenérgicos e outros; 6) infecções por certos vírus, que têm sido associadas com a destruição das células β; e 7) outras síndromes, como algumas síndromes genéticas que são acompanhadas por hiperglicemia, a exemplo da síndrome de Down (American Diabetes, 2014). Dependendo do indivíduo e também do período em que a patologia foi diagnosticada, não há como ser classificada em um só grupo. Uma pessoa com diabetes gestacional pode não se recuperar da hiperglicemia e evoluir então para um quadro de diabetes tipo 2.

Normalmente, a sinalização da insulina é mediada pelo pâncreas, onde o transportador de glicose (GLUT) 2 medeia a entrada da glicose na célula. Após entrar na célula β, a glicose é fosforilada, pela hexocinase, à glicose-6-fosfato, que seguirá preferencialmente para a glicólise e produção de piruvato. Em seguida, segue para a produção de acetil-CoA e ciclo do ácido cítrico. Finalmente, leva à produção de ATP, o qual promove o fechamento dos canais de K^+ sensíveis a ATP. O efluxo reduzido de K^+ despolariza a membrana celular e os canais de cálcio voltagem-dependentes se abrem, aumentando nos níveis de cálcio citosólico, culminando com secreção dos grânulos de insulina por exocitose. A insulina liberada na corrente sanguínea atingirá diferentes tecidos, tais como tecido adiposo e muscular, onde irá ligar-se a seu receptor e levará à inserção do transportador de glicose dependente de insulina respectivo na membrana plasmática; então, a glicose pode ser captada nesses tecidos. No caso do diabetes, não há a

presença da insulina ou a insulina é resistente, assim os transportadores de glicose não se inserem na membrana plasmática e a glicose permanece na corrente sanguínea, caracterizando a hiperglicemia (Antonioli *et al.*, 2015).

Esse quadro pode ser mimetizado de forma satisfatória em modelos animais, onde pode se induzir uma hiperglicemia por diferentes formas: por manipulação genética, mudanças na dieta, cirurgicamente ou por manipulação química. Pode-se citar como exemplo de **seleção genética** a linhagem de camundongos do tipo NOD, os quais são importantes para se compreender a patogênese do DM tipo 1, devido ao fato de desenvolverem espontaneamente a patologia. Embora algumas características desenvolvidas possam ser diferentes das características humanas, estudos com esses animais são muito úteis para o desenvolvimento de formas de prevenção. Outro exemplo são os ratos *BB*, uma seleção de ratos Wistar que desenvolvem espontaneamente hiperglicemia. Contudo ambos são modelos para DM tipo 1. Para estudar o DM tipo 2, os ratos *Zucker fatty* apresentam mutação no receptor de leptina, promovendo a hiperfagia e obesidade em quatro semanas, o que leva tardiamente à resistência à insulina e também ao diabetes (King e Bowe, 2016). O diabetes tipo 2 também pode ser induzido através da **manipulação da dieta**, a qual é alterada para um maior consumo de carboidratos e/ou gordura para a promoção de ganho de peso, que está associada com a resistência à insulina e alteração no metabolismo da glicose e gorduras, podendo levar ou não ao desenvolvimento do DM tipo 2 (Srinivasan *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2016).

A estreptozotocina (STZ) (Schmatz, Mazzanti, *et al.*, 2009) ou o Aloxano (Lunkes *et al.*, 2004) são compostos químicos que também podem induzir modelos experimentais de diabetes através da **manipulação química**. Essas drogas são absorvidas pelo GLUT 2 do pâncreas por possuírem uma estrutura semelhante à glicose (Schnedl *et al.*, 1994). A STZ leva à depleção do ATP e também à produção de espécies reativas que contribuem para o dano no DNA. Ambas levam à morte das células β. Doses de 100-200 mg/kg em camundongos e de 50-60 mg/kg em ratos levam à hiperglicemia (Stefanello, Schmatz, *et al.*, 2014; Okizaki *et al.*, 2015). O diabetes pode ser estudado pela retirada parcial do pâncreas através da **manipulação cirúrgica**. Pode-se avaliar os efeitos da glicemia na redução da massa de células β, bem como avaliar a sua regeneração. Além disso, todos esses modelos podem ser aplicados de forma somatória, podendo-se associar, por exemplo, modelos de dieta com a administração de STZ, bem como a remoção do pâncreas associado ao uso da STZ. De certa forma, todos levam a um denominador comum, a hiperglicemia (Hardikar *et al.*, 1999; Srinivasan *et al.*, 2005).

A **hiperglicemia** pode ser diagnosticada através de alguns critérios preconizados pela Associação Americana de Diabetes (ADA – *American Diabetes Association*), que se baseia nos

níveis de glicose plasmática após oito horas de jejum ou através do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) realizado após duas horas da ingestão de 75 g de glicose. Ou ainda pode se associar outros critérios, como a hemoglobina glicosilada (HbA1C). Um quarto critério pode se basear nos sintomas clássicos da hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas associadas com uma glicose plasmática de ≥200 mg/dL (11,0 mmol/L). Os valores para diagnóstico de hiperglicemia podem ser definidos por 100-125 mg/dL (5,6-6,9mmol/L) para glicemia de jejum e 140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L) para o TOTG. Para os níveis de HbA1C, considera-se que indivíduos que apresentam entre 5,7-6,4% (39-46 mmol/L) apresentam maiores riscos para o desenvolvimento do diabetes (American Diabetes, 2016).

A hiperglicemia crônica é a maior causa de complicações no diabetes e é a responsável por levar à morte os pacientes. Embora o DM tipo 1 e tipo 2 tenham uma patogênese diferente, as complicações provenientes da hiperglicemia são semelhantes. As **complicações microvasculares** são a retinopatia, neuropatia e nefropatia (Sheetz e King, 2002). A hiperglicemia é responsável por muitas das mudanças na vasculatura da **retina**, incluindo prejuízo no fluxo sanguíneo, aumento da adesão de leucócitos e monócitos e obstrução de capilares, resultando em hipóxia localizada (Sheetz e King, 2002). As manifestações clínicas da **neuropatia** são dor, parestesia e perda sensorial, o que aumenta o risco de queimaduras, lesões e ulceração do pé. Estão relacionadas com espessamento da membrana, proliferação e hipertrofia das células endoteliais, além da tensão de oxigênio reduzida (Tesfaye e Selvarajah, 2012). A **nefropatia** é bem caracterizada, com o acúmulo de matriz extracelular que progride para hipertrofia e hiperfiltração e posterior inflamação do glomérulo. Por último, leva à apoptose das células. Três são as principais vias de indução da progressão da nefropatia: 1) ativação das vias de polióis e proteína cinase C, 2) formação de produtos finais de glicação avançada e 3) hipertensão intraglomerular (Wada e Makino, 2013).

As **complicações macrovasculares** estão relacionadas com doença vascular periférica, infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (Casella *et al.*, 2015). A hiperglicemia através dos produtos de glicação avançada (AGE) promove a ativação do fator nuclear-κB (NF-κB), que modula vários genes alvo pró-inflamatórios e pró-ateroscleróticos nas células do músculo liso vascular, células endoteliais e macrófagos (Casella *et al.*, 2015). O NF-κB estimula os monócitos a se infiltrarem no espaço subendotelial. Com a hiperglicemia, os macrófagos aderem-se e aumentam a expressão de genes pró-inflamatórios e moléculas de adesão endotelial, contribuindo para a iniciação da formação da placa aterosclerótica. Pode-se salientar que a hiperglicemia está relacionada com o aumento na atividade da NADPH oxidase, enzima geradora de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que leva a uma contribuição no

estresse oxidativo, também relacionado com a disfunção endotelial (Gray *et al.*, 2013). Além disso, os altos níveis de glicose e ERO levam à inibição da produção de óxido nítrico (NO), contribuindo ainda mais para a disfunção endotelial vascular (Sena *et al.*, 2013). Relacionado com as alterações macrovasculares, pode-se destacar também que o aumento da produção de ERO contribui para a modificação e oxidação do LDL (lipoproteínas de baixa densidade), as quais estão intimamente relacionadas com a progressão da placa aterosclerótica e, consequentemente, com alterações nos vasos (Barona *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia pode estar relacionada com as complicações do diabetes podem ser os seguintes: 1) via dos polióis, 2) formação de AGE, 3) EROs intermediárias e 4) proteína cinase C (Sheetz e King, 2002). A **via dos polióis** leva à produção de sorbitol e consumo de NADPH pela aldose redutase, que é ativada com o aumento da glicose plasmática. O sorbitol promove alterações osmóticas na célula e desenvolvimento da catarata, enquanto o sorbitol e o aumento de $NADP^+$ podem contribuir com lesões vasculares. Na via de **formação de AGE**, as proteínas são glicosiladas pela glicose, a chamada reação de Maillard. Essas proteínas têm um prejuízo em sua função. Tanto as proteínas intracelulares como as estruturais, como o colágeno, podem sofrer essa glicosilação (Genuth *et al.*, 2015). Além disso, os receptores para AGE (RAGE), quando ativados, podem promover a morte celular (Liu *et al.*, 2016). No metabolismo normal da glicose a ATP, ocorre a produção de espécies reativas na cadeia transportadora de elétrons (Nishikawa *et al.*, 2000). Além disso, a **autoxidação da glicose** também leva à produção de espécies reativas e à glicação de proteínas (Hunt *et al.*, 1988; Chetyrkin *et al.*, 2011). A **proteína cinase C (PKC)** é uma enzima sinalizadora intracelular muito importante, responsável pela regulação de muitos processos (Wu-Zhang e Newton, 2013). A ativação da PKC, juntamente com o aumento das espécies reativas sob condição de hiperglicemia estão relacionados com o desenvolvimento da nefropatia diabética (Zhu *et al.*, 2015). Em adição, a ativação da PKC leva a alterações na permeabilidade vascular, desregulação no NO, aumento da adesão de leucócitos e alteração no fluxo sanguíneo (Sheetz e King, 2002). Todas as alterações nessas vias contribuem para as complicações observadas no diabetes (Schulingkamp *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2010).

O **sistema nervoso central (SNC)** é bastante importante no controle da homeostase da glicose sobre várias condições fisiológicas, incluindo o estresse, refeições e variações circadianas (Arble e Sandoval, 2013). As alterações provocadas pela hiperglicemia no encéfalo podem ser chamadas de “encefalopatias diabéticas”, contudo essa denominação não é amplamente aceita pelos pesquisadores (Nelson *et al.*, 2009), pois, de acordo com Mijnhout e colaboradores (2006), não parecem combinar com os leves problemas cognitivos geralmente

vistos em pacientes diabéticos. Então, tem sido sugerido que o termo “declínio cognitivo associado ao diabetes” descreve um estado de ligeira a moderada disfunção cognitiva, em particular retardamento psicomotor e reduzida flexibilidade mental, que não são atribuíveis a outras causas (Mijnhout *et al.*, 2006; Zheng *et al*., 2016).

Além disso, alguns estudos têm apresentado que a hiperglicemia induz a declínio cognitivo resultante de anormalidades estruturais e funcionais no encéfalo (Biessels *et al.*, 2002; Coleman *et al.*, 2004; Trudeau *et al.*, 2004). Essas alterações poderiam estar relacionadas com defeitos na potenciação a longo prazo em fatias de hipocampo, o qual está intimamente relacionado com a capacidade do encéfalo em formar memória (Biessels *et al.*, 2002; Trudeau *et al.*, 2004). Também, a hiperglicemia pode levar ao aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que pode contribuir com a reatividade vascular e o envelhecimento acelerado da parede vascular (Coleman *et al.*, 2004).

A parede vascular e as células circulantes são bastante alteradas pela hiperglicemia. As **plaquetas** são fragmentos celulares derivados do megacariócito e possuem tempo de vida médio em torno de sete a dez dias na corrente sanguínea (Jurk e Kehrel, 2005; Kim *et al.*, 2013). Quando ativadas, liberam grânulos contendo em seu interior moléculas sinalizadoras que contribuem para a coagulação sanguínea, tais como ATP, ADP, tromboxanos, prostaglandinas, serotonina, glutamato e interleucinas (Shi e Morrell, 2011). As plaquetas de pacientes diabéticos são caracterizadas pela desregulação de várias vias de sinalização e tem sido sugerido que elas são hiper-reativas, mostrando aumento da adesão, ativação e agregação (Kim *et al.*, 2013). A hiper-reatividade das plaquetas não está totalmente elucidada, mas pode estar associada à redução na fluidez das membranas (Raffaelli *et al.*, 2015), alteração na homeostase dos íons cálcio e magnésio (Kim *et al.*, 2013), glicação de proteínas na superfície da membrana (Zhu *et al.*, 2012), aumento da adesão e ativação plaquetária, aumento do metabolismo do ácido araquidônico e síntese de tromboxanos (Tsikas *et al.*, 2015), como também com o aumento no volume das plaquetas (Gasparyan *et al.*, 2011) e níveis de radicais livres e diminuição nas defesas antioxidantes (Garcia-Souza e Oliveira, 2014; Raffaelli *et al.*, 2015). Dessa forma, o diabetes tem sido associado com o desenvolvimento de trombos e, consequentemente, com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Ruggeri, 2002; Kim *et al.*, 2013; Vazzana *et al.*, 2012).

Outros tecidos bastante prejudicados pela hiperglicemia são **o fígado e o rim**. O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de carboidratos e pela produção de corpos cetônicos. O rim também contribui com o fígado nessa função, embora de forma mais modesta (Triplitt, 2012). Em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, a liberação de glicose renal e de

glicose hepática são aumentadas como resultado do aumento da gliconeogênese (Wilding, 2014). Além disso, as mudanças metabólicas levam a um aumento na β-oxidação e desacoplamento mitocondrial, contribuindo para a produção de radicais livres e diminuição na defesa antioxidante, o que contribui com o dano oxidativo às membranas, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (Meng *et al.*, 2013).

As células endócrinas nas **ilhotas de Langerhans** constituem apenas 3-5% da massa de tecido do pâncreas. Elas estão dispersas por todo o órgão e compreendem as células α, β, δ e PP, que secretam hormônios glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídio pancreático, respectivamente. As células endócrinas são reguladas pelos nervos parassimpático e simpático, hormônios autócrinos e mediadores parácrinos, bem como nutrientes como glicose (Bertelli *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Bouwens e Pipeleers, 1998).

As concentrações de glicose têm efeitos diversos nas **células β** responsáveis pela produção de insulina. Chang-Chen e colaboradores (2008) demonstraram que moderadas concentrações de glicose possuem um efeito proliferativo e disfunção no volume nas células β, contudo, com uma exposição prolongada a altas concentrações de glicose (como ocorre na hiperglicemia não tratada), essas células são levadas a apoptose, a qual é ativada por genes relacionados ao controle da apoptose e a sinais extra e intracelulares, como os níveis de ATP (Chang-Chen *et al.*, 2008). Os mecanismos propostos pelos quais a glicotoxicidade exerce seu efeito apoptótico estão relacionados com a produção de ERO (Pi *et al.*, 2010), estresse não oxidativo no retículo endoplasmático (RE) (Marchetti *et al.*, 2007) e aumento em níveis de cálcio intracelular (Gilon *et al.*, 2014). Primeiramente, as células apresentariam um metabolismo aumentado, levando à disfunção mitocondrial e **produção de ERO**. Como o pâncreas apresenta um sistema de defesa antioxidante reduzido, os danos pelas EROs podem ser mais notáveis. A produção dessas espécies leva à ativação da via do fator NF-kB e da via c-Jun N-terminal cinase (JNK) (Kaneto *et al.*, 2002). O **estresse do RE** tem sido postulado como resultado do aumento da demanda biossintética induzida por hiperglicemia crônica (Cnop *et al.*, 2005; Chang-Chen *et al.*, 2008). Alterações também foram encontradas nos **níveis intracelulares de cálcio**, os quais podem estar relacionados a diferentes vias de sinalização, principalmente a receptores ionotrópicos que aumentam a concentração desse íon após serem estimulados (Petit *et al.*, 2009). Além disso, os altos níveis de cálcio podem estar relacionados a aumento na expressão de proteínas como NALP3 e interleucina 1β, as quais participam na indução da apoptose (Grant e Dixit, 2013).

Alguns receptores estão envolvidos na sinalização dessas proteínas. O receptor **$P2X_7$** está bastante envolvido na sinalização dessas duas moléculas. Esse receptor pertence à família

P2X de canais triméricos de cátions ligante-dependentes, dos quais existem sete membros distintos ($P2X_{1-7}$). A ativação desse receptor por ATP leva à passagem de íons pela abertura do canal; entre esses íons, o Ca^{2+}, Na^{+} e K^{+}. O $P2X_7$ está presente em diferentes tecidos e é responsável também por diferentes situações, tais como câncer, inflamação e doenças cardiovasculares (Bartlett *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado que, em modelos de diabetes, esse receptor tem sua expressão aumentada com o progresso e desenvolvimento dessa patologia (Coutinho-Silva *et al.*, 2003; Coutinho-Silva *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2016).

O $P2X_7$, quando se liga ao seu agonista ATP em altas concentrações, pode formar poros na membrana e ser responsável pela liberação de **interleucinas**, promover a ativação do inflamassoma nos macrófagos e células endoteliais e liberar, subsequentemente, citocinas, como a interleucina-1β, através de um processo dependente de caspase-1 (Glas *et al.*, 2009). Citocinas são glicoproteínas que podem atuar como mediadoras intercelulares de muitos processos biológicos, entre eles a inflamação e ativação da resposta imune celular e humoral. Estudos têm demonstrado que a interleucina-1β (IL-1β) pode estar relacionada com a apoptose das células β induzidas pela glicose e que a secreção dessa citocina ocorre na própria célula β (Maedler *et al.*, 2002).

O **inflamassoma** é um dos receptores de reconhecimento-padrão cuja ativação se relaciona diretamente com a maturidade e a secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. Um número crescente de estudos descobriu que o inflamassoma tem uma relação estreita com a patogênese de várias doenças, incluindo a aterosclerose, diabetes e gota. No entanto, a ativação do inflamassoma e dos seus mecanismos reguladores específicos não é totalmente conhecida (Wang *et al.*, 2015). NLRP3 é um componente do inflamassoma caracterizado por ser um membro da família NLR (*NOD-like receptor*), expresso no citosol, apresentando sensibilidade a uma grande variedade de sinais, incluindo o ácido úrico e ATP importantes na geração de uma resposta inflamatória (Martinon *et al.*, 2009; Kono *et al.*, 2010). NLRP3 é conhecido por ser necessário para a ativação do inflamassoma pelo ATP. Importante destacar que essa resposta é mediada através da membrana plasmática via ativação do receptor $P2X_7$. A ativação do inflamassoma pelo ATP resulta na clivagem pró-IL-1 para IL-1β, através da caspase-1 e da liberação da IL-1β a partir da célula (Weber *et al.*, 2010). Assim, essa IL e outras moléculas sinalizadoras, tais como o interferon-γ (IFN- γ), contribuem para a progressão do diabetes por induzir a morte das células-β (Grant e Dixit, 2013; Prause *et al.*, 2015).

Além desse receptor, muitas outras moléculas e proteínas fazem parte do **sistema purinérgico** onde o $P2X_7$ está inserido. O sistema purinérgico é composto por moléculas sinalizadoras, que são os nucleotídeos e nucleosídeos; os receptores purinérgicos, que são os

P1 e os P2, além das enzimas que promovem a degradação ou síntese daquelas moléculas sinalizadoras (Burnstock, 2006). A **adenosina trifosfato** (ATP) é a molécula mais conhecida entre os bioquímicos, devido à sua importância como moeda energética fundamental para o metabolismo celular, contudo esse nucleotídeo é considerado uma molécula sinalizadora intra e extracelular, atuando inclusive como neurotransmissora (Burnstock, 2006). Além do ATP, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e a adenosina (ADO) são produtos da hidrólise do ATP e também atuam como sinalizadores, principalmente o ADP como agente pró-agregante nas plaquetas (Born, 1962) e a ADO nos outros tecidos (Dunwiddie e Masino, 2001).

As purinas (ATP, ADP e adenosina) e as pirimidinas (UDP e UTP) são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam muitos efeitos biológicos através dos receptores purinérgicos (Ralevic e Burnstock, 1998). O ATP, ADP, UTP e UDP se ligam aos receptores P2, enquanto a adenosina se liga a receptores P1. Os **receptores P2** são subdivididos na família P2X e P2Y (Burnstock, 2013). Os receptores P2Y são metabotrópicos acoplados à proteína G e os oito subtipos podem ser dividido em dois grupos, dependendo do tipo de proteína G acoplada: $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ são acopladas à proteína G_q e ativam a proteína fosfolipase C_β, enquanto $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ e $P2Y_{14}$ acoplam-se a G_i para inibir adenilato ciclase. $P2Y_{11}$ é peculiar porque é acoplado a G_q e G_s e, assim, provoca um aumento nos níveis intracelulares de AMPc e Ca^{2+} (Di Virgilio, 2012; Burnstock e Novak, 2013). Os P2X são receptores ionotrópicos ligados a canais na membrana plasmática. Há sete subtipos de receptores P2X diferentes ($P2X_{1-7}$) para formar receptores triméricos (Di Virgilio, 2012). O domínio extracelular desses receptores contém sítios de ligação para ATP, antagonistas competitivos e íons metálicos moduladores. Já os domínios transmembrana formam um canal de cátions não seletivo. As propriedades de abertura dos canais iônicos variam muito com o subtipo do receptor: com os receptores homoméricos $P2X_2$, $P2X_4$ e $P2X_7$ apresentam uma dessensibilização lenta e $P2X_1$ e $P2X_3$ exibem dessensibilizarão rápida (Hattori e Gouaux, 2012).

Os **receptores P1** que têm a adenosina como agonista são divididos em quatro subtipos, A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3, e são todos acoplados à proteína G. O receptor A_1 medeia respostas de sinalização, que pode ser causada por seu acoplamento a diferentes proteínas dentro da família $G_{i/o}$. A via conhecida de atuação desse receptor é através da inibição da adenilato ciclase, que causa uma diminuição no AMPc. Outro mecanismo de atuação do A_1 é através da ativação da fosfolipase C (PLC), que promove o metabolismo do fosfotidilinositol de membrana, o que produz o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG), os quais levam ao aumento do

cálcio citosólico. Por sua vez, os receptores A_{2A} são acoplados à proteína G_s, ou seja, ativam a adenilato ciclase, e o receptor A_{2B} está acoplado a diferentes vias de sinalização, incluindo a ativação da guanilato ciclase, através do acoplamento a G_q mediado pela PLC e aumento na $[Ca^{2+}]_i$ dependente do IP3. Já os receptores A_3 estão acoplados à proteína G_i e também, numa menor extensão, à proteína G_q (Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock, 2013).

Tanto os receptores P1 quanto P2 estão localizados em muitos tecidos, principalmente pâncreas, sistema vascular, sistema nervoso central e também fígado e rim (Coutinho-Silva *et al.*, 2003; Burnstock *et al.*, 2014; Delekate *et al.*, 2014; Hechler e Gachet, 2015). No SNC, está descrita a presença desses receptores em muitas estruturas, sendo associada também com o desenvolvimento de diversas patologias, como doença de Alzheimer (Delekate *et al.*, 2014; Gold e El Khoury, 2015), enquanto esses receptores, principalmente os P2Y, estão relacionados com a função plaquetária e a promoção de trombos (Hechler e Gachet, 2015). As plaquetas são conhecidas por expressar $P2X_1R$, $P2Y_1R$, e $P2Y_{12}R$, onde predomina a sinalização por ADP através da ativação do $P2Y_1$ e $P2Y_{12}R$, que é crítica para iniciação da agregação plaquetária (Eltzschig *et al.*, 2013; Schmatz *et al.*, 2013; Idzko *et al.*, 2014). Os receptores $P2X_7$ e o $P2X_4$, por exemplo, estão presentes no rim e sua expressão pode ser aumentada em patologias envolvendo processos inflamatórios nesse tecido (Solini *et al.*, 2015). No fígado, o sistema purinérgico está envolvido na regulação fisiológica e também tem papel nos processos patológicos das doenças hepáticas. Os purinoreceptores estão envolvidos com a secreção biliar, metabolismo do glicogênio e lipídico. A ativação dos receptores de $P2Y_1$ em hepatócitos humanos e roedores estimula a enzima glicogênio fosforilase (Burnstock *et al.*, 2014). No pâncreas, os receptores purinérgicos são muito importantes, pois o ATP, através dos receptores $P2Y_1$, está relacionado com a liberação de insulina. Nas ilhotas pancreáticas, o $P2X_4$ está expresso nas células β e δ (Burnstock e Novak, 2013). Já nas células α, são expressos os receptores $P2X_7$ que migram para o centro da ilhota à medida que as células β são destruídas em modelos animais de diabetes (Coutinho-Silva *et al.*, 2007).

O terceiro componente do sistema purinérgico são as enzimas da cascata purinérgica. As ectonucleotidases são divididas em quatro famílias de genes, que englobam ectonucleotídeo pirofosfato/fosfodiesterases (ENPPs), fosfatase alcalina, ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (ENTPDases) e 5’-nucleotidase. As ENPPs atuam na hidrólise de nucleotídeos trifosfatados (ATP e UTP), em nucleotídeos monofosfatados (AMP e UMP) e pirofosfato. São encontradas sete enzimas na família das ENPPs, a ENPP1 apresenta relação com mineração óssea e calcificação tecidual e tem sido descrita por atuar na resistência à insulina de pacientes diabéticos (Mackenzie *et al.*, 2012; Yegutkin, 2014). As fosfatases alcalinas possuem ampla

especificidade de substrato para diferentes fosfatomonoésteres e outros compostos contendo fosfato, incluindo os nucleotídeos de adenina, polifosfatos inorgânicos e pirofosfato (Zimmermann *et al.*, 2012; Yegutkin, 2014). Três isoenzimas são tecido-específicos e apresentam 90-98% de homologia, que são as fosfatases alcalinas do intestino, a placentária e aquelas das células germinativas AP. A última isoenzima, a fosfatase alcalina não tecidual (TNAP), é aproximadamente 50% idêntica às outras e é expressa principalmente nos ossos, fígado e rim (Yegutkin, 2014).

A **ENTPDase** comumente hidrolisa nucleotídeos di e trifosfatados em mononucleotídeos e fosfato inorgânico. Para sua máxima atividade, requer Ca^{2+} e Mg^{2+} como cofatores. Oito genes diferentes codificam membros da família da ENTPDase e diferem quanto à especificidade ao substrato, distribuição tecidual e localização celular (Zimmermann *et al.*, 2012). Quatro delas (NTPDase1, 2, 3 e 8) estão presentes na superfície extracelular das membranas. NTPDases 5 e 6 exibem localização citoplasmática, enquanto NTPDases 4 e 7 são inteiramente localizadas intracelularmente, de frente para o lúmen de organelas citoplasmáticas (Yegutkin, 2014). Membros da família da NTPDase ligados à membrana são altamente glicosilados de massas moleculares de aproximadamente 70-80 kDa e apresentam homologia de sequência em regiões especiais chamadas “regiões conservadas da apirase”, as quais são importantes para a atividade catalítica da enzima (Zimmermann *et al.*, 2012; Yegutkin, 2014). Consistem de dois domínios transmembranas próximos ao grupamento amino e carboxiterminal e ainda podem existir quer na forma monomérica, quer na forma homo-oligomérica. Possuem seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Zimmermann *et al.*, 2012).

Quanto à **atividade catalítica**, as diferentes isoenzimas têm afinidades diferentes pelos substratos. NTPDase1 e 2 têm preferência por hidrolisar nucleotídeos de adenina, em detrimento dos nucleotídeos de uracila e todas as NTPDases cujo sítio catalítico está voltado para o meio extracelular, que hidrolisam mais rapidamente o ATP que o ADP. A NTPDase1 é a enzima que tem mais afinidade pelo ATP, contudo hidrolisa o produto ADP para AMP na mesma proporção (Heine *et al.*, 1999). A NTPDase2 tem uma grande preferência pela hidrólise de ATP. As NTPDase3 e 8 hidrolisam ATP e UTP de forma similar (Knowles e Li, 2006). As enzimas intracelulares diferem na preferência de substrato. NTPDase4, 5 e 6 hidrolisam preferencialmente NTP e NDP, mas em menor proporção o ATP e o ADP. NTPDase5 e 6 preferem hidrolisar NTP, mas não ADP, enquanto a NTPDase7 hidrolisa preferencialmente UTP, CTP e GTP, mas tem uma afinidade muito baixa por ATP (Wang e Guidotti, 1998; Zimmermann *et al.*, 2012).

A família das **NTPDases** também difere entre si na sua localização tecidual. A NTPDase1 está localizada principalmente nas células de resposta imune, por exemplo, linfócitos, monócitos, células endoteliais dos vasos sanguíneos e SNC (Robson *et al.*, 2005; Dwyer *et al.*, 2007; Langer *et al.*, 2008). A NTPDase2 também é expressa nos vasos sanguíneos e nas células progenitoras neuronais (Robson *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2012). Ambas as NTPDases1 e 2 são expressas nas células acinares do pâncreas. Em subconjuntos de neurônios, em células epiteliais de tecidos incluindo rim, vias aéreas e nos sistemas digestivo e reprodutivo, é encontrada a NTPDase3 (Lavoie *et al.*, 2011; Burnstock e Novak, 2013). A NTPDase8 tem uma expressão mais restrita, sendo encontrada no fígado, rim e intestino (Bigonnesse *et al.*, 2004; Fausther *et al.*, 2007). Em relação à localização das isoenzimas intracelulares, elas apresentam uma expressão mais ampla, devido a seu controle de nucleotídeos no interior da célula (Biederbick *et al.*, 2000; Robson *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2012). Seguramente, as oito isoenzimas podem ser encontradas não somente nos tecidos destacados. Por exemplo, no SNC, pode-se encontrar diferentes isoenzimas nos neurônios, astrócitos e micróglia (Zimmermann, 2006). Ainda, essa variação pode mudar de acordo com a estrutura analisada (Langer *et al.*, 2008).

A NTPDase pode ser coexpressa com outra enzima que continua com a cascata de hidrólise dos nucleotídeos, **a ecto-5'-nucleotidase** (eN - CD73, E.C.3.1.3.5). A eN é uma enzima ancorada à membrana plasmática por uma molécula de glicofosfatidil inositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, mas também pode ser encontrada na forma solúvel (Zimmermann *et al.*, 2012). A eN de mamíferos consiste de duas subunidades glicoproteicas unidas por ligações não covalentes. O zinco e outros íons metálicos bivalentes ligam-se à extremidade do domínio N-terminal. Essa ectoenzima pertence a uma grande superfamília de metalofosfoesterases que age em diferentes substratos, tais como fosfoproteínas de Serina/Treonina, vários nucleotídeos e também esfingomielina (Strater, 2006; Yegutkin, 2008). A eN é expressa em muitos tecidos, sendo mais abundante no cólon, rim e cérebro, menos abundante em fígado, pulmão e coração (Colgan *et al.*, 2006). No sistema vascular, a eN é bastante expressa no endotélio dos vasos de grande calibre, como a aorta, e também nas plaquetas. Contudo, nas células do sistema imune, está presente em algumas subpopulações de células (Yegutkin, 2008). Além disso, no SNC, essa enzima pode ser encontrada em diferentes estruturas, incluindo córtex cerebral, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatório, entre outros (Langer *et al.*, 2008).

Além disso, eN hidrolisa ribo e desoxiribonucleotídeos 5'-monofosfatos em seus respectivos nucleosídeos. Dentre esses nucleotídeos, a função de destaque da eN é a hidrólise

do AMP à **adenosina** (ADO), pois, de acordo com Dunwiddie e Masino (2001), é considerada um terceiro “mensageiro purinérgico”. Esse nucleosídeo regula muitos processos fisiológicos, particularmente aqueles relacionados com tecidos envolvidos com mensageiros excitatórios, como o coração e o cérebro, os quais atuam reduzindo a atividade excitatória nesses tecidos (Dunwiddie e Masino, 2001). Os efeitos decorrentes da ADO estão relacionados com transporte de fluidos, tolerância induzida à isquemia e reperfusão no sistema cardiovascular, imunidade e inflamação (Zimmermann *et al.*, 2012).

Os receptores de ADO estão amplamente distribuídos em tecidos metabolicamente ativos, tais como pâncreas, fígado e tecido adiposo, além de estarem presentes em células do sistema imune, indicando um importante papel na regulação desses tecidos. No pâncreas, a ADO está relacionada com o metabolismo da glicose (Koupenova e Ravid, 2013), bem como com a secreção da insulina, e ainda controla a regeneração e proliferação das células β. O receptor A_1 inibe a liberação de insulina e o A_{2A} tem um efeito oposto, estimulando a secreção de insulina, enquanto o A_{2B} não tem efeito descrito na estimulação desse hormônio. Além disso, a ADO está envolvida no desenvolvimento do DM tipo 1, devido à sua interação com as células imunes e as células β, onde o $A_{2A}R$ inibe a secreção de IL-2 e IFN-γ pelas células T $CD4^+$ e células T *helper* e ainda suprime os linfócitos T $CD8^+$ (Antonioli *et al.*, 2015). Em adição, camundongos *knockout* para CD39 tratados com STZ desenvolvem diabetes mais rapidamente que camundongos *wild-type* e, ainda, a *upregulation* da CD39 tem efeito protetor na indução do diabetes. Isso poderia contribuir com o aumento na produção de ADO e estimulação dos seus receptores (Chia *et al.*, 2013). Além disso, a sinalização da insulina e a consequente resistência a esse hormônio no DM tipo 2 podem ser inibidas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias liberadas por infiltrados de macrófagos e outras células imunes no fígado, músculo, pâncreas e tecido adiposo. Os receptores de ADO também estão relacionados com efeitos antagônicos nesses tecidos. O A_1R inibe a lipólise e o $A_{2B}R$ diminui o processo inflamatório nos adipócitos, enquanto que, nos hepatócitos, esses receptores estão relacionados com a gliconeogênese e glicogenólise. No músculo, podem estimular ou diminuir a captação de glicose. De forma geral, a ADO e seus receptores contribuem para a diminuição da resistência à insulina (Antonioli *et al.*, 2015).

O **encéfalo** expressa altas concentrações de receptores de ADO, os quais estão envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a regulação do sono, excitação, neuroproteção e epilepsia (Dunwiddie e Masino, 2001). No diabetes, Duarte e colegas (2006) têm descrito uma diminuição da regulação dos receptores A_1, enquanto há um aumento da

regulação dos receptores A_{2A} em hipocampo, os quais podem contribuir com a neuroproteção promovida pela adenosina (Duarte *et al.*, 2006).

Outra forma de regular os níveis desse nucleosídeo é pela ação da enzima **adenosina desaminase** (ADA), que catalisa a desaminação irreversível da ADO e 2'-desoxiadenosina em inosina e 2'-desoxi-inosina, respectivamente. Sendo amplamente expressa no intestino, timo, baço e outros tecidos linfoides e não linfoides, também está envolvido na neurotransmissão (Moriwaki *et al.*, 1999). Curiosamente, fígado, monócitos/macrófagos e soro também contêm outra isoenzima, ADA2, que pode ser ativa em sítios de inflamação durante a hipóxia e em áreas de crescimento do tumor (Zavialov e Engstrom, 2005; Yegutkin, 2008). Estudo com pacientes com DM tipo 2 não obesos tem demonstrado que a atividade ou expressão dessa enzima se encontra aumentada, o que contribui com a diminuição dos níveis de ADO (Kurtul *et al.*, 2004; Khemka *et al.*, 2013). Além disso, o aumento da expressão da ADA promove a ativação das células dendríticas através da diminuição da ADO, levando à desregulação das células T autoimunes e à autodestruição das células β pancreáticas (Antonioli *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que os nucleotídeos, principalmente o ATP, podem estar relacionados com a morte celular por indução de estresse oxidativo (Cheng *et al.*, 1996). Esse processo está ligado principalmente ao **oxigênio molecular** (O_2) e às espécies reativas dele. O O_2 é essencial para os organismos aeróbicos, porém tem um número par de elétrons, sendo os dois últimos como elétrons desemparelhados, e pode receber elétrons, levando à produção de outras moléculas que são mais reativas que o O_2. A adição de elétrons consecutivos gera o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO•) (Imlay, 2013). Devido ao O_2 apresentar um potencial de redução do primeiro elétron ligeiramente negativo, apenas algumas moléculas – os centros metálicos, flavinas e quinonas da cadeia respiratória – favorecem a geração das espécies reativas. Apesar de somente 0,1-1% dos elétrons poderem chegar até o O_2, a taxa de formação de H_2O_2 é de 10-15 μM/s e de 5 μM/s para o $O_2^{\bullet-}$ (Imlay e Fridovich, 1991).

H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ atuam na **oxidação de proteínas**, sendo que o $O_2^{\bullet-}$ é o mais potente dos dois e pode reagir com virtualmente todas as moléculas orgânicas. H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ atacam o núcleo das proteínas ferro-enxofre ou aquelas que possuem somente o ferro como núcleo metálico e realizam a reação de Fenton (Imlay, 2013). Como produto dessa reação, ocorre a produção de HO•, que reage diretamente com as bases púricas e pirimídicas do DNA, oxidando-as (Halliwell, 2012). Esse radical também reage com as ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados ou com o colesterol ou ainda os fosfolipídios da bicamada lipídica da membrana plasmática, o que eventualmente pode levar à perda da integridade da membrana através da

modificação de sua fluidez e, finalmente, desencadear a inativação de proteínas ligadas à membrana (Ayala *et al.*, 2014).

As principais fontes de $O_2^{\bullet-}$ incluem nicotinamida dinucleotídeo (NADPH) oxidase, xantina oxidase, ciclo-oxigenases (COX), mitocôndrias e, sob certas condições, NO sintase endotelial (NOS). Essa enzima produz NO, uma simples molécula com grande poder na vasodilatação. Mas o NO pode reagir com oxigênio molecular e/ou ERO principalmente com $O_2^{\bullet-}$, produzindo o peroxinitrito: $ONOO^-$. Este último em si é fortemente oxidante e, quando protonado, sofre cisão homolítica para produzir •OH e dióxido de azoto (NO_2•). Um aumento na produção de ERO e/ou nitrogênio (ERN) pode exceder a capacidade de reparação da célula e levá-la à apoptose ou à necrose, inclusive pode ocorrer dano tecidual e desencadeamento de processos patológicos (Rochette *et al.*, 2014).

Essa capacidade de **reparação** contra as espécies reativas pode se dar de diferentes formas: 1) mecanismos de prevenção, 2) sistema de defesa antioxidante e 3) mecanismos de reparação. A primeira linha de defesa é a prevenção, que é realizada por proteína contendo íons metálicos que quelam esses radicais quando formados. Outra forma de prevenção é a produção de pigmentos na pele contra a radiação ionizante (Sies, 1993). O segundo passo é a desativação dessas moléculas. Normalmente, a célula tem outras moléculas que inativam essas espécies que são mais deletérias em produtos mais estáveis. Essas moléculas protetoras são o sistema de defesa antioxidante. O último mecanismo é o de reparação, o qual está relacionado com o reparo das alterações provocadas por oxidantes no DNA (Sies, 1993; Halliwell, 2012).

Normalmente, há um balanço entre o sistema de defesa e a geração de espécies reativas; quando acontece um desequilíbrio nesse sistema, instala-se o quadro de **estresse oxidativo** (Halliwell, 2007; Rochette *et al.*, 2014). O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático. O **não enzimático** é composto por moléculas sem atividade catalítica que rompem o ciclo de danos dos radicais livres por doar elétrons, produzindo moléculas mais estáveis. São exemplos: o α-tocoferol ou vitamina E, o ácido ascórbico ou vitamina C, tióis como a glutationa (GSH), ácido úrico, bilirrubina e proteínas plasmáticas. Além disso, a dieta fornece muitas moléculas que podem atuar como antioxidantes não enzimáticos, tais como β-caroteno, licopeno, ácidos fenólicos e flavonoides (Valko *et al.*, 2007). O **enzimático** é composto por três principais enzimas, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) (Sies, 1993).

A família das **SODs** são metaloenzimas que catalisam a conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2. Em mamíferos, essa família é composta por SOD1, ou CuZn-SOD, primeira enzima a ser caracterizada, sendo um homodímero de cobre e zinco que se encontra quase exclusivamente

em espaços citoplasmáticos intracelulares e amplamente expresso nos diferentes tipos celulares. A SOD2, ou Mn-SOD, existe como um tetrâmero, estando presente quase que exclusivamente nas mitocôndrias, e é induzida por uma ampla classe de moléculas, inclusive citocinas como IL-1,4,6 e TNF-α. SOD3, ou EC-SOD, é a mais recentemente caracterizada, existe como um tetrâmero de cobre e zinco, sintetizada para os espaços extracelulares e encontrada em poucos tecidos (Zelko *et al.*, 2002).

A **CAT** é um homotetrâmero em que cada subunidade contém um grupo prostético heme no sítio ativo, ferroprotoporfirina IX, que está localizado internamente e é acessível por uma passagem que se estreita para pequenos substratos, de forma que é conhecida pela sua capacidade para degradar o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Kirkman e Gaetani, 2007). Essa enzima se encontra principalmente nos peroxissomos e no citosol da célula, sendo expressa em muitos tecidos, incluindo fígado, rim, coração e, em menores quantidades, no encéfalo (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003).

A **GPx** é o nome geral de uma família de isoenzimas que pode remover o H_2O_2 através da conversão da glutationa reduzida (como doadora de elétrons) em glutationa oxidada, como na reação seguinte: $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$. Existem quatro principais GPx dependentes de selênio: (a) GPx clássica (GPx1), que é encontrada em glóbulos vermelhos, fígado, pulmão e rim; (b) GPx gastrointestinal (GPx2); (c) GPx no plasma (GPx3), que está presente em diferentes órgãos, tais como rim, pulmão, placenta, coração e músculo; e (d) GPx fosfolípidica (GPx4), que também está amplamente distribuída nos tecidos (Margis *et al.*, 2008). As isoenzimas também são encontradas em todos os compartimentos celulares, bem como a GSH, que é a molécula antioxidante mais abundante encontrada no citosol, núcleo e mitocôndria. A GSH tem alguns papéis na defesa da célula, está relacionada com a atuação como cofator de outras enzimas, como a GPx, detoxifica espécies reativas diretamente e regenera outros antioxidantes, como as vitaminas C e E (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2007).

Ambas as **vitaminas** são encontradas em uma grande variedade de produtos e também atuam impedindo que as espécies reativas ataquem proteínas, lipídios e o DNA (Byers e Perry, 1992). A **vitamina C** é um nutriente cujo papel na formação de colágeno é bem conhecido. Além disso, é o mais abundante antioxidante hidrossolúvel no corpo (Grosso *et al.*, 2013) e parece ter efeitos benéficos sobre a regulação da função imune (Wintergerst *et al.*, 2007). A **vitamina E** é um composto lipossolúvel e está relacionada a muitas funções fisiológicas, incluindo alterar as funções imunes (Wintergerst *et al.*, 2007), podendo proteger contra o câncer

e a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados na bicamada lipídica das membranas (Byers e Perry, 1992; Yang *et al.*, 2012).

A **aminolevulinato desidratase** (δ-ALA-D), embora não atue na defesa antioxidante, é amplamente distribuída e catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico (ALA) para formar o porfibilinogênio (PBG). Essa enzima apresenta em seu sítio ativo resíduos do aminoácido cisteína, cujos grupos SH podem ser eficientemente oxidados por metais ou radicais livres. Dessa forma, a δ-ALA-D é um enzima que apresenta um bom índice de avaliação para o estresse oxidativo (Rocha *et al.*, 2012). Quando há espécies reativas, pode ocorrer a inibição dessa enzima, levando a um prejuízo na biossíntese do heme, importante na síntese da hemoglobina. Além disso, pode ocorrer o acúmulo do substrato ALA, o qual, por sua vez, apresenta efeitos tóxicos principalmente ao SNC (Emanuelli *et al.*, 2003).

O **estresse oxidativo** é o denominador comum para as principais vias envolvidas no desenvolvimento e progressão do diabetes, principalmente nas complicações dessa doença. Os mecanismos implicados no aumento da geração de ROS incluem: NAD(P)H-oxidases, auto-oxidação de glicose, AGE, defeitos na via do poliol, NOS e desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial através da fosforilação oxidativa. Quantidades excessivas de ERO e ERN modulam a ativação da PKC, proteína-cinases ativadas por mitogênio, diversas citocinas e fatores de transcrição, tais como FOXO, Nrf2, AP-1, NF-kB, PPARs e Bach 1. Esses controlam a expressão de genes de proteção que reparam o DNA danificado e o sistema imune, detêm a proliferação de células danificadas e induzem a apoptose. O NF-κB, está envolvido em respostas inflamatórias, e AP-1 é importante para o crescimento e diferenciação celular (Sun e Oberley, 1996; Valko *et al.*, 2007; Rochette *et al.*, 2014).

Muitos estudos têm associado as alterações no **fígado e rim** com o estresse oxidativo proveniente da hiperglicemia (Schmatz *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Palma *et al.*, 2014). Os resultados normalmente estão relacionados com uma diminuição no sistema de defesa enzimático e não enzimático, como, por exemplo, na atividade da SOD, CAT e nos níveis de vitamina C, vitamina E e, obviamente, um aumento nas espécies reativas (Rosca *et al.*, 2012; Schmatz *et al.*, 2012). Quanto à expressão dessas enzimas, há evidências que demonstram uma diminuição na expressão SOD, CAT e da GPx e um aumento em TNF-α, Il-6 e NF-κB em ratos diabéticos, o que pode contribuir para alterações histopatológicas observadas no fígado desses animais, incluindo necrose celular (Chatuphonprasert *et al.*, 2013; Jangale *et al.*, 2013).

Pesquisadores têm procurado **formas naturais** de diminuir ou proteger as células contra os danos oxidativos ou até mesmo contra os danos em sistemas mais complexos, como o sistema purinérgico. Alguns grupos de pesquisa têm encontrado alterações em ambos os parâmetros em

muitas patologias humanas (Spanevello *et al.*, 2010; Zanini *et al.*, 2012; Zanini *et al.*, 2014) e também em modelos animais (Spanevello *et al.*, 2009; Gutierres *et al.*, 2012; Stefanello, Schmatz, *et al.*, 2014). Na tentativa de encontrar formas de proteger ou reverter essas alterações, busca-se na natureza a resposta para restaurar a homeostase à célula, através da inserção de compostos naturais na dieta ou da administração desses compostos por suplementação. Nesse contexto, estudos demonstraram que o resveratrol, composto encontrado na uva e derivados, e também o ácido clorogênico, encontrado no café, podem ter um importante papel protetor no DM (Schmatz *et al.*, 2013; Stefanello, Schmatz, *et al.*, 2014). Ademais, as antocianinas podem proteger contra alterações provocadas pela doença de Alzheimer (Gutierres *et al.*, 2014). Dessa forma, compostos naturais podem ter grande contribuição para a proteção contra os eventuais danos produzidos por doenças.

Nas plantas, esses compostos são sintetizados a partir do **metabolismo secundário**. Porém, todos descendem de um metabólito comum: a glicose. Posteriormente, progridem para dois intermediários principais, o ácido chiquímico e a acetil-CoA. O ácido chiquímico é uma molécula com anel aromático, então é precursor da maioria dos aminoácidos e compostos aromáticos, gerando a classe dos taninos e alcaloides. Ambos os intermediários podem se condensar para formar as antraquininas, flavonoides e taninos condensados. Os derivados do acetato são alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos, óleos voláteis, saponinas, heterosídeos cardiotônicos, ácidos graxos e terpenos. Todos essas classes de compostos fazem parte do metabolismo secundário, antes considerados produtos de excreção pela célula vegetal. Contudo, sabe-se hoje que essas moléculas têm importantes funções biológicas nas plantas, incluindo a defesa contra herbívoros e micro-organismos, a proteção contra raios UV e a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Simões *et al.*, 2007).

Os **compostos fenólicos** apresentam uma grande diversidade na sua estrutura, no entanto apresentam pelo menos um anel aromático. A classificação dos ácidos fenólicos se dá de acordo com a presença do anel benzênico e o número de carbonos na cadeia lateral, levando a diferentes classes de compostos fenólicos. A classe dos ácidos fenólicos apresenta o anel benzoico mais um átomo de carbono na cadeia lateral, fazendo parte dessa classe o ácido gálico. A classe dos derivados do ácido cinâmico apresenta o anel benzênico mais três átomos de carbono na cadeia lateral, sendo representantes dessa classe o ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e o ácido sinápico. O ácido cafeico ainda leva à formação de outros compostos que estão na classe dos ésteres e heterosídeos de ácido fenólico e do ácido cinâmico. O primeiro membro dessa classe foi o ácido clorogênico (3-O-cafeoilquínico ou éster do ácido 3,4-di-hidroxi-cinâmico), obtido dos grãos de café em 1846 (Simões *et al.*, 2007).

A família dos **ácidos clorogênicos** (ACGs) é um grupo de ésteres naturais de ácido quínico e ácidos trans-cinâmicos, tais como ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, encontrados em muitas plantas. O componente mais abundante é o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ), o qual é responsável por cerca de 50% do total de ácidos clorogênicos. Os ACGs podem ser subdivididos pela identidade, número e posição dos resíduos acila: 1) monoésteres, incluindo ácidos cafeoilquínico, p-coumaroilquiníco e feruloilquínico; 2) diésteres, triésteres e tetraésteres, incluindo diACQ, triACQ e tetraACQ; 3) diésteres de ácido cafeico e ferúlico, os cafeoilferuloilquínico, e diéster do ácido cafeico e sinápico, cafeoilsinapoilquínico; 4) ésteres envolvendo várias permutações entre um e três resíduos de ácido cafeico com um ou dois resíduos de um ácido alifático dibásico (por exemplo, glutárico, oxálico e sucínico) (Clifford, 1999).

É descrito que o **ACG** tem inúmeros efeitos biológicos, incluindo a melhoria do aprendizado e da memória de ratos através de testes comportamentais (Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2014), além da inibição da atividade das enzimas butirilcolinesterase e acetilcolinesterase em cérebro de ratos, as quais estão relacionadas com a doença de Alzheimer (Oboh *et al.*, 2013). Ademais, o ACG pode atenuar a morte celular induzida pelo glutamato em cultura de células neuronais através do bloqueio do influxo de cálcio para o citosol, podendo estar relacionado com os receptores NMDA (Mikami e Yamazawa, 2015). Além dos efeitos no SNC, o ACG pode inibir a formação de produtos de glicação enzimática através de seu efeito antioxidante e antiglicativo. Estudos mostram que o ACG provoca a formação de moléculas (produtos de interação proteína-ACG) com capacidade antioxidante, ou seja, a interação do ACG com cadeias laterais de resíduos de aminoácidos reduz a formação de compostos potencialmente prejudiciais e promove a geração de estruturas antioxidantes (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2015; Fernandez-Gomez *et al.*, 2015). Ainda, o ACG pode se posicionar de forma conveniente nas membranas biológicas, alterando minimamente sua organização, de forma a exercer efeitos protetores, contra a oxidação de membranas (Oboh *et al.*, 2013; Stefanello, Schmatz, *et al.*, 2014; Bonarska-Kujawa *et al.*, 2015).

Além de sua atuação como *scavenger* de radicais livres, o ACG pode mediar resposta via NF-κB e ainda através das vias de sinalização JAK/STAT, atuando na resposta inflamatória (Lou *et al.*, 2015), incluindo a diminuição de polimorfonucleares em locais de processos inflamatórios (Zhang *et al.*, 2010). Ademais, Fuentes e colaboradores (2014) demonstraram que o ACG inibe a ativação plaquetária pela via do receptor A_{2A}/adenilato ciclase/AMPc/ativação PKA, onde a ativação do receptor A_{2A} levaria a um aumento dos níveis de AMPc, um inibidor da agregação. Estudos com modelagem molecular revelaram que o ACG estabelece ligação de

hidrogênio e interações hidrofóbicas com os aminoácidos que normalmente participam nas interações com ligantes do $A_{2A}R$, tais como a adenosina (Fuentes *et al.*, 2014). Em adição, Fuentes e coautores (2014) demonstraram que *in vivo* o ACG também reduz o tamanho do trombo em camundongos, os quais corroboram outros dados da literatura que mostram que o ACG reduz a agregação plaquetária em ratos diabéticos ou que a fração rica em ACG do café também apresenta esse efeito benéfico (Verzelloni, 2011).

Os efeitos do **ACG no diabetes** estão sendo estudados e descritos. Stefanello e colaboradores (2013) demonstraram que esse composto pode proteger os neurônios do córtex cerebral dos danos ocasionados pela hiperglicemia, bem como proteger das alterações nos déficits de memória e aprendizado em ratos diabéticos (Stefanello, Schmatz, *et al.*, 2014). Além disso, o ACG pode inibir enzimas da digestão de carboidratos como a α-amilase e α-glicosidase, as quais contribuiriam com a diminuição da glicose livre no sangue (Oboh *et al.*, 2015). Esse ácido fenólico está relacionado com a melhoria do metabolismo de lipídios através da redução do peso corporal, massa de gordura visceral, bem como redução da leptina e insulina plasmáticas (Cho *et al.*, 2010). Finalizando, esses dados juntos podem contribuir para o efeito benéfico do ACG nas complicações oriundas da hiperglicemia (Karthikesan *et al.*, 2010).

Uma vez demonstrados os efeitos biológicos do ACG, espera-se que ele seja absorvido e metabolizado de forma eficiente pelos sistemas biológicos. De fato, os compostos fenólicos são conhecidos por serem absorvidos no intestino delgado e também no grosso (Crozier *et al.*, 2009). Depois da ingestão de café, por exemplo, ácido feruloilquínico intacto, bem como lactonas sulfatadas, 5-ACQ e ferúlico sulfatado e ácido cafeico alcançam as concentrações plasmáticas máximas (Cmax) entre 0,5-1,0 h depois da ingestão. Além disso, com o aumento da ingestão de ACG, foi observada uma correlação positiva com o aumento dos seguintes metabólitos: o AFQs e ACQL-S (Cafeoilquinico-lactona-sulfato) no plasma e na urina. Níveis urinários de ácido ferúlico-4'-O-sulfato e ácido isoferúlico-3'-O-glucuronídeo também aumentaram significativamente com o aumento da ingestão de ácido clorogênico (Stalmach *et al.*, 2014). Como observado por Stalmach et al. (2009), a maior parte dos compostos derivados do ACG foram rapidamente removidos do sistema circulatório, com tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) de 0,3-1,9 h (Stalmach *et al.*, 2009).

Os ensaios para avaliação da **biodisponibilidade do ACG** são realizados principalmente com a ingestão de café, como descrito anteriormente. O café é uma das bebidas em que se pode encontrar os níveis mais altos de ACG. Estima-se que, numa xícara de café entre 23-70 mL, encontram-se em média 51-322 mg de cafeína, enquanto que 24-422 mg correspondem ao ACG. Um dos fatores detrminantes para a concentração desse ácido no grão

de café é o tempo de torrefação (Crozier *et al.*, 2012). De fato, esse processo afeta uma porção do ACG nos grãos verdes, os quais serão destruídos, e alguns se transformam em outros derivados, principalmente lactonas (Farah, 2006). O café também apresenta como componente a trigonelina, uma betaína N-metilada do ácido nicotínico, que está presente nos grãos verdes em cerca de 1% e que, durante a torrefação, é parcialmente convertida em ácido nicotínico (niacina) (Allred *et al.*, 2009). Ainda, os terpenos cafestol, o kahweol e 16-O-metilcafestol ocorrem como ésteres de ácidos graxos e são formados quando o café é preparado por ebulição estendida e a bebida não é filtrada através de um papel ou de um leito de pó de café (Ludwig, Clifford, *et al.*, 2014). O café torrado é valorizado pelo seu aroma único e muito atraente. O complexo odor contém muitas substâncias, dentre as quais alguns heterociclos que não são encontrados em qualquer grau na dieta (Yang *et al.*, 2016). Contudo, quanto mais verde for o grão de café, maior a concentração de compostos fenólicos e mais efeitos protetores apresentará.

De fato, o **café** apresenta efeitos complexos na saúde humana, principalmente devido à quantidade da sua ingestão e também pela concentração de cafeína, um dos maiores responsáveis pela ingestão dessa bebida. Seus efeitos negativos podem também estar associados com outros hábitos sociais não saudáveis, como o fumo. Enquanto a maioria dos estudos epidemiológicos publicados no período de 1980 a 2000 relataram que o consumo de café pode estar associado com maior risco de doença cardíaca coronariana e vários tipos de câncer, algumas investigações mais recentes têm associado o consumo dessa bebida com um menor risco de várias doenças crônicas, incluindo diabetes tipo 2, doença cardiovascular e câncer, bem como doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson (Ludwig, Clifford *et al.*, 2014). Os terpenos citados anteriormente são descritos como responsáveis pelo aumento reversível de LDL em algumas populações (Correa *et al.*, 2013). Contudo, estão relacionados com o aumento da expressão de enzimas detoxificantes de fase II, do sistema de defesa antioxidante e na regulação do fator Nrf2, o qual atua no desenvolvimento do câncer (Butt e Sultan, 2011). A trigonelina também poderia inibir o fator Nrf2 e diminuir a progressão do câncer. Alguns efeitos dela estão relacionados com a sua atuação como um fitoestrógeno e com a capacidade de regulação de câncer de mama (Ludwig, Clifford, *et al.*, 2014).

Em relação ao diabetes, um estudo de coorte na Holanda relatou um menor risco relativo de desenvolver DM tipo 2 em 50% daqueles que consumiam pelo menos sete xícaras de café por dia, em comparação com aqueles que bebiam dois copos ou menos. Outro estudo demonstrou que homens que bebiam pelo menos seis xícaras de café por dia tiveram um risco relativo 54% menor de desenvolvimento do DM tipo 2 do que os homens que não bebiam,

enquanto as mulheres que bebiam ≤ 6 xícaras diárias de café tiveram menor risco, de 29%, em relação aos que não consumiam (Van Dam, 2008; Ludwig, Clifford *et al.*, 2014).

Outro composto biologicamente ativo do café é a **cafeína**, uma metilxantina derivada de bases púricas. Nas plantas, as metilxantinas são sintetizadas a partir de um intermediário comum, a xantosina, que é o substrato inicial da síntese de purinas alcaloides. São fontes de xantosina: biossíntese de purinas *do novo*, as vias de degradação de nucleotídeos de adenina (via AMP) e os nucleotídeos de guanina (percursor GMP), e a via da S-adenosil-metionina. Nas plantas, a cafeína é produzida em tecidos jovens e se acumula com o tempo (Ashihara *et al.*, 2008). Sua função está relacionada com a defesa contra herbívoros e patógenos, incluindo fungos. Além disso, a cafeína em revestimentos de sementes e folhas em queda é liberada no solo para inibir a germinação de sementes em torno das plantas-mãe, atuando como uma molécula alelopática (Anaya *et al.*, 2006).

A noz de cola (*Cola acuminate*), semente do cacau (*Theobroma cacao*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), bagas de guaraná (*Paullinia cupana*), folhas de chá (*Camelia siniensis*) e grãos de café torrado (*Coffea arabica* e *Coffea robusta*) são as principais fontes dietéticas de cafeína (Barone e Roberts, 1996). Em relação ao café, as concentrações de cafeína são muito variáveis entre os cafés consumidos, sendo influenciadas pelo processamento antes e depois da preparação da bebida. Cafés instantâneos apresentam uma concentração menor tanto de cafeína como de ACG quando comparados com o café expresso, por exemplo. Além disso, o café do tipo *Coffea arabica* tem concentrações mais altas de cafeína que a espécie *Coffea robusta* (Ludwig, Mena *et al.*, 2014). O processo de torrefação parece não influenciar a concentração de cafeína, de acordo com dados de Ludwing e coautores (2014), pois as concentrações não variaram nos três níveis de torrefação quando a temperatura utilizada estava abaixo de 270°C. Mas, de um modo geral, níveis de cafeína típicos em uma xícara de café variam entre 50-100 mg (Ludwig, Clifford *et al.*, 2014).

Uma vez ingerida, a **cafeína** é rapidamente absorvida pelo estômago e intestino delgado, atingindo a corrente sanguínea e chegando ao fígado, onde é metabolizada. Quanto maiores as concentrações de cafeína ingeridas, maior é o T ½ vida. A Cmax é atingida dentro de 60 min após a ingestão, e o aparente tempo de meia vida da cafeína é de cerca de 5 h. O metabolismo dessa substância ocorre principalmente no fígado, pela isoforma CYP1A1 do citocromo P450. O primeiro passo do metabolismo é a desmetilação da cafeína, que conduz às três dimetilxantinas: paraxantina (1,7-dimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina). Esses metabólitos são em seguida desmetilados novamente para os monometilxantinas correspondentes, antes de serem oxidados para o ácido úrico metílico e

outros produtos, para serem excretados. Antes da metabolização e excreção, a cafeína atinge todos os tecidos do corpo, onde pode exercer seus efeitos (Heckman *et al.*, 2010).

Os **efeitos biológicos da cafeína** em humanos estão associados à capacidade dessa molécula de atuar como um antagonista dos receptores de adenosina, bem como inibir a enzima fosfodiesterase, alterando os níveis de AMPc. Contudo, para os efeitos na inibição dessa enzima são necessárias doses mais elevadas de cafeína (Lorist e Tops, 2003). Nos seres humanos, o receptor A_3 é bloqueado pela cafeína em concentrações em torno de 80 μM. Portanto, esse receptor não é o melhor alvo para as ações da cafeína. O receptor A_{2B} tem demonstrado requerer concentrações mais elevadas da adenosina para a ativação. Assim, a inibição das ações da adenosina neste receptor é pouco provável para proporcionar uma explicação para as ações de cafeína sob condições fisiológicas. Sob condições fisiopatológicas, no entanto, os receptores A_{2B} são suscetíveis à ativação por adenosina endógena e/ou cafeína. Embora esses dois receptores sejam importantes, os efeitos predominantes da cafeína estão relacionados com a ação dessa xantina nos receptores A_1 e A_{2A}. Enquanto o A_1R está acoplado a uma proteína G inibitória, o $A_{2A}R$ está acoplado a uma proteína G estimulatória, o que leva a apresentarem efeitos opostos quando estimulados (Fredholm *et al.*, 1999; Ludwig, Clifford, *et al.*, 2014).

Os **efeitos da cafeína** nos receptores de adenosina, A_1 e A_{2A} principalmente no SNC estão relacionados com maior percepção, maior capacidade de permanecer acordado por períodos mais longos e redução da fadiga. Estão também relacionados com o aumento da consolidação e retenção da memória, o qual é importante para patologias que envolvam déficits cognitivos. Essa metilxantina atua melhorando o sistema dopaminérgico pelo bloqueio dos receptores A_{2A} e estimula a liberação de dopamina, devido à presença desse receptor nos neurônios dopaminérgicos. A presença do A_1R medeia a inibição da liberação pré-sináptica de neurotransmissores nos neurônios (Lorist e Tops, 2003; Heckman *et al.*, 2010). A cafeína em excesso pode resultar em um estado de excitação e ansiedade, incluindo reações adversas, como taquicardia, dor de cabeça, palpitações, insônia, agitação, nervosismo e tremores. Esses efeitos são determinados pela sensibilidade de cada indivíduo ao consumo desse composto, a qual está associada à suscetibilidade genética. Além disso, pessoas que ingerem muito café e/ou cafeína de outras fontes desenvolvem uma certa tolerância ao seu consumo (Ludwig, Clifford *et al.*, 2014).

Além dos efeitos no **SNC**, a cafeína também desempenha ações no metabolismo periférico, atuando no aumento da taxa metabólica, gasto energético e oxidação lipídica e apresentando ação termogênica, por isso auxilia na perda de peso e redução do risco global para o desenvolvimento de síndrome metabólica (Rudelle *et al.*, 2007; Heckman *et al.*, 2010).

Evidências têm apresentado-a como uma molécula com propriedades antioxidantes, incluindo diminuição da peroxidação lipídica nas membranas, aumento da concentração da GSH e aumento da atividade da SOD (Abreu *et al.*, 2011). Em adição, a cafeína reduz a agregação plaquetária através da *upregulation* dos receptores A_{2A} e também pode atuar no aumento das concentrações de adenosina plasmática. Existem relatos mostrando que, na isquemia, as concentrações de adenosina são muito altas e que a cafeína contribuiria com a *upregulation* dos receptores A_{2A}, sendo importante para a redução da agregação plaquetária (Varani *et al.*, 2000). Ainda, Choi (2003) demonstrou que a cafeína altera a agregação plaquetária induzida por ADP e também afeta a segunda onda de liberação de ADP na agregação (Choi, 2003; Zhou e Schmaier, 2005). Então, a cafeína e, consequentemente, o café podem trazer benefícios para problemas cardiovasculares e também para as complicações características de pacientes diabéticos.

2.1 Justificativa

DM é uma disfunção metabólica que vem crescendo em todo o mundo, sendo considerada um problema de saúde pública. No Brasil, o índice de mortalidade por diabetes atinge 6% do total de mortes, contudo esse índice atribuído pela hiperglicemia chega a ser maior que 50% em relação àqueles já diagnosticados com diabetes. Esses dados resultam em alto custo para os sistemas de saúde públicos, os quais chegaram a USD 548.000 milhões daqueles destinados às despesas em saúde (11% do total gasto em todo o mundo) em 2013. Em adição, os tratamentos atuais envolvendo agentes hipoglicemiantes também causam problemas aos pacientes, devido à redução dos níveis glicêmicos de forma drástica ou abaixo dos níveis normais. O cérebro é profundamente afetado por essas oscilações, sendo bastante prejudicado. Dessa forma, pesquisas que visam buscar compostos naturais que possam auxiliar na prevenção e na melhoria do quadro clínico desses pacientes com redução dos efeitos adversos precisam ser estimuladas.

O ácido clorogênico é um composto natural presente na dieta humana, podendo atuar como uma molécula anti-inflamatória, antioxidante e hipoglicêmica, casos em que poderia ser útil no tratamento dessa doença. O café, por sua vez, também apresenta efeitos relacionados com aqueles relatados sobre o ácido clorogênico, pois em sua composição apresenta altas concentrações desse composto. Contudo, além desse ácido fenólico, o café também é conhecido como fonte de cafeína, uma molécula estimulante do SNC através da sua atuação nos receptores

de adenosina. Como o consumo de café e, consequentemente, de cafeína é bastante amplo, torna-se de suma importância o conhecimento do efeito do seu consumo no diabetes.

Estudos no laboratório desta pesquisa têm afirmado que, no diabetes, há alterações em componentes do sistema purinérgico em plaquetas, linfócitos e no SNC. Dessa forma, o objetivo deste estudo é elucidar os efeitos do consumo de ácido clorogênico, cafeína e café no desenvolvimento dessa doença, sendo, então, a hipótese deste estudo o efeito na reversão de alterações no sistema purinérgico e antioxidante pelo ACG, cafeína e café em diferentes tecidos de ratos diabéticos induzidos por STZ.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito protetor do tratamento com ácido clorogênico, cafeína e café sobre alterações oxidativas e sistema purinérgico após indução experimental de diabetes através da administração de STZ em diferentes tecidos de ratos.

3.2 Objetivos específicos

1) Avaliar alterações promovidas pela hiperglicemia no sistema purinérgico no córtex cerebral de ratos diabéticos submetidos ao tratamento com ácido clorogênico, cafeína e café.
2) Investigar o efeito do ácido clorogênico, cafeína e café em alterações promovidas pela hiperglicemia no sistema purinérgico de plaquetas de ratos diabéticos.
3) Analisar a agregação plaquetária de ratos submetidos a indução de diabetes por STZ e tratados com ácido clorogênico, cafeína e café.
4) Investigar o efeito do ácido clorogênico, cafeína e café em parâmetros antioxidantes em fígado e rim de ratos controles e diabéticos induzidos por STZ.

4. RESULTADOS

Os resultados da presente tese estão organizados em um artigo publicado, um artigo aceito para publicação, um manuscrito e no apêndice com resultados preliminares referentes ao Doutoramento Sanduíche PDSE-Capes, devidamente apresentados nas páginas que seguem.

4.1. Artigo 1: Aceito para publicação

Título:

“Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system of STZ-induced diabetic rats”

Dados sobre o Periódico:

The Journal of Nutritional Biochemistry

ISSN: 0955-2863

Fator de impacto: 4.668

Qualis CAPES: A2

Endereço eletrônico: http://www.journals.elsevier.com/the-journal-of-nutritional-biochemistry

Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system of STZ-induced diabetic rats

Naiara Stefanello[1], Roberta Schmatz[1], Luciane Belmonte Pereira[1], Andréia Machado Cardoso[1], Sabina Passamonti[2], Rosélia Maria Spanevello[3], Gustavo Thomé[1], Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira[4], Luiza Wilges Kist[4], Maurício Reis Bogo[4], Vera Maria Morsch[1], Maria Rosa Chitolina Schetinger[1*]

[1] Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, University Campus, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

[2] Department of Life Sciences, University of Trieste, via L. Giorgieri 1, 34127, Trieste, Italy.

[3] Center for Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas, Capão do Leão Campus, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

[4] Laboratory of Genomics and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding authors. Address correspondence and reprint requests to:

Naiara Stefanello (naiabioquimica@gmail.com)

Maria Rosa Chitolina Schetinger (mariachitolina@gmail.com)

Tel: + 55-55-3220-9557

Fax: + 55-55-3220-8978

Abstract

We evaluated the effect of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) on components of the purinergic system from the cerebral cortex and platelets of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Animals were divided into eight groups, control animals treated with: I – water (WT); II – CGA (5 mg/kg); III – CA (15 mg/kg); IV– CF (0.5 g/kg); and diabetic animals treated with: V – WT; VI – CGA (5 mg/kg); VII – CA (15 mg/kg); VIII – CF (0.5 g/kg). Our results showed an increase (173%) in AMP hydrolysis in the cerebral cortex of diabetic rats. In addition, CF treatment increased ADP and AMP hydrolysis in group VIII synaptosomes. Platelets showed an increase in ectonucleotidase activity in group V and all treatments reduced the increase in ATP and ADP hydrolysis. Furthermore, there was an increase in platelet aggregation of 72% in the diabetic rats, and CGA and CF treatment reduced platelet aggregation by nearly 60% when compared to diabetic rats. In this context, we can suggest that CGA and CF treatment should be considered a therapeutic and scientific target to be investigated in diseases associated with hyperglycemia.

Keywords: Caffeine; chlorogenic acid; coffee; diabetes mellitus; purinergic system.

1. Introduction

Data demonstrate that in 2012, around 1.5 million deaths were directly caused by diabetes mellitus (DM). In 2014, the global prevalence of diabetes was estimated to be 9% among adults more than 18 years old. The World Health Organization (WHO) predicts that diabetes will be the seventh leading cause of death in 2030[1]. DM is a condition characterized by hyperglycemia resulting from the body's inability to use blood glucose adequately. In Type 1 diabetes, the pancreas does not release enough insulin and therefore intake of blood glucose into cells can not be stimulated. Type 2 diabetes is characterized by decreased pancreatic synthesis and release of insulin combined with insulin resistance[2].

Chronic hyperglycemia increases the frequency of non-enzymatic glucose adduction with proteins, lipids and DNA to form advanced glycation end products (AGEs), which alter the structure and function of involved proteins. AGEs have been associated with chronic complications of DM, and ageing-related diseases, such as nephropathy, chronic renal insufficiency, Alzheimer's disease, neuropathy and cataracts[3].

Adenine nucleotides and nucleosides have well-known cell signaling functions. ATP, ADP and adenosine have important actuation in neurotransmission[4] and neuroprotection in the central nervous system (CNS)[5], as well as acting in vascular tone and thromboregulation[6, 7]. The regulation of those simple molecules can be important for the prevention of pathology related to platelets and neurons[8, 9].

Enzymes that degrade adenine nucleotides NTPDases and 5'- nucleotidases, regulate the molecules' concentration. Robson and collaborators show that NTPDases have acute effects on cellular metabolism, adhesion, activation and migration, inclusive of cellular proliferation, differentiation and apoptosis[10]. 5'-nucleotidase functions are related to inactivation and catabolism of ATP and adenosine formation[11].

These enzymes can be altered in hypertension, hypercholesterolemia and cancer[12], as well as in hyperglycemia conditions[13]. Research with diabetes has demonstrated that these enzymes are found in increased levels in diabetic patients and experimental diabetes models[9, 13, 14]. On the other hand, fruit and vegetables rich in polyphenols provide vascular protection, which may be useful in the prevention and progression of the pathologies cited above. Furthermore, red wine, grape juice and some of their polyphenols have been shown to prevent these alterations[15].

Studies have shown that consumption of coffee has been associated with a lower risk of development of DM. This beneficial effect of coffee on diabetic status has been attributed mainly to the properties of caffeine and chlorogenic acid[16]. Chlorogenic acid is a polyphenol

present in many plants[17]. Studies have established that chlorogenic acid has a range of properties such as antioxidant[18], anti-inflammatory[19], neuroprotective[20] and hypoglycemic[21]. On the other hand, caffeine is a methylxanthine, nonselective antagonist of adenosine receptors (A1 and A2A) and its effects have been related to glucose metabolism through alteration of glucose uptake, modulating glycogen metabolism and reduction of carbohydrate storage[22].

Our research group has demonstrated that coffee extracts and coffee compounds (chlorogenic acid and caffeine) protected the CNS from hyperglycemia-induced alterations[23]. In addition, platelets can suffer an increase in reactivity due to high glucose levels, and natural compounds such as caffeic acid reduce platelet activity[24]. Although studies with the cerebral cortex and platelets are described, research involving these compounds and ectonucleotidases in both tissues has not been described. In line with these findings, we investigated whether chlorogenic acid, caffeine and coffee could protect the alterations of key enzymes that regulate purinergic neurotransmission in the brain, and platelet aggregation of STZ-induced diabetes.

2. Experimental Procedure

Chemicals

ATP, ADP, AMP, adenosine, Percoll, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane) GR, Coomassie brilliant blue G, HEPES, streptozotocin (SID 24899428), chlorogenic acid (CID 1794427) and caffeine (CID 2519) (approximately 99% purity) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity. Coffee used in the experiment was soluble, lyophilized and 100% from Coffee arabica species, analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) by Passamonti and colleagues (Department of Life Sciences, University of Trieste, Italy). The dose of caffeine was found to be 30 mg of caffeine per gram of coffee, and we chose 15 mg/kg, a dose corresponding to an intake of approximately three cups of coffee in humans[25]. The chosen dose of chlorogenic acid was determined in accordance with literature data[26].

Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days old; 220–300 g) from the Central Animal House of the University Federal of Santa Maria (UFSM) were used in this research. Animals were maintained at (23 ± 1 °C) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All

animal procedures were approved by the UFSM Animal Ethics Committee (protocol under number: 23/2011).

Experimental induction of diabetes

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ) diluted in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5)[27]. Control rats received the vehicle (sodium citrate buffer). To avoid hypoglycemic shock, treated rats received 5% glucose for 24 h after STZ induction. After 7 days, a small amount of blood was taken from the tail vein to determine glucose levels, which were measured with a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO, USA). Rats with glycemia over 250 mg/dl were chosen to study. Subsequently, the measurement of blood glucose and treatment of animals with the compounds was begun.

Treatment with chlorogenic acid, caffeine and coffee

Rats were divided into eight groups (n = 10), control animals treated with: I – water (WT); II – chlorogenic acid (CGA 5 mg/kg); III – caffeine (CA 15 mg/kg); IV – coffee (CF 0.5 g/kg); and diabetic animals treated with: V – water (WT); VI – chlorogenic acid (CGA 5 mg/kg); VII – caffeine (CA 15 mg/kg); VIII – coffee (CF 0.5 g/kg). Rats in control groups received water. Chlorogenic acid and caffeine were freshly prepared in water. Coffee was solubilized in hot water. The solutions were administered via gavage, once a day for 30 days.

Preparation of samples and enzyme assays

Serum

Total blood was collected and centrifuged at 1800 g for 15 min, the precipitate was discarded and the serum was used to determine fructosamine and glucose levels.

Fructosamine and glucose levels

The glucose and fructosamine levels were determined using commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Glucose oxidase (GOD) catalyzes the oxidation of glucose to gluconic acid and hydrogen peroxide. Through an oxidative coupling reaction catalyzed by peroxidase (POD), the hydrogen peroxide formed reacts with 4-aminoantipyrine and phenol to form a red-colored complex (quinone imine); the absorbance was measured at 505 nm and is directly proportional to the glucose concentration in the sample.

Glucose binds to amino groups of proteins forming a Schiff base, which after a molecular rearrangement becomes a stable ketamine called fructosamine. In alkaline pH, fructosamine is converted to its enol form, which reduces nitrotetrazolium blue to a purple compound. The difference in absorbance after 15 min is proportional to the concentration of fructosamine in the sample.

Brain tissue preparation

The cerebral cortex was collected for nucleotide quantification, NTPDase1, 2 and 3 and 5'-nucleotidase expression in the cerebral cortex. NTPDase and 5'-nucleotidase activity were analyzed in the synaptosomes of the cerebral cortex.

Nucleotide quantification

The denaturation of sample proteins was performed using 0.6 mol/l perchloric acid. All samples were then centrifuged (14000×g for 10 min) and the supernatants were neutralized with 4.0 N KOH and clarified with a second centrifugation (14000×g for 15 min)[28]. HPLC was performed with Shimadzu (Kyoto, Japan) equipment composed of a model LC-20AT reciprocating pump, a model DGU-20A5 degasser, a model SPD-M20A diode array detector (DAD), an auto-sampler (SIL-20A) and a model CBM-20A integrator, operated by LC Solution 1.22 SP1 software. Purines in the samples (ATP, ADP, AMP and adenosine) were identified by their retention time and DAD spectrum (in the range 200–400 nm), and quantified by comparison of the peak area with standards. The results are expressed as pmol of the different compounds per g of tissue.

Synaptosome preparation

Firstly, the brain was dissected into cerebral cortex, which was homogenized in Medium I buffer pH 7.5. The synaptosomes from the cerebral cortex were prepared as described[29] using a discontinuous Percoll gradient. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 4 °C throughout the procedure and used for enzymatic assays.

Determination of ectonucleotidase activity

The activity of NTPDase and 5'-nucleotidase in synaptosomes from the cerebral cortex was determined in accordance with a previous report[30] and 5'-nucleotidase was determined by a previously reported method[31]. The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by

the method previously described[32]. All samples were carried out in triplicate and enzyme activity was reported as nmol Pi released/min/mg protein.

Enzyme gene expression

Total RNA was isolated with TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) in accordance with manufacturer's instructions. Total RNA was quantified by spectrophotometry, and cDNA was synthesized with an ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 μg of total RNA. Quantitative PCR was performed using SYBR® Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis. Reactions were done in a volume of 25 μl using 12.5 μl of diluted cDNA (1:50 for Hprt1, Rlp13A, entpd1, entpd2 and cd73), containing a final concentration of 0.5 M betaine (Sigma-Aldrich), 0.2 □ SYBR® Green I (Invitrogen), 100 μM dNTP, 1 □ PCR buffer, 3 mM MgCl2, 0.25 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM each of reverse and forward primers (Table 1). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step of 5 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72 °C for elongation. At the end of the cycling protocol, a melting-curve analysis was included and fluorescence measured from 60 to 99 °C. Relative expression levels were determined with 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 11.0 Software (http://LinRegPCR.nl) and the stability of the references genes, Hprt1 and Rlp13A (M-value) and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (V) were analyzed by GeNorm 3.5 Software (http://medgen.ugent.be/genorm/). Relative RNA expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Platelet preparation

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes et al. (2004)[33] with the following minor modifications. Total blood was collected by cardiac puncture with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant. The blood-citrate system was centrifuged at 1000 rpm for 15 min to produce PRP (used for platelet aggregation). PRP was centrifuged at 3500 rpm for 25 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM KCl and 5.5 mM glucose. The platelet pellets were suspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activity.

Platelet aggregation

PRP described above was used for aggregation tests. The platelet aggregation profile was evaluated by measuring turbidity with a Chrono-log optical aggregometer (AGGRO/LINK® Model 810-CA software for Windows v.5.1) using 5 and 10 μmol/l of ADP as agonist[34]. The results were shown as percentage aggregation.

NTPDase and 5′-nucleotidase activity determination

The NTPDase and 5′-nucleotidase enzymatic assay was carried out as previously described[33]. Released Pi was assayed by a method using malachite green as the colorimetric reagent and KH2PO4 as standard[32]. All samples were run in triplicate. Enzyme-specific activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

In vitro tests

To evaluate the effect of chlorogenic acid, caffeine and chlorogenic acid plus caffeine in nucleotide hydrolysis in synaptosomes and platelets, in vitro experiments were performed using different concentrations of chlorogenic acid, caffeine and chlorogenic acid plus caffeine (at 25, 50, 100, 150 and 200 μM) based on Schmatz et al. (2013)[15]. The chlorogenic acid was diluted in 25% ethanol and caffeine was diluted in water. They were incubated in the presence of ATP, ADP and AMP as substrates with the incubation medium as described above.

Protein determination

Protein content was determined colorimetrically, using bovine serum albumin as standard[35].

Statistical analysis

For the in vivo results, two-way ANOVA statistical analysis was used to assess the interaction between the factors of the test and, it is represented as follows: two way ANOVA statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment (CGA, CA or CF) interaction for random variable [F(DFn,DFd) = value; P = value]. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test was used to assess statistical differences between groups tested. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in both analyses used. For in vitro results, one-way ANOVA was used, followed by Bonferroni post-test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in both analyses used. All data were expressed as mean ± SEM.

3. Results

Firstly, we determined the glucose blood levels 7 days after STZ administration. The rats with fasting glucose ≥ 250 mg/dL were separated to start the treatment (data not shown). After 30 days of treatment, the blood was collected, the serum was separated and the plasmatic glucose was determined. In Table 2, the glucose blood levels after 30 days of study is showed. The glucose levels in the diabetic group were significantly increased when compared to the control group. The treatment with chlorogenic acid (5 mg/kg), caffeine (15 mg/kg) and coffee (0.5 g/kg) showed no effect on decreasing the increased glucose levels.

We analyzed the fructosamine levels since it is used for estimating the degree of protein glycation in diabetes. Results of the fructosamine levels are presented in Table 2. There was an increase of 68% in fructosamine levels in the diabetic (WT) group when compared to the control group. Treatments were not able to reduce such increase.

Then, we chose to study the effects of these compounds on certain parameters of the purinergic system in the CNS. We evaluated the total nucleotides concentration in the cerebral cortex by HPLC. ATP (A), ADP (B), AMP (C) and the nucleoside adenosine (D) concentrations are shown in Fig. 1. Statistical analysis showed a significant increase in ATP (64.5%) and ADP (42%) concentrations in the diabetic (WT) group when compared to the control (WT) group. No alterations of AMP or adenosine concentrations were observed when compared to the control (WT) group. Interestingly, in the diabetic (CF) group, a significant increase in ATP (54%) and ADP (58%) concentrations was observed when compared to the control (WT) group.

The levels of these molecules are controlled through a family of enzymes, denominated ectonucleotidases. Then, we determined the NTPDase and 5'-nucleotidase activity in the synaptosomes from cerebral cortex. Those results are shown in Fig. 2. Statistical analysis demonstrated that NTPDase activity when ATP (Fig. 2A) and ADP (Fig. 2B) were used as substrate did not show any differences between tested groups. Only coffee treatment showed an increase (51%) in ADP hydrolysis in the diabetic (CF) group when compared to the control (WT) group. In addition, two way ANOVA statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment interaction for ADP hydrolysis [$F(3,66) = 2.88$; $P = 0,0421$]. In relation to 5'-nucleotidase, two way statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment interaction for AMP hydrolysis [$F(3,61) = 7,46$; $P = 0.04$] (Fig. 2C). Post hoc analysis revealed that 5'-nucleotidase activity was significantly increased in the diabetic (WT) groups (173%) and diabetic (CF) group (383%) when compared to the control (WT) group.

In addition, we analyzed the expression of the ectonucleotidases to determine if hyperglycemia could change its expression before changing the activity in the cerebral cortex of diabetic rats. Fig. 3 shows there were no expression alterations of NTPDase1 (A), NTPDase2 (B), NTPDase3 (C) or 5'-nucleotidase (D) expression in cerebral cortex of STZ-induced diabetic rats.

Also, as we finalize the CNS analysis, we performed an in vitro assay to show the capacity of chlorogenic acid, caffeine and both together (simulating a coffee effect) to affect the NTPDase and 5’-nucleotidase activity in synaptosomes from cerebral cortex. These results are presented in Fig. 4. As it can be observed, there was a decrease in NTPDase activity when ADP was used as substrate at 100–200 μM of chlorogenic acid. Similarly, when AMP was used as substrate, an inhibition of 5'-nucleotidase activity was found at 50–200 μM of chlorogenic acid. The addition of caffeine to the incubation medium did not alter NTPDase and 5'-nucleotidase activity. The combination of chlorogenic acid and caffeine produced a significant activation in AMP hydrolysis at 150 and 200 μM concentrations.

Furthermore, we decided to investigate the effects of chlorogenic acid in the platelets. The platelets were selected only because hyperglycemia alters their functions and promotes the thrombus formation, which contributes to macrovascular complications found in the diabetes. Table 2 presents the results obtained for the plasma platelet numbers. All groups tested demonstrated no alterations in such parameter.

Fig. 5 shows the results obtained for platelet aggregation using ADP as agonist at 5 μmol (A) and 10 μmol (B) concentrations. Two way ANOVA statistical analysis showed control or diabetic x water or treatment interaction for 10 μmol ADP [$F(3,22) = 11.3$; $P = 0.0001$]. Furthermore, an increase in platelet aggregation of 72% at 5 μmol ADP and 88% at 10 μmol ADP concentration was observed in the diabetic (WT) group when compared to the control (WT) group. Treatment with chlorogenic acid significantly decreased platelet aggregation in 58% and 66.0% in the diabetic (CGA) group when compared to the diabetic (WT) group at both 5 μmol and 10 μmol agonist concentrations, respectively. Treatment with coffee significantly decreased platelet aggregation in the diabetic (CF) group in 43% and 66% when compared to the diabetic (WT) group at both 5 μmol and 10 μmol agonist concentrations, respectively.

Then, we pondered if these changes could be due to alterations in NTPDase and 5’-nucleotidase activity since these enzymes regulate ATP, ADP and adenosine levels, which are key molecules in the control of platelet aggregation. Two way ANOVA statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment interaction for ATP hydrolysis [$F(3,58) = 3.0$; $P = 0.04$] (Fig. 6A) and for ADP hydrolysis [$F(3,51) = 8.3$; $P = 0.0001$] (Fig.

6B). Furthermore, NTPDase activity was increased in ATP (69%) and ADP (136%) hydrolysis in the diabetic (WT) group when compared to the control (WT) group. Post hoc analysis revealed the treatment with chlorogenic acid decreased ATP and ADP hydrolysis (49% for ATP and 65% for ADP), as did caffeine (56% for ATP and 62% for ADP), and coffee decreased ATP and ADP hydrolysis (52% for ATP and 49% for ADP) in the diabetic (CGA), (CA) and (CF) groups, respectively, when compared to the diabetic (WT) group ($P < 0.001$). The results obtained for 5'-nucleotidase (Fig. 6C) activity were different from those found for NTPDase activity. An increase in AMP hydrolysis was observed in the diabetic (WT) (191%) and diabetic (CGA) (212%) groups when compared to the control (WT) group.

Posteriorly, we analyzed if those compounds in vitro could alter the NTPDase and 5'-nucleotidase activity in platelets. The same experimental design was used for the platelets and cerebral cortex. Chlorogenic acid inhibited the hydrolysis of ATP, but not of ADP or AMP when PRP was incubated at 50–200 μM concentration (data not shown). In addition, no significant alterations in nucleotide hydrolysis were observed when caffeine and chlorogenic acid plus caffeine were incubated with PRP.

4. Discussion

Studies of our research group have reported that the purinergic system can be altered in different pathologies such as lung cancer[36], acute myocardial infarction[37], hypertension[38], hypoxia-ischemia[39], impairment of memory[8] and DM[14]. In this study, we found an increase in 5'-nucleotidase activity in cerebral cortex synaptosomes. An increase in the ATP and ADP levels in the cerebral cortex of the diabetic rats when compared with control rats. In addition, no changes were observed in NTPDase and 5'-nucleotidases expression in the cerebral cortex.

The cerebral cortex is highly sensitive to glucose fluctuations and perhaps it may be more affected by alterations promoted by hyperglycemia [40]. Moderate cognitive impairment is reported and cortical atrophy is found in these patients. Furthermore, high glucose levels lead to an increased level of glucose in the brain, increasing sorbitol levels, affecting protein kinases activity, oxidative stress and formation of advanced glycation end-products contributing with neuron damage [41]. In addition, the lack of insulin or problems in signaling the insulin receptor in the CNS is important because insulin is a modulator involved in several signaling in the brain, including glucose homeostasis and cognition [42]. Glucose metabolism in the brain remains the primary mean to generate the large amount of energy required to fuel synaptic action and ionic homeostasis [43]. It is possible to suggest that ATP accumulation could occur

due to excitotoxicity from of the neuron[44] or due to decrease detected in Na+, K+-ATPase activity, which it is found inhibited in DM[23]. All these results might sign damage in the CNS, which corroborates with existing data obtained in STZ-induced diabetic in rats [23, 44].

The alterations in memory, learning and cognition in diabetes can be modest, but occasionally they can be severe [41]. The difference between damage levels is correlated with time of diabetes progression since milder changes are observed at 20 days after diabetes induction [45] and at 10 weeks more intense cognitive alterations are observed [41, 42]. It is possible to explain it because the NTPDase and 5’-nucleotidase did no change their cDNA expression. Cardoso et al. (2010) demonstrated that some parameters, including antioxidant parameters are altered in prediabetic Wistar rats (glucose levels was 6.6 mmol/L) while others remain unchanged [42]. Lunkes et al. (2008) showed that NTPDase and 5′-nucleotidase activities increase with an increasing in glucose and fructose concentration[13]. In addition, the glucose blood levels of diabetic rats shown in our results were increased, but it is possible that they were not increased enough to make changes in the expression of these enzymes, since NTPDase activity also remained unchanged.

Although NTPDase activity did not change, an increase in 5'-nucleotidase (5'-NT) activity was observed. This could have occurred because enzymes other than those measured here, such as pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs) and alkaline phosphatases (APs)[11], can hydrolyze ATP directly to AMP. An increase in 5'-NT would produce high adenosine levels, but it has been demonstrated that there is an increase in the adenosine deaminase (ADA) activity in DM[9, 46]. In these conditions, the adenosine is rapidly removed by ADA in the extracellular environment. Corroborating these findings, in our experiment adenosine levels in the brain were not found altered in diabetic rats, which could indicate that adenosine could not fulfill its protective effect against excitotoxicity[44].

The lifespan of neurons is quite different from platelets. Normally, platelet lifespan is just 5 to 9 days. It is possible to suggest that platelets are more sensitive than neurons when harmful compounds are circulating in the body. Differently from the synaptosomes from the cortex cerebral, we observed that the diabetic rats showed an increase in platelet aggregation and, consequently, an increase NTPDase and 5'-NT activity. Furthermore, high glucose levels could promote NTPDase glycosylation, leading to its increased activity[47]. Glycosylation of proteins can cause structural changes altering their function and, consequently, can induce injury in the blood vessels. Markers used for estimating the degree of protein glycation in diabetes include fructosamine and glycated hemoglobin levels[48]. Our study demonstrated that

fructosamine levels were increased in the STZ-induced diabetic rats and could indicate an increase in protein glycosylation.

In addition, high concentrations of glucose similar to those found in hyperglycemia status increase per se NTPDase and 5'-NT activity in vitro in platelets[13]. The increase observed in ATP and ADP hydrolysis by NTPDase could be one mechanism of decreasing the concentration of these nucleotides, since ADP and ATP can increase platelet aggregation[49]. Lohman et al. reported that it has been suggested that chronic increases in ATP in the vasculature could potentiate pathological conditions such as hypertension and atherosclerosis[50]. It is possible that increases in ATP occur in the hyperglycemic state and contribute to an increase in NTPDase activity and platelet aggregation. Also, high AMP levels can increase the activity of 5'-NT, leading to an increase in levels of adenosine, which could act as a protective molecule by decreasing platelet activation as a compensatory mechanism[51]. However, adenosine levels could be reduced once ADA activity is found increased in serum[9], erythrocytes[52] and platelets[15]. In these terms, adenosine in not enough to protect the vascular system from damage promoted by hyperglycemia.

Our results demonstrated that coffee treatment triggered potentiation of the effects observed in the diabetic group, an increase in ATP and ADP concentration, as well as an increase in ADP and AMP hydrolysis in synaptosomes. Similar results were also observed when diabetic rats were treated with resveratrol[51]. The increase in enzymatic activity would occur due to the increase in nucleotide concentration observed in diabetic rats treated with coffee. Furthermore, when we tested the in vitro effects of the combination of chlorogenic acid and caffeine on NTPDase and 5'-NT activity in synaptosomes, we observed a different effect when compared to chlorogenic acid and caffeine separately. Farah and Danangelo mentioned that chlorogenic acid could be associated with the caffeine in the coffee, so justifying a different effect obtained in vivo with coffee and caffeine in combination with chlorogenic acid[53]. Therefore, the increase in ADP hydrolysis in synaptosomes could be associated with numerous compounds contained in this beverage, since the combination of chlorogenic acid plus caffeine did not increase ADP hydrolysis in in vitro tests. It is possible that these compounds can cross the blood–brain barrier and act on an NTPDase isoform. Thus, it is difficult to determine the compounds or the synergy among them responsible for these effects.

Unlike in synaptosomes, a decrease in NTPDase and 5'-NT activity in platelets was observed in diabetic rats treated with coffee, when compared to diabetic (WT) rats. It is important to note that the coffee treatment was able to reduce platelet aggregation in our study. Natella et al. showed that coffee consumption reduces platelet aggregation in healthy volunteers

when they used collagen and arachidonic acid as aggregate molecules after 30 and 60 min of coffee consumption, respectively[54]. Together with our results obtained about the effect on aggregation using ADP as an agonist, we suggest that coffee can act as a platelet antiaggregation agent. Coffee is rich in phenolic compounds and other substances and these compounds have effects on scavenging ROS as well as on decreasing AGE formation[55, 56]. Moreover, Natella and collaborators showed that a mix of phenolic acids from coffee was able to significantly inhibit platelet aggregation and collagen-induced thromboxane B2 formation ex vivo in healthy subjects. It is important to note that diabetic rats treated with coffee showed a 21% decrease in fructosamine levels. Verselloni at al. demonstrated that coffee fractions, mainly the ones that have a high concentration of chlorogenic acid, showed an antiglycant effect and may decrease alterations caused by high glucose concentration[56-58]. In this context, coffee may have a protector effect on the cardiovascular system in the diabetic state, attributed to chlorogenic acid, due to its reduction of platelet aggregation that is a factor in cardiovascular disease promotion.

Caffeine is a methylxanthine and the major component present in coffee. Our results showed that caffeine could decrease NTPDase activity in platelets in the diabetic group treated with caffeine. However, 5'-NT activity in platelets and platelet aggregation did not present changes during treatment with caffeine. A classical effect of caffeine is like adenosine receptor antagonists, mainly A1 and A2 receptors, which may affect the neuromodulation carried out by adenosine[59, 60] and platelet aggregation[16]. On the other hand, xanthine compounds may also inhibit platelet aggregation by inhibiting platelet-activating factor (PAF) which can decrease the release of ATP[61], but could not act when ADP is the agonist, as demonstrated by our results. When there is an increase in the release of ATP and ADP in the extracellular medium, NTPDase activity can increase as compensation in order to reduce aggregation molecules.

It is well known that natural compounds such as chlorogenic acid can act in preventing the progression of diabetic complications by decreasing hyperglycemia[62]. Chlorogenic acid may protect neurons from oxidative effects; this compound protects the cerebral cortex from the reduction of δ-ALA-D and Na+, K+-ATPase activity, memory loss and increase in AChE activity in diabetic rats[23]. However, the concentration that reaches the brain could not be enough to protect alterations in the purinergic system arising from diabetes. In addition, Farah et al. confirmed that chlorogenic acid in coffee is absorbed and metabolized in the whole gastrointestinal tract and can be found in high levels in the plasma of subjects that ingested chlorogenic acid from green coffee[63], but whether chlorogenic acid could be found in the brain in high concentrations is still unknown.

Our results demonstrated a decrease in platelet aggregation, as well as a decrease in NTPDase activity (when ATP and ADP were used as substrate) in platelets in the diabetic group treated with 5 mg/kg chlorogenic acid when compared to the diabetic (WT) group. Furthermore, in vitro results showed that ATP hydrolysis in platelets could be inhibited by chlorogenic acid. Moreover, an increase in the hydrolysis of AMP by 5'-NT could be observed in the diabetic (CGA) group; that result could indicate a beneficial effect on the organism due to the increased production of adenosine, which in turn may exert its antiplatelet activity and control the levels of ATP and ADP. In addition, Fuentes et al. (2014) showed that CGA increases the AMPc levels, which are responsible for inhibiting the platelets aggregation. Such effect may be compatible with activation of the A2A receptor[64] and probably, the augmented adenosine level seem to be responsible for the reduced platelet aggregation found in response to chlorogenic acid treatment.

In this context, chlorogenic acid seems to act on the purinergic system. However, more investigation is required to promote a better understanding. Our research group has been working with this compound and testing its beneficial effects against diabetes in different tissues[23].

In conclusion, the results of the present study demonstrated that hyperglycemia promoted alterations at molecular levels more prominent in the blood than the CNS in 30 days of STZ-induced diabetes. In addition, treatment with chlorogenic acid, caffeine and coffee can modulate the hydrolysis of adenine nucleotides and nucleosides and could contribute to protect mainly platelets against the dangerous effects of DM. These results emphasized the influence of this polyphenol and other antioxidants in the diet for human health, possibly preventing disorders associated with hyperglycemia. Future studies will analyze the effect of chlorogenic acid in relation to diabetic damage and try to discover the mechanisms by which chlorogenic acid might act to protected cells against hyperglycemia damage.

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the research fellowships.

Table 1. PCR primers design

Enzymes	Primer sequences (5'-3')	GenBank accession number (mRNA)	Amplicon size
*Hprt1**	F–GCAGACTTTGCTTTCCTTGG R–CGAGAGGTCCTTTTCACCAG	NM_012583	81
*Rpl13A**	F–ACAAGAAAAAGCGGATGGTG R–TTCCGGTAATGGATCTTTGC	NM_173340	167
*entpd1***	F-TGAGTGAATACTGTTTCTCGGGGACC R-GCCCAAAGTCCACCCTGCGTTG	NM_022587	134
*entpd2***	F-CCTTCAATGGCAGTGCCATCGTC R-CTATGAAGTTTCCAGTCACGGGAGG	NM_172030	156
*entpd3***	F- GGATACAAATTCACTGAGGCAACTTGG R-TGTAGCCTAGGGACCAGGCGATG	NM_178106	88
*cd73***	F-GGCCAGTCCACAGGGGAGTTCC R-TTGACCAGATAGCTTGGGAGGACC	NM_021576	

* According to Bonefeld (2008), ** Designed by authors.

Table 2. Glucose levels of control and STZ-induced diabetic rats and treated with chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) at the end of treatment (n = 10). Platelet number in plasma-rich platelets of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and CF (n = 5). Serum fructosamine levels (µmol/l) of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and CF. Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control (WT) group, at $P < 0.05$, n = 10.

Groups	Glucose(mg/dl)	Platelets(n *10^6/mm^3)	Fructosamine (mmol/l)
Control (WT)	90.53±2.7	0.72±0.12	183±13.9
Control (CGA)	85.3 ± 8.84	1.07±0.13	200±9.57
Control (CA)	79.1 ± 7.3	0.74±0.2	190±9.57
Control (CF)	89.46 ± 8.31	0.62±0.17	205±5.77
Diabetic (WT)	258.5 ± 15.75*	0.94±0.16	309.4±23.47*
Diabetic (CGA)	251.3 ± 13.65*	0.92±0.11	292.5±43.04*
Diabetic (CA)	235.2± 16.4*	0.60±0.1	275.0±30
Diabetic (CF)	258.3± 19.3*	0.65±0,14	243,8±18,19

Legends

Figure 1

Quantification of nucleotides ATP (A), ADP (B), AMP (C) and adenosine (D) in the cerebral cortex of control and STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, at $P < 0.05$, $n = 4$.

Figure 2

NTPDase and 5'-nucleotidase activity in synaptosomes of the cerebral cortex of control and STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) using ATP (A), ADP (B) and AMP (C) as substrate (nmol Pi/min/mg of protein). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, at $P < 0.05$, $n = 6–8$.

Figure 3

NTPDase1 (A), NTPDase2 (B) NTPDase3 (C) and 5'-nucleotidase expression in the cerebral cortex of control and STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA at $P < 0.05$, $n = 4$.

Figure 4

In vitro effects of chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and CGA+CA on NTPDase and 5'-nucleotidase activity in synaptosomes from the cerebral cortex of control rats. Results are expressed in means ± SEM. Groups with * had significantly decreased activity and # had significantly increased activity when compared to the control (0 concentration) ($P < 0.05$, $n = 5$; One-way ANOVA-Bonferroni test).

Figure 5

Percentage platelet aggregation using agonist ADP at 5 μmol (A) and 10 μmol (B) in plasma-rich platelets from control and STZ-induced diabetic rats and treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in

relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at $P < 0.05$.

Figure 6

NTPDase and 5'-nucleotidase activity in platelets from control and STZ-induced diabetic rats and treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF) using ATP (A), ADP (B) and AMP (C) as substrate (nmol Pi/min/mg of protein). Bars represent means ± SEM. One-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group, # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group, at $P < 0.05$.

References –

[1] Organization WH. Global report on diabetes. 2016 ed. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/,2016.
[2] ADA. Commum Terms. American Diabetes Association: http://www.diabetes.org/diabetes-basics/common-terms/#; 2014.
[3] Misciagna G, De Michele G, Trevisan M. Non enzymatic glycated proteins in the blood and cardiovascular disease. Current pharmaceutical design. 2007;13:3688-95.
[4] Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. Trends in pharmacological sciences. 2006;27:166-76.
[5] Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. Purinergic signalling. 2005;1:111-34.
[6] Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2005;31:217-33.
[7] Zimmermann H. Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. Nature medicine. 1999;5:987-8.
[8] Gutierres JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Rodrigues MV, Schmatz R, Pimentel VC, et al. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. Life sciences. 2012;91:1221-8.
[9] Calgaroto NS, da Costa P, Cardoso AM, Pereira LB, Vieira JM, Dalenogare D, et al. Vitamin D(3) prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats. Molecular and cellular biochemistry. 2015;405:11-21.
[10] Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic signalling. 2006;2:409-30.
[11] Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic signalling. 2012;8:437-502.
[12] Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. Biofactors. 2007;31:77-98.
[13] Lunkes GI, Lunkes DS, Leal D, Araujo Mdo C, Correa M, Becker L, et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. Diabetes research and clinical practice. 2008;81:351-7.

[14] Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierres J, Maldonado PA, et al. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. Brain research bulletin. 2009;80:371-6.
[15] Schmatz R, Mann TR, Spanevello R, Machado MM, Zanini D, Pimentel VC, 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 biochemistry and biophysics. 2013;65:129-43.
[16] Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A. Coffee, diabetes, and weight control. The American journal of clinical nutrition. 2006;84:682-93.
[17] Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. Journal Science Food Agriculture. 1999;79:362-72.
[18] Zang LY, Cosma G, Gardner H, Castranova V, Vallyathan V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. Molecular and cellular biochemistry. 2003;247:205-10.
[19] dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GE. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. Biological & pharmaceutical bulletin. 2006;29:2236-40.
[20] Li Y, Shi W, Zhou Y, Hu X, Song C, Ma H, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. Environmental toxicology and pharmacology. 2008;26:13-21.
[21] McCarty MF. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. Medical hypotheses. 2005;64:848-53.
[22] van Dam RM. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD. 2006;16:69-77.
[23] Stefanello N, Schmatz R, Pereira LB, Rubin MA, da Rocha JB, Facco G, et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. Molecular and cellular biochemistry. 2014;388:277-86.
[24] Anwar J, Spanevello RM, Pimentel VC, Gutierres J, Thome G, Cardoso A, et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2013;56:459-66.
[25] Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacological reviews. 1999;51:83-133.
[26] Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. General physiology and biophysics. 2010;29:23-30.
[27] Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes. 1994;43:1326-33.
[28] Ryder JM. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish products by high-performance liquid chromatography. Journal of agricultural and food chemistry. 1985;33:678-80.
[29] Nagy A, Delgado-Escueta AV. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). Journal of neurochemistry. 1984;43:1114-23.
[30] Schetinger MR, Porto NM, Moretto MB, Morsch VM, da Rocha JB, Vieira V, et al. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. Neurochemical research. 2000;25:949-55.
[31] Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. Journal of neurochemistry. 1984;43:971-8.

[32] Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca2+ -stimulated ATPase activity. Analytical biochemistry. 1986;157:375-80.
[33] Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. Diabetes research and clinical practice. 2004;65:1-6.
[34] Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature. 1962;194:927-9.
[35] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976;72:248-54.
[36] Zanini D, Schmatz R, Pimentel VC, Gutierres JM, Maldonado PA, Thome GR, et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2012;66:40-5.
[37] Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Spanevello RM, Gasparetto D, Rosa CS, et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. Clinical biochemistry. 2008;41:1181-5.
[38] Cardoso AM, Bagatini MD, Martins CC, Abdalla FH, Zanini D, Schmatz R, et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. Molecular and cellular biochemistry. 2012;371:147-56.
[39] Pimentel VC, Zanini D, Cardoso AM, Schmatz R, Bagatini MD, Gutierres JM, et al. Hypoxia-ischemia alters nucleotide and nucleoside catabolism and Na+,K+-ATPase activity in the cerebral cortex of newborn rats. Neurochemical research. 2013;38:886-94.
[40] Nunes AR, Alves MG, Tomas GD, Conde VR, Cristovao AC, Moreira PI, et al. Daily consumption of white tea (Camellia sinensis (L.)) improves the cerebral cortex metabolic and oxidative profile in prediabetic Wistar rats. The British journal of nutrition. 2015;113:832-42.
[41] Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends in neurosciences. 2000;23:542-9.
[42] Cardoso S, Santos MS, Seica R, Moreira PI. Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia. Biochimica et biophysica acta. 2010;1802:942-51.
[43] McCall AL. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. European journal of pharmacology. 2004;490:147-58.
[44] Jayanarayanan S, Smijin S, Peeyush KT, Anju TR, Paulose CS. NMDA and AMPA receptor mediated excitotoxicity in cerebral cortex of streptozotocin induced diabetic rat: ameliorating effects of curcumin. Chemico-biological interactions. 2013;201:39-48.
[45] Alvarez EO, Beauquis J, Revsin Y, Banzan AM, Roig P, De Nicola AF, et al. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. Behavioural brain research. 2009;198:224-30.
[46] Rutkiewicz J, Gorski J. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. FEBS letters. 1990;271:79-80.
[47] Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, et al. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology. 2010;155:230-40.
[48] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2003;17:24-38.
[49] Birk AV, Broekman MJ, Gladek EM, Robertson HD, Drosopoulos JH, Marcus AJ, et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. The Journal of laboratory and clinical medicine. 2002;140:166-75.

[50] Lohman AW, Billaud M, Isakson BE. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. Cardiovascular research. 2012;95:269-80.
[51] Schmatz R, Schetinger MR, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PA, et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Life sciences. 2009;84:345-50.
[52] De Bona KS, Bonfanti G, Bitencourt PE, Cargnelutti LO, da Silva PS, da Silva TP, et al. Syzygium cumini is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions in vitro. Journal of physiology and biochemistry. 2014;70:321-30.
[53] Farah AD, C.M. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology. 2006;18:23-36.
[54] Natella F, Nardini M, Belelli F, Pignatelli P, Di Santo S, Ghiselli A, et al. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. The British journal of nutrition. 2008;100:1276-82.
[55] Liang N, Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. Molecules. 2014;19:19180-208.
[56] Verzelloni ET, D.; Del Rio, D.;Calani, L.; Conte, A. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. Food Chem. 2011;124:1430–5.
[57] Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. Seminars in hematology. 1989;26:277-85.
[58] Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound enzymes: beneficial effect of N-acetylcysteine supplementation. Neuroscience. 2009;162:349-58.
[59] Fredholm BB. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. Pharmacology & toxicology. 1995;76:93-101.
[60] Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annual review of neuroscience. 2001;24:31-55.
[61] Misso NL, Thompson PJ. Xanthines inhibit human platelet aggregation induced by platelet-activating factor. Clinical and experimental pharmacology & physiology. 1992;19:599-602.
[62] Kuhad A, Sethi R, Chopra K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. Life sciences. 2008;83:128-34.
[63] Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. The Journal of nutrition. 2008;138:2309-15.
[64] Fuentes E, Caballero J, Alarcon M, Rojas A, Palomo I. Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation. PloS one. 2014;9:e90699.

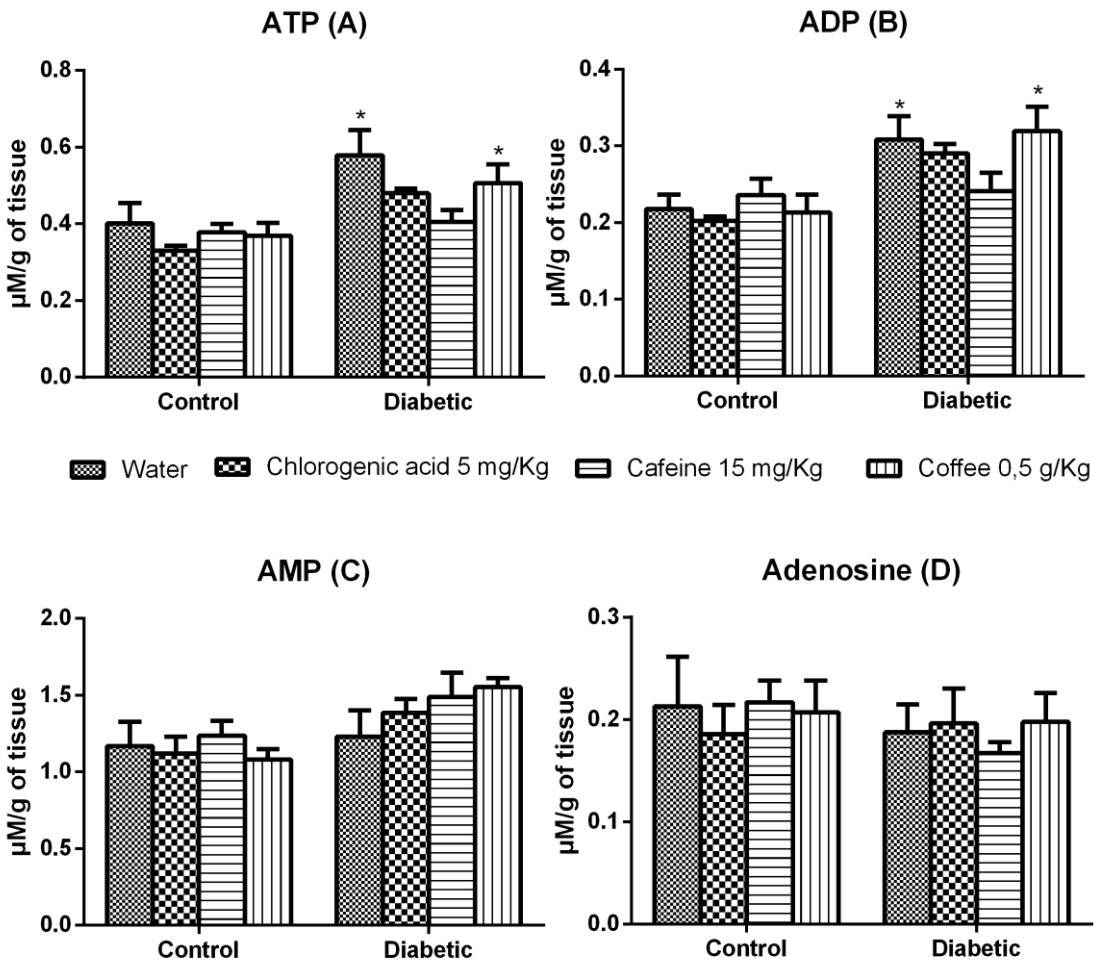

ATP (A)
ADP (B)
AMP (C)
Adenosine (D)
µM/g of tissue
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Cafeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg

Figure 1

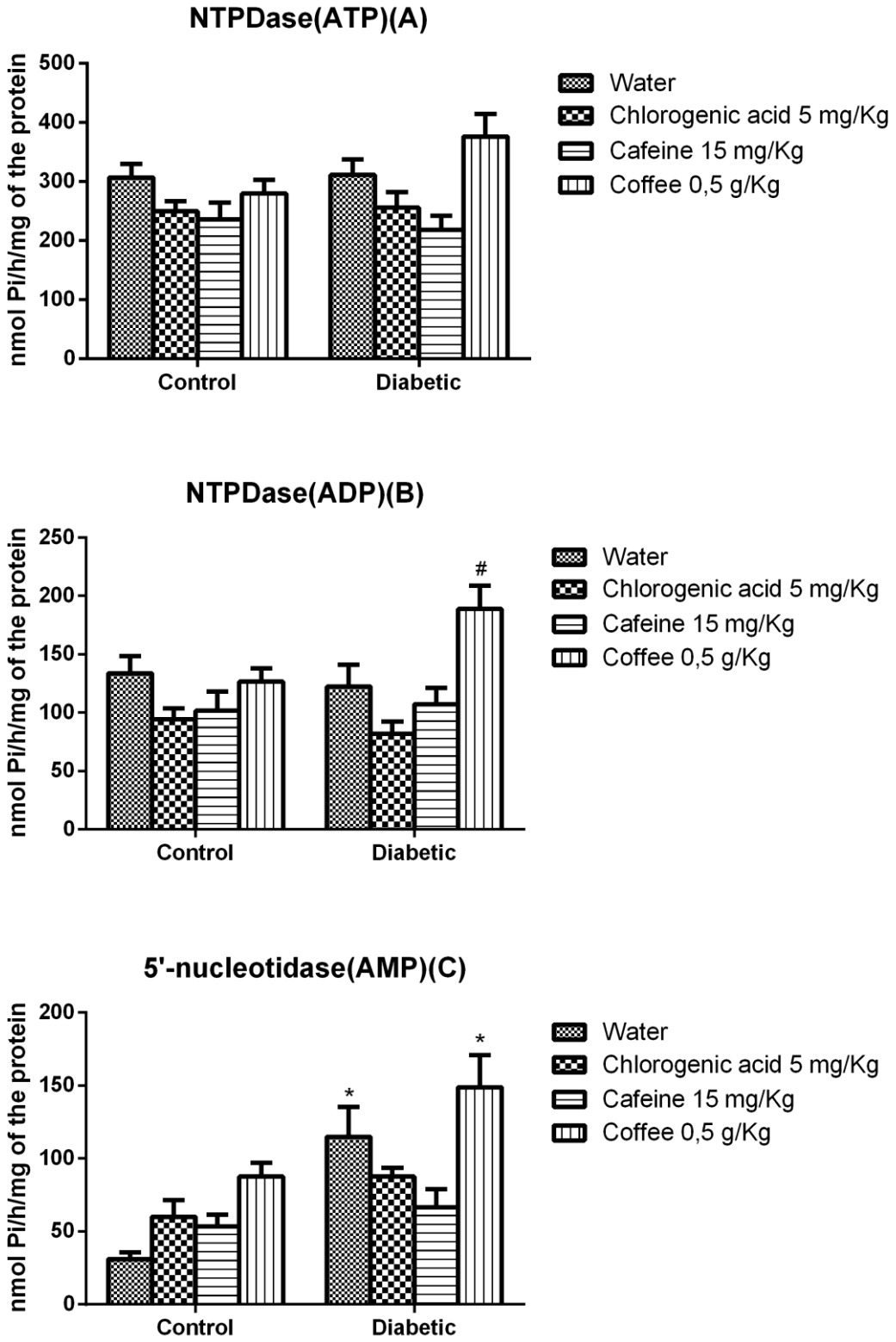

NTPDase(ATP)(A)
nmol Pi/h/mg of the protein
500
400
300
200
100
0
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Cafeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg
NTPDase(ADP)(B)
nmol Pi/h/mg of the protein
250
200
150
100
50
0
#
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Cafeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg
5'-nucleotidase(AMP)(C)
nmol Pi/h/mg of the protein
200
150
100
50
0
*
*
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Cafeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg

Figure 2

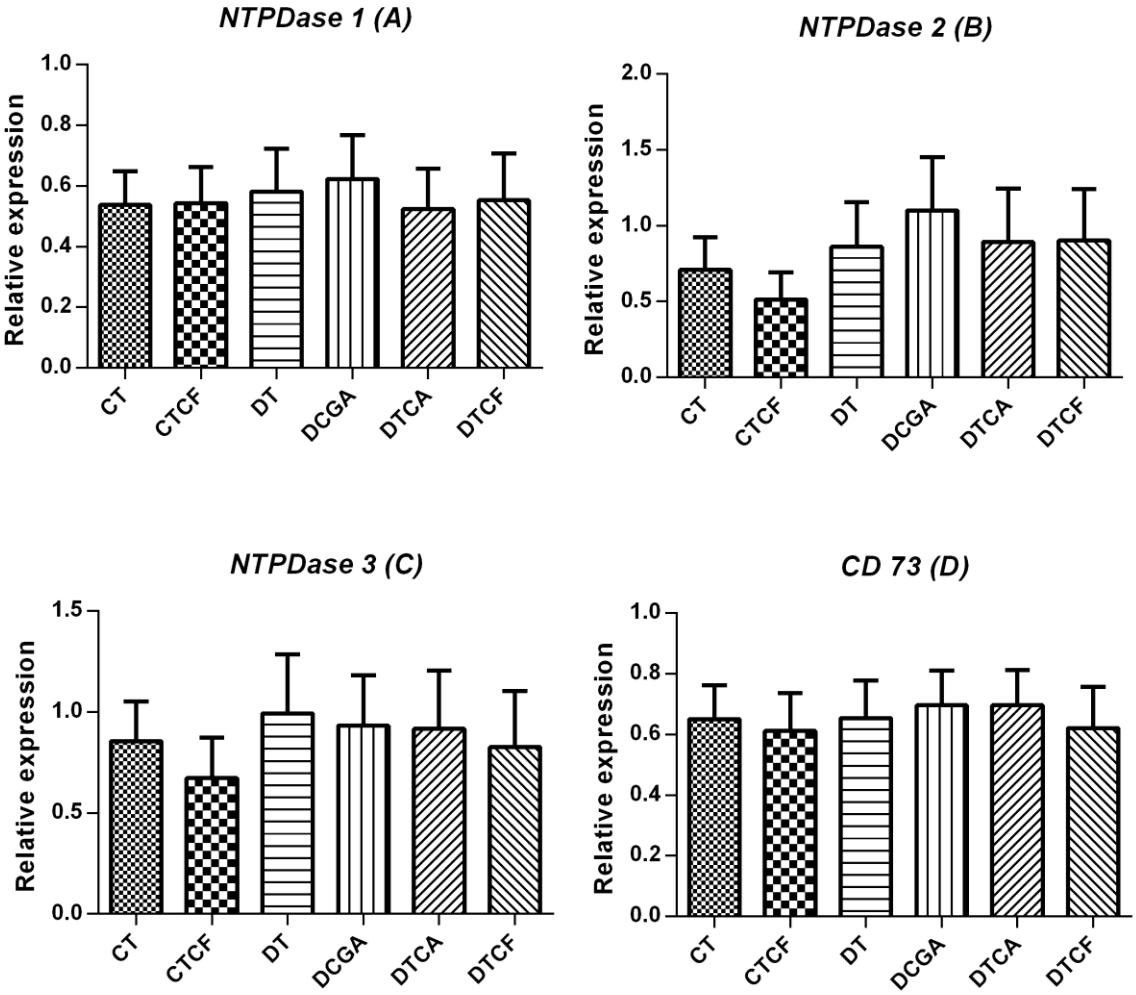

NTPDase 1 (A)
Relative expression
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CT
CTCF
DT
DCGA
DTCA
DTCF
NTPDase 2 (B)
Relative expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CT
CTCF
DT
DCGA
DTCA
DTCF
NTPDase 3 (C)
Relative expression
1.5
1.0
0.5
0.0
CT
CTCF
DT
DCGA
DTCA
DTCF
CD 73 (D)
Relative expression
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CT
CTCF
DT
DCGA
DTCA
DTCF

Figure 3

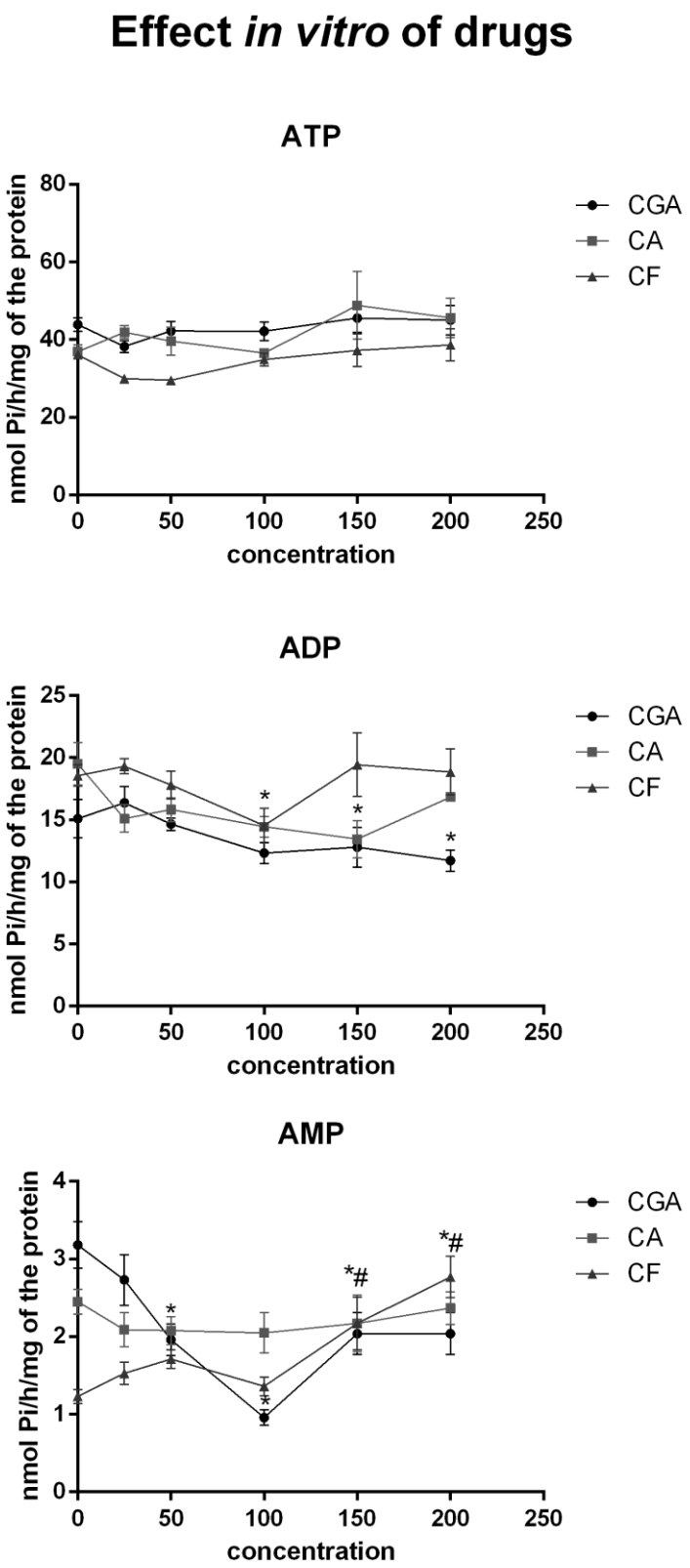
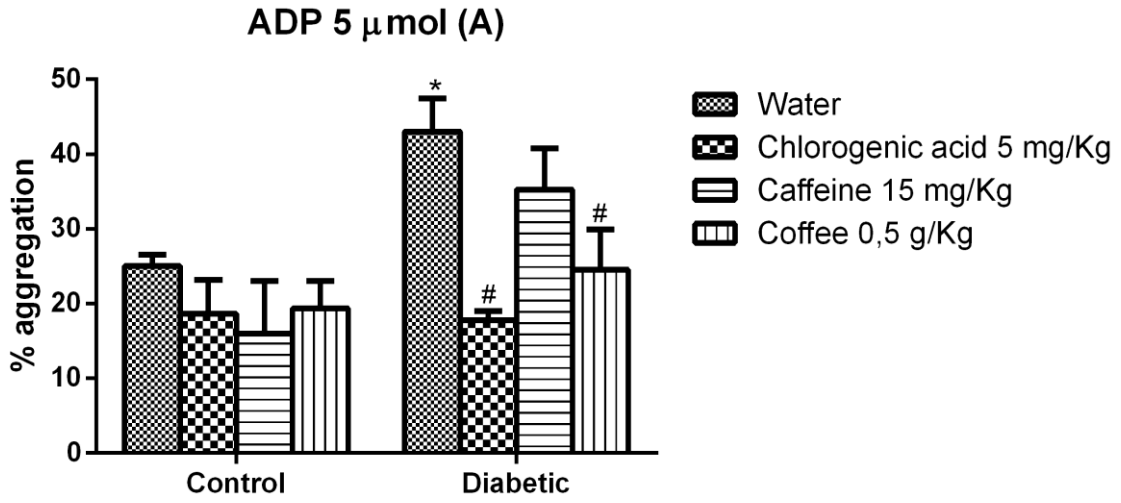

Effect *in vitro* of drugs
ATP
nmol Pi/h/mg of the protein
concentration
CGA
CA
CF
ADP
nmol Pi/h/mg of the protein
concentration
CGA
CA
CF
AMP
nmol Pi/h/mg of the protein
concentration
CGA
CA
CF

Figure 4


ADP 5 μmol (A)
% aggregation
50
40
30
20
10
0
*
#
#
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Caffeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg

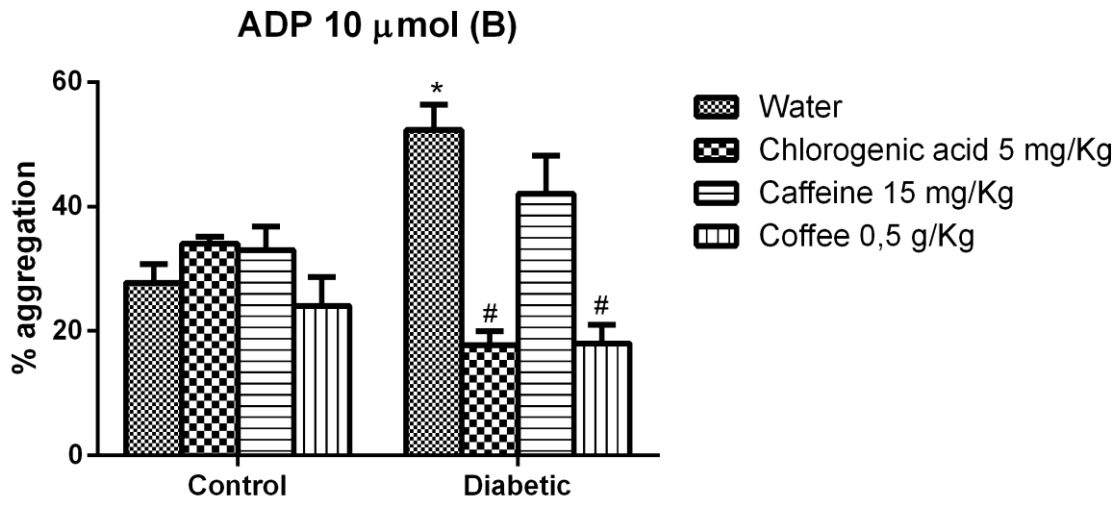

ADP 10 μmol (B)
% aggregation
60
40
20
0
*
#
#
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Caffeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg

Figure 5

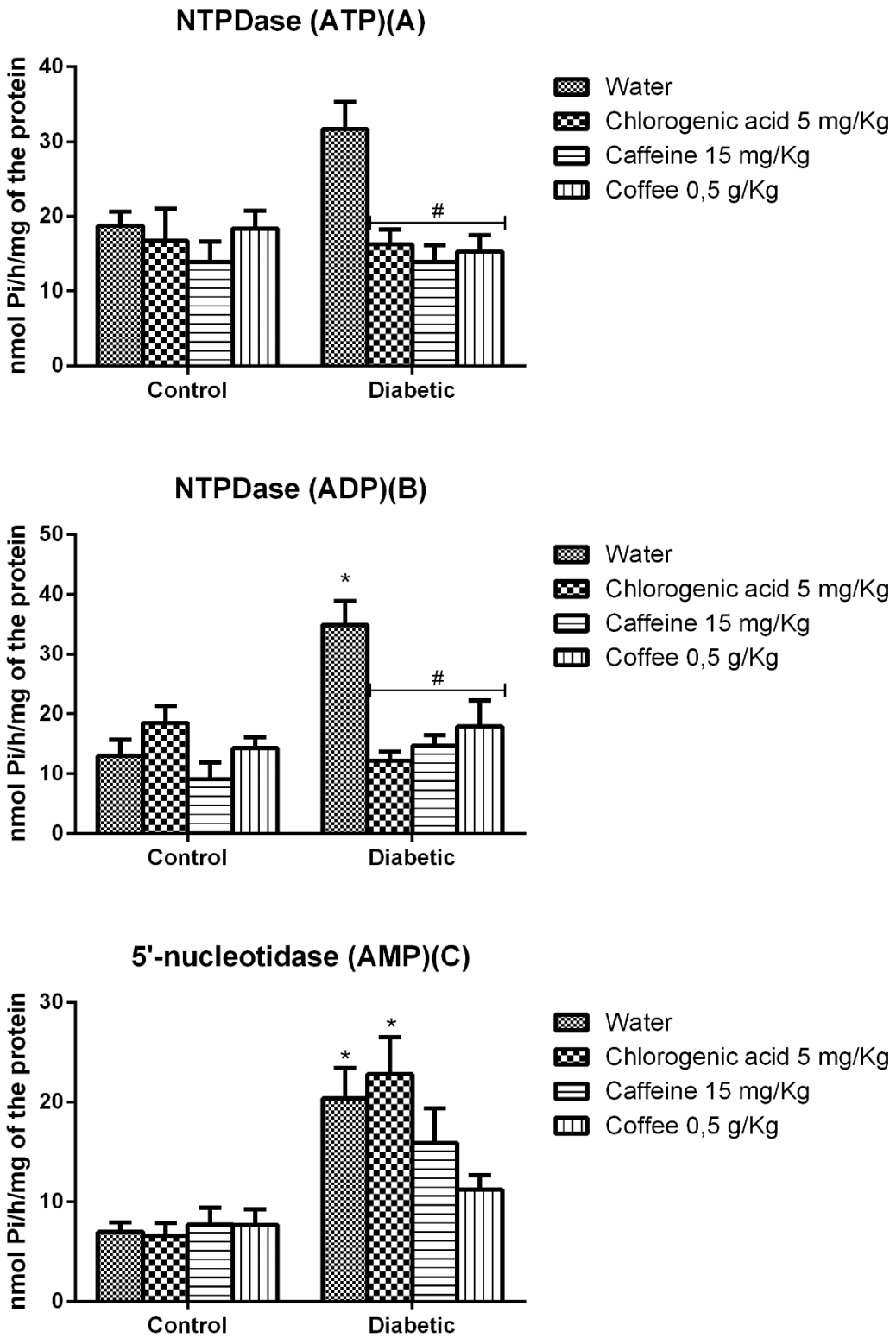

NTPDase (ATP)(A)
nmol Pi/h/mg of the protein
40
30
20
10
0
#
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Caffeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg
NTPDase (ADP)(B)
nmol Pi/h/mg of the protein
50
40
30
20
10
0
*
#
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Caffeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg
5'-nucleotidase (AMP)(C)
nmol Pi/h/mg of the protein
30
20
10
0
*
*
Control
Diabetic
Water
Chlorogenic acid 5 mg/Kg
Caffeine 15 mg/Kg
Coffee 0,5 g/Kg

Figure 6

4.2.Artigo 2: Publicado

Título:

“Chlorogenic acid, caffeine and coffee affect liver, kidney and pancreas parameters in diabetic rats”

Dados sobre o Periódico:

Journal of Diabetes and Health

ISJN: 7519-3753

Impact Index: 4.13

Qualis CAPES: Sem Qualis CAPES

Endereço eletrônico:

https://sites.google.com/site/photonfoundationorganization/home/journal-of-diabetes-and-health

Chlorogenic acid, caffeine and coffee reverse damages in liver, kidney and pancreas parameters of diabetic rats

Naiara Stefanello[1], Luciane Belmonte Pereira[1*], Roberta Schmatz[1], Sabina Passamonti[3], Grasiela Facco[1], Daniela Zanini[1], Fátima Husein Abdalla[1], Juliano Marchi Vieira[1], Verônica Souza Paiva Castro[2], Vitor Antunes de Oliveira[1], Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha[4], Jocieli Kasten[4], Vera Maria Morsch[1], Maria Rosa Chitolina Schetinger[1*]

[1]Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, University Campus, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

[2]Department of Small Animal Clinic, Department of Veterinary Clinical Pathology, Federal University of Santa Maria, University Campus, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

[3]Department of Life Sciences, University of Trieste, via L. Giorgieri 1, 34127, Trieste Italy.

[4]Departament of Morphology, Center for Health Sciences, Federal University of Santa Maria, University Campus, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author:

Address correspondence and reprint requests to:

Maria Rosa Chitolina Schetinger (mariachitolina@gmail.com)

Luciane Belmonte Pereira (lubiors@yahoo.com.br)

Tel: + 55-55-3220-9557

Fax: + 55 55 32208978

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder associated to oxidative damage in liver and kidney cells. Coffee is a beverage widely consumed and its components have antioxidant functions that could bring benefits to patients affected by this pathology. The present study investigated the effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on histological parameters in pancreas, on serum biochemical parameters as well as on oxidative stress parameters in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Our results showed that the treatment with coffee can prevent the increase in AST, ALT and γ-GT activities in diabetic rats. Furthermore, the treatment with CGA prevented the decrease in CAT activity as well as the decrease in NPSH and vitamin C levels in liver of diabet rats. The treatment with caffeine prevented the decreased in NPSH levels in liver, as well as the decrease in AST and ALT activities in diabetic rats. This study reinforce that diabetes is liked to damage in liver and kidney and shows that natural compounds may act by decreasing the deleterious effects of this disease. Compounds from coffee can mitigate damage in organs from hyperglycemic rats and, thus, can be used as therapeutic agents in diabetic patients, contributing to the improvement in the health of these patients.

Keywords: Caffeine, Coffee, Chlorogenic acid, Diabetes, Oxidative stress.

Abbreviations: Diabetes Mellitus: DM, control: CT, chlorogenic acid: CGA, caffeine: CA, coffee: CF, diabetes: DT, aspartate aminotransferase: AST, alanine aminotransferase: ALT, Gamma-glutamyl transferase: γ-GT, superoxide dismutase: SOD, catalase: CAT, δ-aminolevulinate dehydratase: δ-ALA-D, non-protein thiol: NPSH, streptozotocin: STZ, World Health Organization: WHO, glucose transporter: GLUT, reactive oxygen species: ROS, reactive species: RS, central nervous system: CNS.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is considered a major global public health issue. According the World Health Organization (WHO), there are around 346 million diabetic people in the world. DM is a metabolic disorder of multiple etiology characterized by high levels of blood glucose (hyperglycemia) and related disturbances/disorders in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. It is known that hyperglycemia occurs due to the lack of the hormone insulin or its inactivity on target tissues (Gannon, 2001).

Streptozotocin (STZ) is widely used to model the induction of diabetes in experimental animals. STZ is transported into the cell β through the glucose transporter GLUT-2, which is highly expressed in the insulin-producing cells in the islets of Langerhans (Schnedl et al., 1994). The mechanism involved in the induction of diabetes is related to reactive species (RS) production which is capable of promoting DNA alkylation causing lethal changes to the metabolism of β cells by depressing NAD levels. Additionally, nitric oxide, which may come from the decomposition of STZ, may be involved in cell death due to its interaction with free radicals (Asplund et al., 1984; Tanaka et al., 1995).

Hyperglycemia is considered the classical risk factor for the development of complications affecting the kidneys, retina, liver, heart, and other organs. These complications can be due to the increased production of free radicals, especially reactive oxygen species (ROS) and/or a decrease in cellular defense systems leading to tissue injury (Moussa, 2008). The cellular defense system can be separated in enzymatic and non-enzymatic. The enzymatic system includes the enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), while the non-enzymatic system includes, for instance, Vitamin C and SH groups. Interestingly, a decreased performance of the antioxidant system and a related increase in oxidative stress levels have indeed been observed in STZ-induced DM models, which can therefore be used to further deepen our understanding of DM (Maritim et al., 2003; Schmatz et al., 2012) .

In particular, data have shown that aminolevulinate acid dehydratase (δ-ALA-D) can be altered in hyperglycemic rats under oxidative stress conditions, presumably due to the attack by free radicals on SH groups in the active site of this enzyme (Schmatz et al., 2012). Furthermore, aminolevulinate acid dehydratase (δ-ALA-D) is the second enzyme of the heme synthesis pathway (Sassa, 1998).

Studies have demonstrated that coffee (CF), which contains many antioxidants compounds, can help preventing an imbalanced redox status in the hyperglycemic condition. Furthermore, CF intake has been associated with a series of beneficial effects in a variety of

disorders including liver illness (Masterton and Hayes, 2010). Several compounds in CF could protect the cell against the increase of the oxidative stress, such as caffeic acid, quinic acid, catechin, ferulic acid, thrigonelline, nicotinic acid, rutin and, mainly, chlorogenic acids, and caffeine (Mnatsakanyan et al., 2010).

Chlorogenic acid (CGA) family is characterized by conjugates of quinic acid with a variety of hydroxycinnamic acids (Clifford, 1999). Studies have indicated that it acts in both glucose (McCarty, 2005) and lipid metabolisms (Cho et al., 2010). Furthermore, it presents antioxidant (Kono et al., 1998), anti-inflammatory (dos Santos et al., 2006) and neuroprotective properties (Li et al., 2008). Caffeine is a methylxanthine occurring in several beverages. It is antagonist to A_2A type of adenosine receptor, with stimulant effects on the central nervous system (CNS) (da Silva et al., 2008), reduction of insulin sensitivity, and increased glucose tolerance (Thong and Graham, 2002).

Therefore, considering that the benefic effects of CF intake may be related with a favorable balance of the cellular antioxidant system in hyperglycemia, the aim of our study was to evaluate the effects of coffee, caffeine and chlorogenic acid on STZ-induced DM model in pancreas, on oxidative parameters in liver and kidneys, as well as on biochemical parameters in serum of diabetic rats. The analyses focused on the levels of Vitamin C, NPSH and ROS in liver and kidney as well as on some enzymatic factors of the antioxidant system, such as the SOD, CAT and δ-ALA-D activities.

2. Justification of research

The prevalence of diabetes for all age-groups worldwide was estimated to be 2.8% in 2000 and 4.4% in 2030. The total number of people with diabetes is projected to rise from 171 million in 2000 to 366 million in 2030 (Wild et al., 2004). In addition, the economic coasts in the treatment of diabetes are currently assumes a significant portion of health care expenditure. Thus, compounds of easy access like coffee and its components which are connected to the daily consumption of people could be useful in the treatment or prevention of major damage caused by hyperglycemia in diabetes, because extensive studies to be performed. Furthermore, coffee drinking is shown to possess positive or negative effects associated with diabetes. Thus, studies are needed to better understand the effects of coffee and its components in the pathology of diabetes.

3. Material and methods

3.1 Chemicals

DNPH (dinitrophenyl hydrazine), TCA (trichloroacetic acid) δ- aminolevulinic acid (δ–ALA), 5,5'- dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, hydrogen peroxide, epinephrine, streptozotocin, chlorogenic acid, caffeine (approximately 99% purity) and Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity. Coffee used in the experiment was 100% from *Coffee Arabica* specie, soluble and lyophilized with 30% of CA per gram of CF, analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The dose of CGA was determined in accordance with literature (Fujioka, 2008).

3.2 Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days; 220–300 g) from the Central Animal House of the University Federal of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. Animals were maintained at a constant temperature (23±1°C) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 23/2011).

3.3 Experimental induction of diabetes

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ) 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 hypoglycemic shock. Blood samples 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 glycaemia over 250 mg/dL were considered diabetic and used for the present study.

3.4 Treatment with chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF)

Animals were randomly divided into eight groups (ten or five rats per group): I - control water (CT); II – chlorogenic acid 5 mg/kg (CT/CGA); III – caffeine 15 mg/kg (CT/CA); IV - coffee 0.5 g/kg (CT/CF); V - diabetic (DT); VI - diabetic chlorogenic acid 5 mg/kg (DT/ CGA); VII - diabetic caffeine 15 mg/kg (DT/CA); VIII - diabetic coffee 0.5 g/kg (DT/CF). One week after diabetes induction, animals belonging to groups II and VI received for oral via 5 mg/kg of CGA; animals of groups III and VII received 15 mg/kg of CA; animals of groups IV and VIII received 0.5 g/kg of CF; whereas animals of groups I and V were treated with water. CGA was freshly prepared in water and CA. Coffee was solubilized in hot water and was administered

between 8 and 9 am every day for 30 days, at a volume not exceeding 0.1 mL/100g rat weight. After the treatment period, animals were firstly submitted to euthanasia being previously anesthetized with halothane. The whole blood, pancreas, liver and kidney were collected for the subsequent experiments.

3.5 Histology of Pancreas

Pancreas samples were fixed in buffered formalin (10%) for 24 h, followed by dehydration and embedded in paraffin according to standard procedures and sectioned at 6 microns by microtome. For histological evaluation, these sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson/Goldner trichromic. The quantitative evaluation of number and area of the pancreatic islets was estimated in a total of 152 slides from which five random fields were photographed from each slide (760 total photos) (OLYMPUS CX21 microscope, OLYMPUS camera).

3.6 Biochemical analysis

Whole blood was separated by cardiac puncture and in tubes without an anticoagulant system and centrifuged at 1800 x g for 10 min. The precipitate was discarded and the serum was used to determine aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ-glutamyltransferase (γ-GT) activities, as well as uric acid and creatinine levels. The parameters were evaluated in a semi-automatic analyzer (TP Analyzer Plus®, Thermoplate-China) using commercial kits (Labtest® Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil). Tests were carried out in duplicates.

3.7 Tissue preparation

The samples of liver and kidney were quickly removed, placed on ice, and homogenized in 50 mM Tris HCl pH 7.4 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged at 2000 g, at 4ºC, for 10 min to yield the low speed supernatant (S1) that was used immediately for vitamin C, non-protein thiol group (NPSH) and δ-ALA-D assay. Furthermore, during all procedures the S1 was maintained on ice. In order to perform SOD and CAT assay, liver and kidney were diluted and homogenized as described below

3.8 Vitamin C and non-protein thiol group (NPSH) content

Hepatic and renal vitamin C levels were determined by (Jacques-Silva et al., 2001). Proteins of liver and kidney were precipitated in a cold 10% trichloroacetic acid (TCA) solution at a proportion of 1:1 (v/v) and submitted to centrifugation. This supernatant was used for analysis. The reaction product was determined using a color reagent containing 4.5 mg/mL

dinitrophenylhydrazine (DNPH) and CuSO4 (0.075 mg/ mL). Vitamin C levels are expressed as mg ascorbic acid/g tissue.

NPSH was measured spectrophotometrically with Ellman's reagent (Ellman, 1959). The reaction product was measured at 412 nm after the addition of 10 mM 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (50 µL). A standard curve using cysteine was added to calculate the content of thiol groups in samples, and was expressed as mmol SH/g tissue.

3.9 Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activities

The SOD assay was measured by (Misra and Fridovich, 1972). Kidney and liver were adequately diluted with Tris HCl pH 7.4 at a proportion of 1:60(w/v). Briefly, epinephrine undergoes auto-oxidation at pH 10.5 to produce adrenochrome, a colored product that was detected at 480 nm. The addition of samples containing SOD inhibits the auto-oxidation of epinephrine. The amount of enzyme required to produce 50% inhibition was defined as 1 unit of enzyme activity.

For the CAT assay, liver and kidney were homogenized in 50 mM Tris HCl pH 7.4, at a proportion of 1:60 (w/v). The homogenate was centrifuged at 2000 g for 10 min to yield a supernatant that was used for the enzyme assay. CAT activity was measured by (Nelson and Kiesow, 1972). The enzymatic activity was expressed in units mg^{-1} protein (One unit of the enzyme is considered as the amount of CAT which decomposes 1 mmol of H_2O_2 per min at pH 7 at 25 ºC.)

3.10 δ-Aminolevulinic acid dehydratase activity (δ-ALA-D)

Hepatic and renal δ-ALA-D activity was assayed according to the method (Sassa, 1982) by measuring the rate of porphobilinogen (PBG) formation. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm. δ-ALA-D activity was expressed as nmol porphobilinogen (PBG) mg/ protein/h.

3.11 Reactive Species measurement

The formation of reactive species (RS) was estimated according to a previous report by (Ali et al., 1992) and adapted for liver and kidney homogenates. RS levels were determined by a spectrofluorimetric method. The oxidation of DCFH-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular RS. DCF fluorescence intensity emission was recorded at 525 and 488 nm of excitation 60 minutes after the addition of DCFH-DA to the medium.

3.12 Protein determination

Protein was measured by (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

3.13 Statistical analysis

The statistical analysis used was two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. Interactions were only presented when significant. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in both analyses used. All data were expressed as mean ± SEM.

For histological evaluation, data were presented as mean values ± standard error. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey test ($P<0.05$). All analyses were carried out using SPSS 20®.

4. Results

4.1 Histological analysis

Table 1 presents the number of pancreatic islets. A decrease in the number of pancreatic islets was observed in the diabetic group when compared to the control group ($P < 0.05$). CGA, CA and CF treatment did not repair the number of pancreatic islets destroyed by streptozotocin in DT/CGA and DT/CA and DT/CF groups when compared to DT group. Furthermore, CGA, CA and CF per se did not alter the number of pancreatic islets in CT/CGA, CT/CA and CT/CF groups. Figure 1 and Table 1 show the area of pancreatic islets. As can be observed, there was an increase in the area of pancreatic islets in CT/CGA (C), CT/CA (D) and CT/CF groups (E) when compared to control (A) and diabetic (B) groups. DT/CGA, DT/CA and DT/CF groups showed no alterations in the area of pancreatic islets when compared to the control group.

4.2 Biochemical analysis

The activities of serum enzymes AST, ALT and γ-GT were significantly higher in the DT group when compared to the CT group ($P < 0.05$) (Table 2). The treatments with CA and CF prevented significantly the rise of AST and ALT activities ($P < 0.05$), whereas CF treatment significantly decreased γ-GT activity ($P < 0.05$).

No alterations were observed in uric acid and creatinine levels in any of the groups tested in this study (Table 2).

4.3 Vitamin C levels

Vitamin C levels in liver (A) and in kidney (B) are shown in Fig 2. In liver, statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment (CGA, CA or CF) interaction [$F(3,66) = 5.69$; $P=0.0016$] for vitamin C levels. There was a significant decrease in vitamin C levels in the DT group when compared to the CT group [$F(1,66) = 25.03$; $P<0.0001$]. Treatment with CGA significantly prevented this decrease in the vitamin C levels ($P<0.01$). Moreover, CA *per se* could decrease vitamin C levels compared to the control group ($P < 0.05$). In kidney, a decrease in the levels of vitamin C could be observed in the DT group

when compared to the CT group: [F(1,68) = 27.54; P<0.0001]. The compounds CGA, CA and CF had no effect on vitamin C levels in the groups analyzed.

4.4 NPSH levels

NPSH levels in liver (A) and in kidney (B) are shown in Fig 4. In liver, statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment (CGA, CA or CF) interaction [F(3,65) = 4.79; P=0.0045] for NPSH levels. As can be observed, there was a significant decrease in NPSH levels in the DT group: [F(1,65) = 21.61; P<0.0001]. Treatment with CGA (P < 0.01) and CA (P < 0.05) significantly prevented the decrease in NPSH levels. Moreover, CA *per se* decreased NPSH levels compared to the CT group (P < 0.05). In kidney, statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment (CGA, CA or CF) interaction [F(3,65) = 8.58; P<0.0001] for NPSH levels. A significant decrease in NPSH levels in the DT group was observed [F(1,65) = 86.08; P<0.0001]. However, no treatment was able to prevent the decrease of NPSH levels in the DT group. Moreover, only the control rats treated with CA showed a significant (P < 0.05) decrease in the NPSH levels when compared with the CT group.

4.5 Superoxide Dismutase activity

Fig.4 shows the results of SOD activity in liver (A) and kidney (B). In liver, SOD activity was decreased in the DT group: [F(1,66) = 12.44; P=0.0008], but treatment with CGA, CA and CF prevented it. It is noteworthy that SOD activity of control rats treated with CF decreased when compared with the control group. In kidney, a small decrease of renal SOD activity in the DT group was also observed: [F(1,59) = 5.26; P=0.025]. However, CGA, CA and CF treatment had no effects.

4.6 Catalase activity

Fig. 5 (A) liver and (B) kidney show CAT activity. In liver, CAT activity significantly decreased in the DT group: [F(1,60) = 36.99; P<0.0001]. CGA treatment prevented such decrease in the DT group (P<0.05). In kidney, the CAT activity showed a significant decrease in the DT group: [F(1,17) = 270.29; P<0.0001]. However, no treatment could significantly prevent such decrease in diabetic rats. Furthermore, we observed that a decreased kidney CAT activity was observed only in control rats treated with CA and CF *per se* (P < 0.05).

4.7 δ-ALA-D activity

The δ -ALA-D activity changes in liver (A) and in kidney (B) are shown in Fig 6. In liver, a significant decrease in δ -ALA-D activity was observed in the DT group: [F(1,30) = 117.42; P<0.0001] when compared to the CT group. The treatment with CGA, CA and CF was

not able to prevent the decrease in the δ -ALA-D activity. In kidney, statistical analysis showed a significant control or diabetic x water or treatment (CGA, CA or CF) interaction [F(3,30) = 5.09; P=0.0057] for δ -ALA-D activity. As can be observed, there was a decrease in δ -ALA-D activity from the DT group: [F(1,30) = 26.77; P<0.0001] when compared to the CT group. Treatment with CGA, CA and CF did not prevent the decrease in the δ -ALA-D activity when compared with the DT group. However, only the control group treated with CF showed an increase in the δ -ALA-D activity when compared to the CT group.

4.8 Reactive species (RS) levels

RS levels in liver (A) and in kidney (B) are shown in Fig 7. In liver, no increase in RS levels was observed in DT group: [F(1,29) = 2.07; P=0.17]. In kidney, a significant increase in RS levels in the DT group was observed: [F(1,65) = 22.76; P<0.0001]. However, no treatment was able to prevent the increase in RS levels when compared to the DT group. The compounds CGA, CA and CF *per se* had no effect on RS levels (P < 0.05) in both liver and kidney from control rats.

5. Discussion

STZ-induced DM model constituted an important tool to study if natural compounds bear any promise in the prevention and treatment of diabetic complications (Evelson et al., 2005; Mahesh and Menon, 2004). Diabetogenic effect of STZ is mainly attributed to the excess production of free radicals causing the destruction of pancreatic β-cells. In our experiment we observed a decrease in the number of pancreatic islets in the DT group (Table 1). As a consequence, this effect reduced the synthesis and the release of insulin, while affecting organs such as liver and kidney (Wu and Huan, 2008). Moreover, we observed an increase in the area of pancreatic islets in the CT groups treated with CGA, CA and CF (Table 1 and Fig. 1). The increase of islets usually results from beta-cell hyperplasia which may be due to insulin resistance and hyperglycemia. In addition, the increase in islets was observed early from DM, where islet cells adapted to insulin resistance by increasing cell mass (Abdelrahim, 2013). Alterations of insulin acts in target tissue could be an effect of the ingestion of CF and CA (Feinberg et al., 1968; Keijzers et al., 2002). In addition, CGA can increase the incretin release from islets (Johnston et al., 2003).

Alterations in serum ALT and γ-GT are described when liver damage occurs, though ALT is a more specific marker of hepatic injury than γ-GT (Higdon and Frei, 2006). Furthermore, AST and ALT are directly associated with the conversion of aminoacids into

ketoacids and are increased in the diabetic condition. Elevated activity of γ-GT in serum takes place as a result of hepatic induction of the enzyme (Kaleem et al., 2008). All the parameters analyzed showed that there was a hepatic damage in kidney and liver from STZ-induced DM.

In our experiment, STZ 60 mg/kg induced hyperglycemia demonstrated by glucose values above 250 mg/dL (data not show) characterizing the diabetic status. Increased blood glucose levels may result in an increase of ROS formation through various mechanisms, such as auto-oxidation of glucose, the formation of advanced glycation end products, and alterations in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system, consequently contributing to oxidative damage in the diabetes (Lei et al., 2012).

In the present study, we observed a decrease in vitamin C and NPSH levels as well as a decrease in SOD (liver and kidney), CAT (liver and kidney) and δ-ALA-D (liver and kidney) activities in the diabetic rats. Similar results have been found in other experimental models of DM (Lei et al., 2012; Mahesh and Menon, 2004; Murugan and Pari, 2006). This decrease in antioxidant systems found in our study may be due to several factors. Vitamin C or ascorbate is one of the first lines of non-enzymatic antioxidant defense systems because it disappears before other antioxidants when exposed to free radicals (Mahesh and Menon, 2004). Moreover, vitamin C is a co-factor of other enzymes (Al-Shamsi et al., 2006). Together with ascorbate, the non-protein thiol (NPSH) is also an important defense system against free radicals (Malik et al., 2007), which oxidize and inactivate compounds with available SH groups. Due to an increase in free radicals in DM, NPSH could be found decreased in liver and kidney of diabetic rats (Ravi et al., 2004).

Though the antioxidant enzymes SOD and CAT act on the front line in combating RS, their activity can be inhibited by glycation promoted by high concentrations of glucose (Reddi and Bollineni, 1997; Sadi et al., 2008). In turn, hydrogen peroxide may also inhibit the activity of SOD (Gumieniczek, 2005). Moreover, the expression of these enzymes, at the level of both protein and mRNA, may be reduced (Limaye et al., 2003; Sadi et al., 2008), presumably due to a reduced stability of mRNA against oxidative stress and also oxidation of a transcription factor gene (Sadi et al., 2008).

On the other hand, our results demonstrated an increase in the RS production in kidney but not in liver. In addition, kidney shows a lower antioxidant defense system, and our data suggest that this decreased antioxidant power may lead to the increase in RS levels (Michiels et al., 1994). In relation to kidney, Evelson et al. (2005) suggests that the activity of some enzymes may change due to the onset time of the disease, and the same can happen with the RS levels (Evelson et al., 2005).

In relation to the role of the liver in reducing the production of RS and their detrimental effects, it should be noted that endogenous enzyme-based antioxidant mechanisms, such as glutathione peroxidase and glutathione reductase, are higher in liver than in other tissues (Michiels et al., 1994).

Chlorogenic acid is a compound that has a good antioxidant activity (Kono et al., 1998; Shahidi and Chandrasekara, 2010). Our results showed a protective effect of CGA in preventing a decrease of antioxidant defenses such as SOD and CAT activities, as well as NPSH and Vitamin C in the liver of the diabetic rats. However, CGA is not able to protect the kidney against the changes induced by diabetic status. Shahidi & Chandrasekara (2010) showed that the six OH groups of CGA (Fig. 8) can trap free radicals. It is important to note that each molecule of chlorogenic acid may trap about two peroxyl radicals (Shahidi and Chandrasekara, 2010). When CGA reacted with free radicals it produced compounds, which were rapidly broken down to new and stable products (Kono et al., 1998). In addition, CGA could be efficient in regenerating enzymes acting as one electron donor (Shahidi and Chandrasekara, 2010). Interestingly, CGA is more extensively metabolized and storage in the liver (Monteiro et al., 2007; Olthof et al., 2001), which could be the reason why CGA is more effective in the liver than in the kidneys.

Regarding the treatment with CA, our results demonstrated that it can prevent the damage caused by diabetic status in NPSH levels in liver. Moreover, CA showed a decrease in the NPSH levels in control rats in both liver and kidney and prevented an increase in both AST and ALT levels in the DT/CA group. Sato & Izumi (1988) showed that CA could decrease the intracellular GSH levels (Sato, 1989). The mechanisms are still unclear, but CA can demonstrate alterations in these tissues (Muriel and Arauz, 2010). Furthermore, CA has the ability to act as an antioxidant molecule (Lv et al., 2010; Prasanthi et al., 2010). Varma et al. (2010) suggested that CA could scavenge ROS, particularly hydroxyl radical (Varma et al., 2010). As also demonstrated by our results obtained in situations of oxidative stress, as found in DM, CA can act as an antioxidant molecule (Devasagayam et al., 1996).

Results observed in the animals treated with CF are similar to those observed by using CA and different from those observed by CGA. Farah & Donangelo (2006) demonstrated that CGA is lost to a great extent upon roasting (Farah, 2006). Nevertheless, CF has beneficial effects on human health (Matsuda et al., 2011; Yamauchi et al., 2010), as demonstrated by normalization of the high AST, ALT and γ-GT levels found in the DT/CF group. Higdon & Frei (2006) found that CF and CA consumption was inversely associated with the risk of having an abnormally elevated serum ALT level (Higdon and Frei, 2006). In addition, the main CF

polyphenols are phenolic acids that show antioxidant properties (Natella et al., 2002). Thus, in an elevated dose, CF could act as an antioxidant (Yamauchi et al., 2010) as well as a hepatoprotector.

In relation to δ-ALA-D activity, we found a decrease in its activity in diabetic rats. This may lead to an accumulation of aminolevulinic acid, which under physiological conditions can have pro-oxidant effects (Bechara, 1996). This enzyme presents SH groups, essential for catalytic activity. The oxidation of these SH groups by free radicals reduce δ-ALA-D activity (Barnard et al., 1977; Ravi et al., 2004). All results found in our experiment are consistent with similar changes observed in liver and kidney in many other studies (Murugan and Pari, 2006; Ravi et al., 2004; Schmatz et al., 2012) and make δ-ALA-D or aminolevulinic acid additional markers of DM-induced liver disease, besides AST, ALT and γ-GT.

Conclusion

Results found in the present study demonstrate that STZ induces diabetes by the destruction of pancreatic islets. Also, STZ induces oxidative alterations in liver and kidneys on diabetes. Of all the compounds studied, CGA showed better effects in combating oxidative alterations arising from hyperglycemia. Thereby, we can suggest that bioactive phenolic compounds such as CGA present in CF may prevent cellular oxidative damage occurring in diabetes.

Research highlights

1) CGA could act as antioxidant molecule in some parameters analyzed from liver.
2) The STZ-induced diabetes promoted decrease SOD, CAT and ALA-D activities.
3) The STZ-induced diabetes promoted decrease Vitamin C and NPSH levels.
4) CA and CF protected alterations in AST and ALT.
5) CGA, CF and CF treatment no protect oxidative alterations on kidney of DM.

Limitations

The molecular mechanism of how CF, CA and CGA protected the liver of alterations promoted by hyperglycemia require more studies to find the mechanism of action, once this compounds not decrease the high glucose blood.

Recommendations

Considering the results showed in this paper and other results not published yet, coffee e mainly chlorogenic acid could promoted beneficial effects to diabetic individuals.

Funding and Policy Aspects

The research about diabetes ant is complications as well as possible therapeutic agents should be encouraged. Since coffee is widely consumed, this beverage could be target in several

other researches, focusing, for example, in its action mechanisms. Thus, we consider extremely important the financial support from governmental and private agencies for the development of these investigations. Moreover, we hope that the incentive for this kind of research be increased.

Authors' Contribution and Competing Interests

Grasiela Facco: Conducted rats studies.

Daniela Zanini, Fátima Husein Abdalla, Vitor Antunes de Oliveira and Juliano Marchi Vieira: Significantly contributed in liver and kidney analysis and interpretation.

Verônica Souza Paiva Castro: Significantly contributed in serum analysis and interpretation.

Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha and Jocieli Kasten: Significantly contributed in histological analysis and interpretation.

Sabina Passamonti and Vera Maria Morsch: Actively involved in designing the studies.

Naiara Stefanello, Luciane Belmonte Pereira, Roberta Schmatz, Maria Rosa Chitolina Schetinger: Data analysis and writing the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Convênio Bilateral Brasil-Itália, number 490161/2008-1), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the research fellowships, FINEP-IBNET and INCT for Excitoxicity and Neuroprotection.

Table 1. Number of the pancreatic islets of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and coffee in the end of treatment (n=5).

Groups	*Number of the pancreatic islets*	*Area of the pancreatic islets*
Control	11.45±1.21	1100±87
Chlorogenic acid	11.0±1.3	2100±170*
Caffeine	14.0±1.0	1958±156*
coffee	13.0±0.97	1691±112*
Diabetic (DT)	4.65±0.48*	880±80
DT/CGA	5.12±1.28*	1000±100
DT/CA	2.9±0.42*	770±64
DT/CF	5.5±0.57*	1016±124

* indicates a significant difference in relation to the control group ($P < 0.05$; n= 5).

Table 2. Serum ALT, AST, γ-GT, uric acid, creatinine of STZ-induced diabetic rats and treated with CGA, CA and coffee in the end of treatment (n=5).

Groups	*ALT*	*AST*	*γ -GT*	*Uric acid*	*Creatinine*
Control	39.2±4.75	155±15.37	1.9.±0.12	2.1±0.24	0.5±0.008
Chlorogenic acid	32.9±0.67	158±31.62	2.1±0.39	2.7±0.31	0.52±0.024
Caffeine	34.8±2.55	129±2.98	3.2±0.63	2.4±0.48	0.52±0.025
Coffee	40.8±3.68	148±9.05	2.8±0.5	2.3±0.25	0.51±0.027
Diabetic (DT)	259±54.2*	619±86.67*	5.2±0.6*	2.3±0.15	0.58±0.02
DT/CGA	246±51.8*	525±74.74*	4.8±0.29*	1.4±0.25	0.54±0.075
DT/CA	108±39.2#	290±107#	4.4±0.99*	1.6±0.28	0.62±0.038
DT/CF	145±37.2#	384±82.39#	1.2±0.1#	1.8±0.57	0.61±0.032

* indicates a significant difference in relation to the control group; # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group ($P < 0.05$; n= 5).

Legends

Figure 1

Histological analysis showed area of the pancreatic islets to A) control group, B) diabetic group, C) Control/CGA, D) Control/CA and E) Control/CF.

Figure 2

Ascorbic acid content in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group; # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group ($P < 0.05$; n= 10).

Figure 3
NPSH values in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group; # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group ($P < 0.05$; n= 10).

Figure 4
SOD activity in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group ($P < 0.05$; n= 10).

Figure 5
CAT activity in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group; # indicates a significant difference in relation to the diabetic control group ($P < 0.05$; n= 5).

Figure 6
δ-ALA-D activity in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group ($P < 0.05$; n= 5).

Figure 7
RS levels in liver (A) and kidney (B) from STZ-induced diabetic rats and those treated with water (WT), chlorogenic acid (CGA), caffeine (CA) and coffee (CF). Bars represent means ± SEM. Two-way ANOVA was followed by Bonferroni post-test. * indicates a significant difference in relation to the control group ($P < 0.05$; n= 5).

Figure 8
Chlorogenic acid structure.

References

Abdelrahim E.A. 2013. Histopathological change of the endocrine pancreas in male albino rat treated with the atypical antipsychotic clozapine. Romanian journal of morphology and embryology, 54, 385-394.

Al-Shamsi M., Amin A., Adeghate E., 2006. Effect of vitamin C on liver and kidney functions in normal and diabetic rats. Annals of the New York Academy of Sciences, 1084, 371-390.

Ali S.F., LeBel C.P., Bondy S.C. 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotoxicology, 13, 637-648.

Asplund K., Grankvist K., Marklund S., Taljedal I.B. 1984. Partial protection against streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. Acta endocrinologica, 107, 390-394.

Barnard G.F., Itoh R., Hohberger L.H., Shemin D. 1977. Mechanism of porphobilinogen synthase. Possible role of essential thiol groups. The Journal of biological chemistry, 252, 8965-8974.

Bechara E.J. 1996. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. Brazilian journal of medical and biological research, 29, 841-851.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72, 248-254.

Cho A.S., Jeon S.M., Kim M.J., Yeo J., Seo K.I., Choi M.S., Lee M.K. 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and chemical toxicology,* 48, 937-943.

Clifford M.N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. Journal Science Food Agriculture, 79, 362-372.

da Silva R.S., Richetti S.K., da Silveira V.G., Battastini A.M., Bogo M.R., Lara D.R., Bonan C.D. 2008. Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *International journal of developmental neuroscience,* 26, 339-343.

Devasagayam T.P., Kamat J.P., Mohan H., Kesavan P.C. 1996. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. Biochimica et biophysica acta, 1282, 63-70.

dos Santos M.D., Almeida M.C., Lopes N.P., de Souza G.E. 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. Biological & pharmaceutical bulletin, 29, 2236-2240.

Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics, 82, 70-77.

Evelson P., Susemihl C., Villarreal I., Llesuy S., Rodriguez R., Peredo H., Lemberg A., Perazzo J., and Filinger E. 2005. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats. Annals of hepatology, 4, 115-120.

Farah A.D., Donangelo C.M. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18, 23-36.

Feinberg L.J., Sandberg H., De Castro O., Bellet S. 1968. Effects of coffee ingestion on oral glucose tolerance curves in normal human subjects. Metabolism: clinical and experimental, 17, 916-922.

Fujioka K.S., Shibamoto T. 2008. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. Food Chemistry, 106, 217-221.

Gannon M. 2001. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. Trends in genetics : TIG, 17, S23-28.

Gumieniczek A. 2005. Oxidative stress in kidney and liver of alloxan-induced diabetic rabbits: effect of repaglinide. Acta diabetologica, 42, 75-81.

Higdon J.V., Frei B. 2006. Coffee and health: a review of recent human research. Critical reviews in food science and nutrition, 46, 101-123.

Jacques-Silva M.C., Nogueira C.W., Broch L.C., Flores E.M., Rocha J.B. 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. Pharmacology & toxicology, 88, 119-125.

Johnston K.L., Clifford M.N., Morgan L.M. 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. The American journal of clinical nutrition, 78, 728-733.

Kaleem M., Medha P., Ahmed Q.U., Asif M., Bano B. 2008. Beneficial effects of Annona squamosa extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Singapore medical journal, 49, 800-804.

Keijzers G.B., De Galan B.E., Tack C.J., Smits P. 2002. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. Diabetes care, 25, 364-369.

Kono Y., Kashine S., Yoneyama T., Sakamoto Y., Matsui Y., Shibata H. 1998. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 62, 22-27.

Lei S., Liu Y., Liu H., Yu H., Wang H., Xia Z. 2012. Effects of N-acetylcysteine on nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase activation and antioxidant status in heart, lung, liver and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Yonsei medical journal, 53, 294-303.

Li Y., Shi W., Zhou Y., Hu X., Song C., Ma H., Wang C. 2008. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. Environmental toxicology and pharmacology, 26, 13-21.

Limaye P.V., Raghuram N., Sivakami S. 2003. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. Molecular and cellular biochemistry, 243, 147-152.

Lv X., Chen Z., Li J., Zhang L., Liu H., Huang C., Zhu P. 2010. Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflammation research*, 59, 635-645.

Mahesh T., Menon V.P. 2004. Quercetin allievates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytotherapy research : PTR, 18, 123-127.

Malik A.N., Rossios C., Al-Kafaji G., Shah A., Page R.A. 2007. Glucose regulation of CDK7, a putative thiol related gene, in experimental diabetic nephropathy. Biochemical and biophysical research communications, 357, 237-244.

Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. Journal of biochemical and molecular toxicology, 17, 24-38.

Masterton G.S., Hayes P.C. 2010. Coffee and the liver: a potential treatment for liver disease? European journal of gastroenterology & hepatology, 22, 1277-1283.

Matsuda Y., Kobayashi M., Yamauchi R., Ojika M., Hiramitsu M., Inoue T., Katagiri T., Murai A., Horio F. 2011. Coffee and caffeine improve insulin sensitivity and glucose tolerance in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 75, 2309-2315.

McCarty M.F. 2005. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. Medical hypotheses, 64, 848-853.

Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free radical biology & medicine, 17, 235-248.

Misra H.P., Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. The Journal of biological chemistry, 247, 3170-3175.

Mnatsakanyan M., Stevenson P.G., Conlan X.A., Francis P.S., Goodie T.A., McDermott G.P., Barnett N.W., Shalliker R.A. 2010. The analysis of cafe espresso using two-dimensional reversed phase-reversed phase high performance liquid chromatography with UV-absorbance and chemiluminescence detection. Talanta, 82, 1358-1363.

Monteiro M., Farah A., Perrone D., Trugo L.C., Donangelo C. 2007. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. The Journal of nutrition, 137, 2196-2201.

Moussa S.A. 2008. Oxidative stress in Diabetes Mellitus. Romanian Journal Biophysics, 18, 225-236.

Muriel P., Arauz J. 2010. Coffee and liver diseases. Fitoterapia, 81, 297-305.

Murugan P., Pari L. 2006. Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life sciences, 79, 1720-1728.

Natella F., Nardini M., Giannetti I., Dattilo C., Scaccini C. 2002. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. Journal of agricultural and food chemistry, 50, 6211-6216.

Nelson D.P., Kiesow L.A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H 2 O 2 solutions in the UV). Analytical biochemistry, 49, 474-478.

Olthof M.R., Hollman P.C.,. Zock P.L, Katan M.B. 2001. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. The American journal of clinical nutrition, 73, 532-538.

Prasanthi J.R., Dasari B., Marwarha G., Larson T., Chen X., Geiger J.D., Ghribi O. 2010. Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. Free radical biology & medicine, 49, 1212-1220.

Ravi K., Ramachandran B., Subramanian S. 2004. Protective effect of Eugenia jambolana seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. Biological & pharmaceutical bulletin, 27, 1212-1217.

Reddi A.S., Bollineni J.S. 1997. Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. Biochemical and biophysical research communications, 235, 598-601.

Sadi G., Yilmaz O., Guray T. 2008. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. Molecular and cellular biochemistry, 309, 109-116.

Sassa S. 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme, 28, 133-145.

Sassa S. 1998. ALAD porphyria. Seminars in liver disease, 18, 95-101.

Sato C.I., Izumi N. 1989. Mechanism of increased hepatotoxicity of acetaminophen by the simultaneous administration of caffeine in the rat. Journal Of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 248, 1243-1247.

Schmatz R., Perreira L.B., Stefanello N., Mazzanti C., Spanevello R., Gutierres J., Bagatini M., Martins C.C., Abdalla F.H., Daci da Silva Serres J., Zanini D., Vieira J.M., Cardoso A.M., Schetinger M.R., Morsch V.M. 2012. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Biochimie, 94, 374-383.

Schnedl W.J., Ferber S., Johnson J.H., Newgard C.B. 1994. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes, 43, 1326-1333.

Shahidi F., Chandrasekara A. 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. Phytochemical Reviews, 9, 147-170.

Tanaka Y., Shimizu H., Sato N., Mori M., Shimomura Y. 1995. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. Pharmacology, 50, 69-73.

Thong F.S., Graham T.E. 2002. Caffeine-induced impairment of glucose tolerance is abolished by beta-adrenergic receptor blockade in humans. Journal of Applied Physiology, 92, 2347-2352.

Varma S.D., Hegde K.R., Kovtun S. 2010. Oxidative stress in lens in vivo: inhibitory effect of caffeine. A preliminary report. Molecular vision, 16, 501-505.

Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes care, 27, 1047-1053.

Wu K.K., Huan Y. 2008. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. Current Protocols in Pharmacology, Chapter 5:Unit 5 47.

Yamauchi R., Kobayashi M., Matsuda Y., Ojika M., Shigeoka S., Yamamoto Y., Tou Y., Inoue T., Katagiri T., Murai A., Horio F. 2010. Coffee and caffeine ameliorate hyperglycemia, fatty liver, and inflammatory adipocytokine expression in spontaneously diabetic KK-Ay mice. Journal of agricultural and food chemistry, 58, 5597-5603.

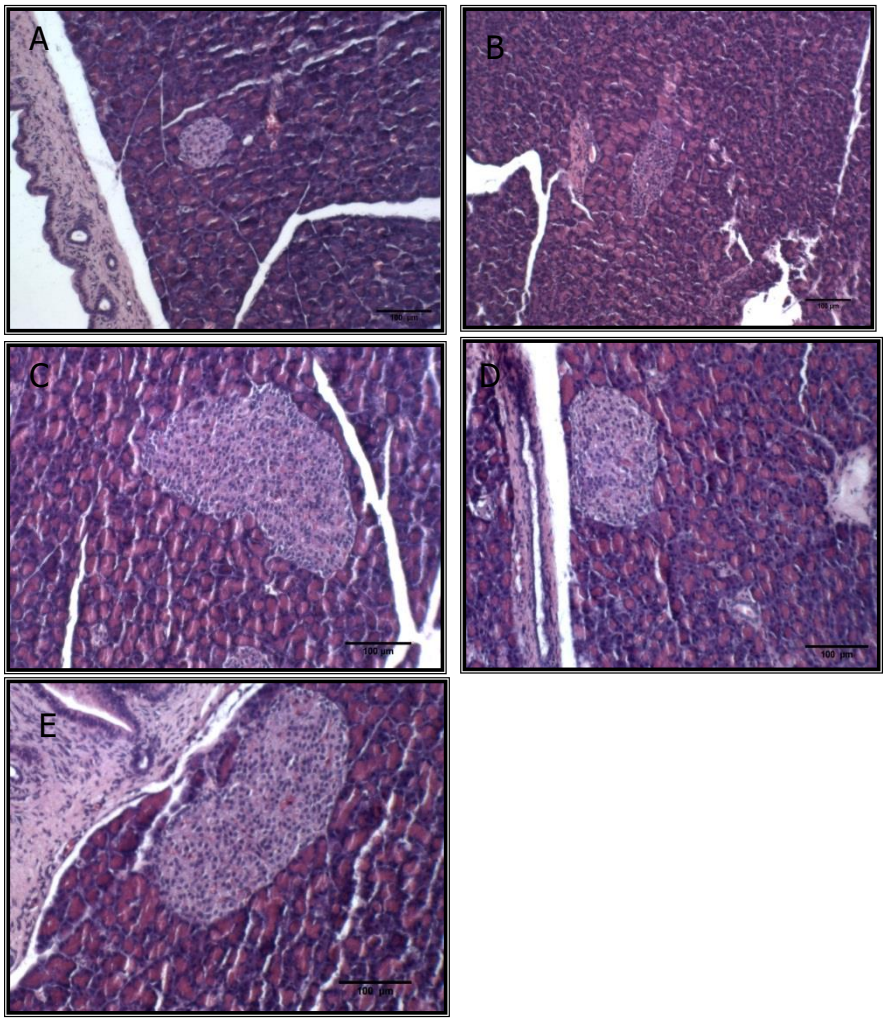


Figure 1

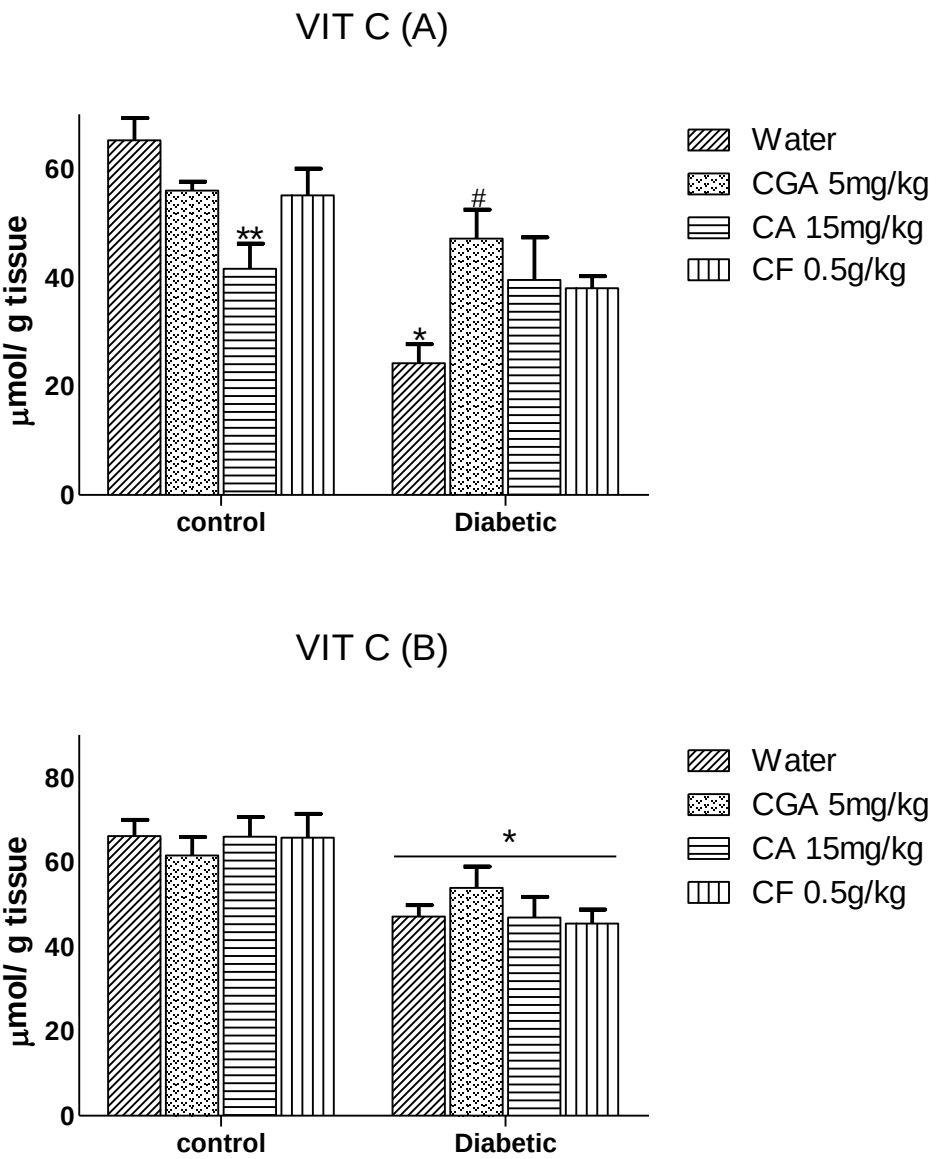
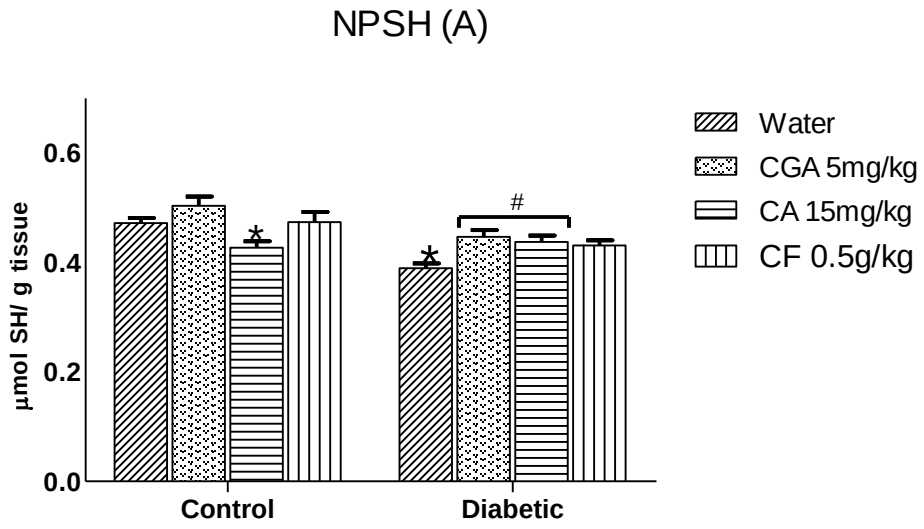

VIT C (A)
µmol/ g tissue
0
20
40
60
control
Diabetic
**
*
#
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg
VIT C (B)
µmol/ g tissue
0
20
40
60
80
control
Diabetic
*
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

Figure 2


NPSH (A)
µmol SH/ g tissue
0.0
0.2
0.4
0.6
Control
Diabetic
*
*
#
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

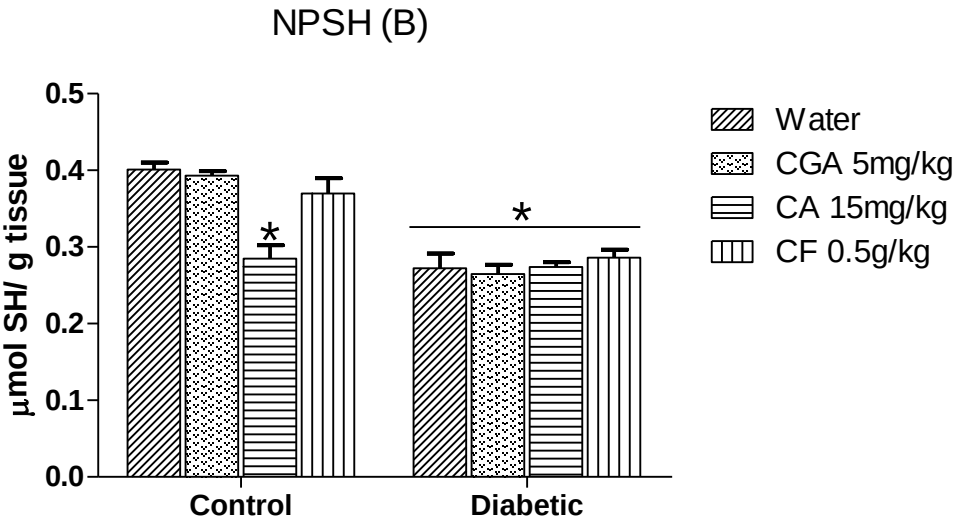
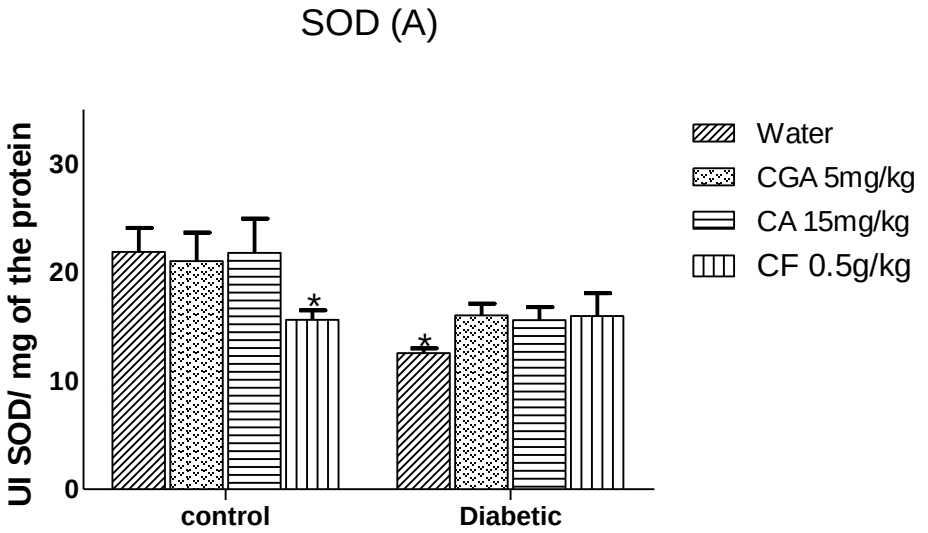

NPSH (B)
µmol SH/ g tissue
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Control
Diabetic
*
*
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

Figure 3


SOD (A)
UI SOD/ mg of the protein
30
20
10
0
control
Diabetic
*
*
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

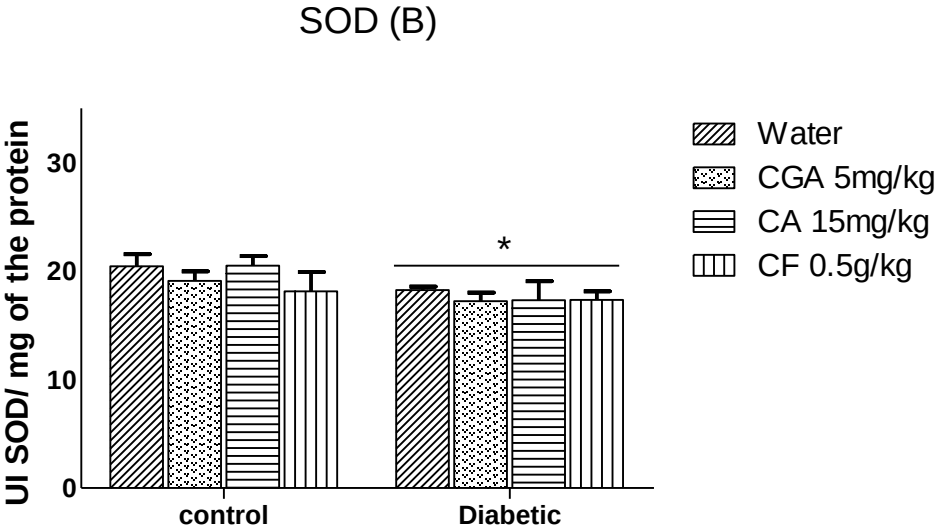
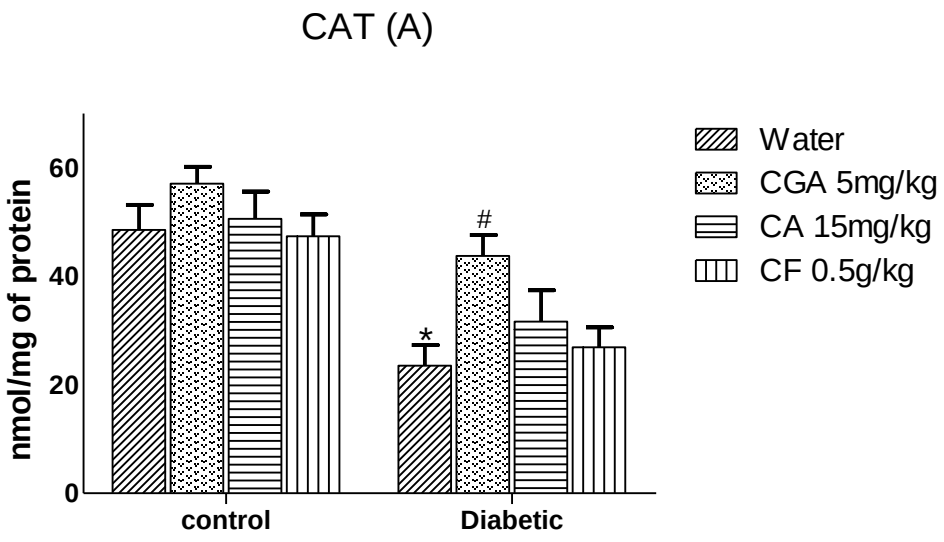

SOD (B)
UI SOD/ mg of the protein
30
20
10
0
control
Diabetic
*
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

Figure 4


CAT (A)
nmol/mg of protein
60
40
20
0
control
Diabetic
*
#
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

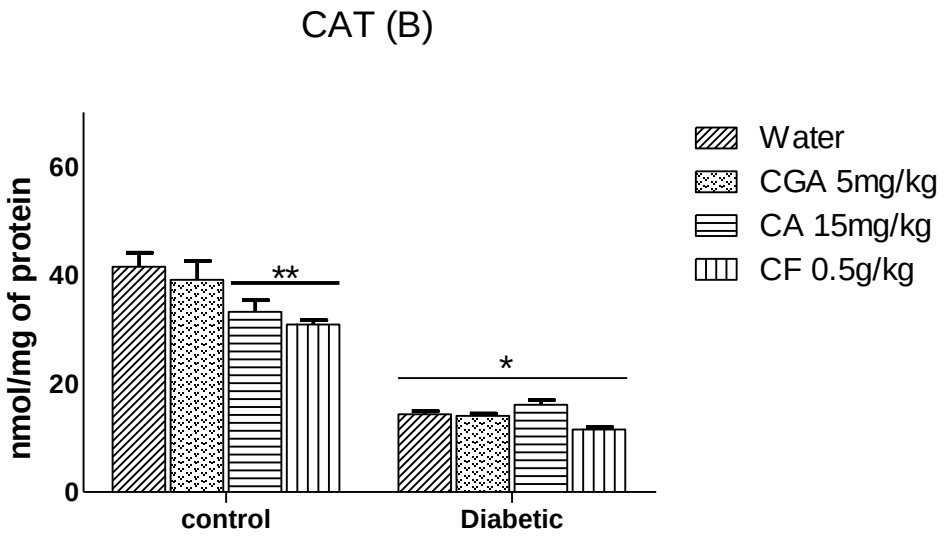
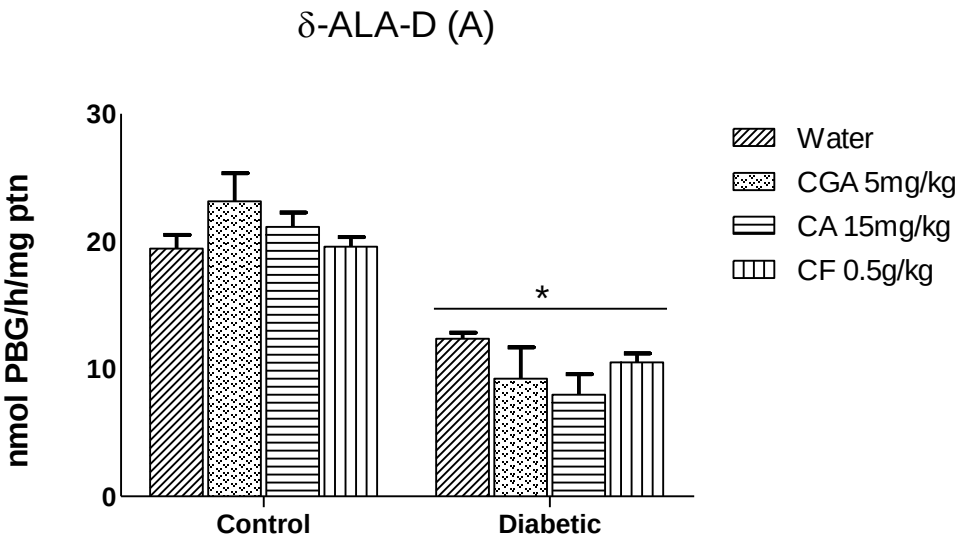

CAT (B)
nmol/mg of protein
60
40
20
0
control
Diabetic
**
*
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

Figure 5


δ-ALA-D (A)
nmol PBG/h/mg ptn
30
20
10
0
*
Control
Diabetic
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

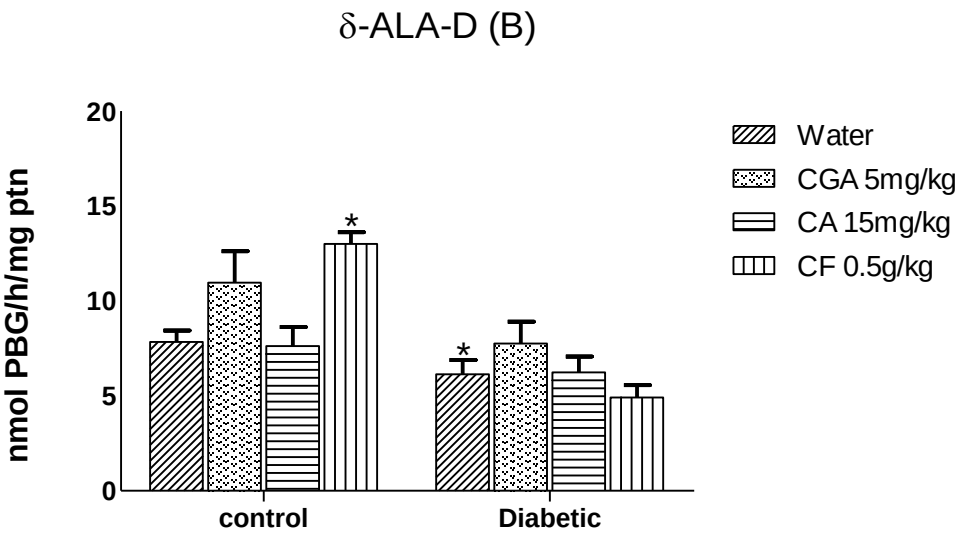

δ-ALA-D (B)
nmol PBG/h/mg ptn
20
15
10
5
0
*
*
control
Diabetic
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

Figure 6

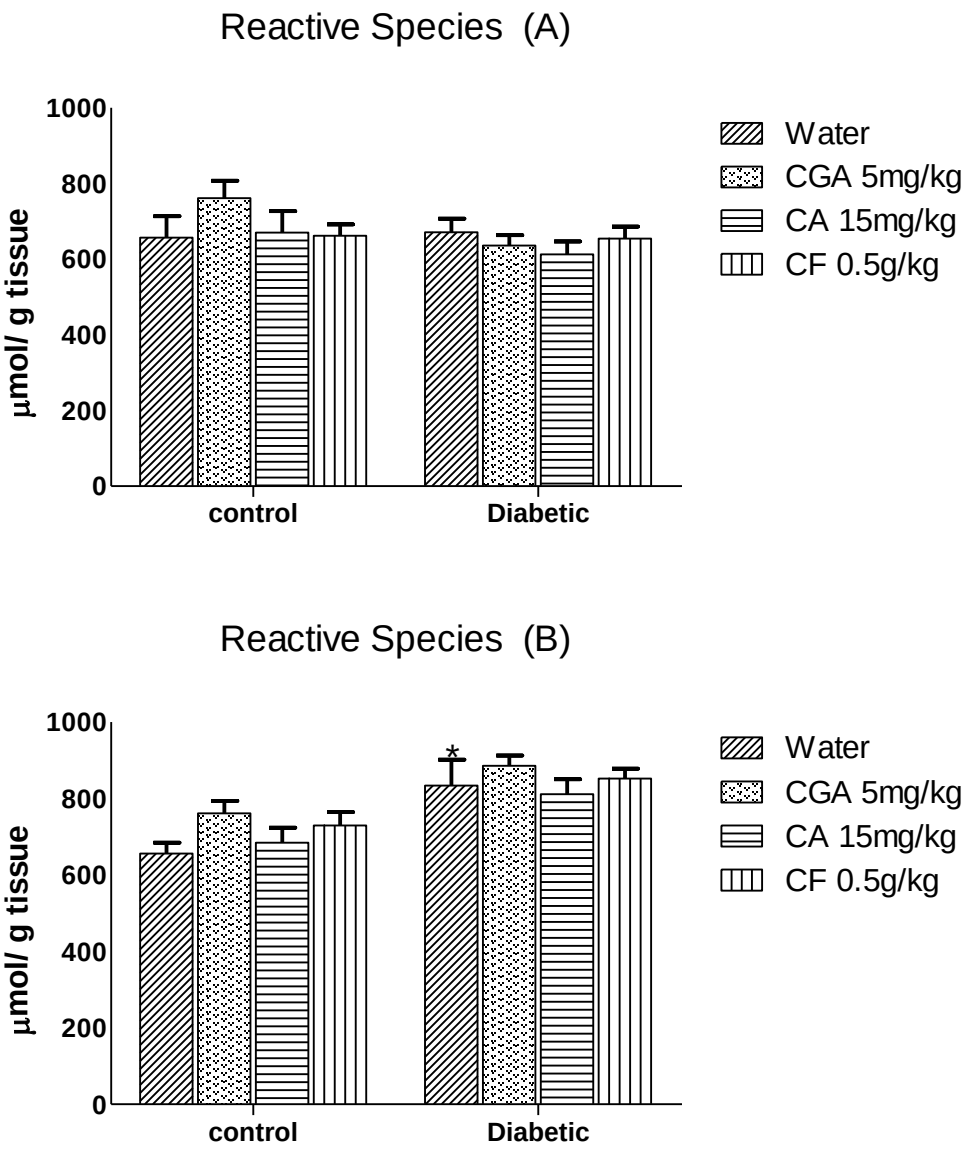

Reactive Species (A)
1000
800
600
400
200
0
µmol/ g tissue
control
Diabetic
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg
Reactive Species (B)
1000
800
600
400
200
0
µmol/ g tissue
*
control
Diabetic
Water
CGA 5mg/kg
CA 15mg/kg
CF 0.5g/kg

Figure 7

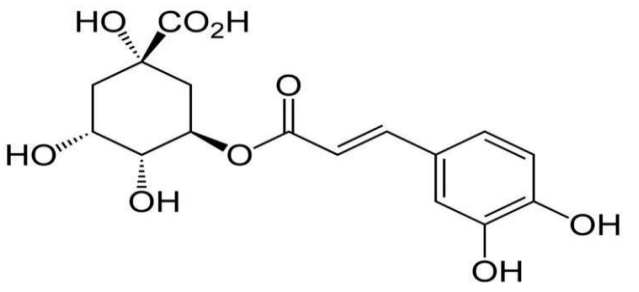


Figure 8

4.3.Artigo 3: Review em preparação

Título:

“Coffee, caffeine, chlorogenic acid and the purinergic system”

Dados sobre o Periódico:

Revista não escolhida ainda

Coffee, caffeine, chlorogenic acid and the purinergic system

Naiara Stefanello[1], Roselia Spanevello[2], Sabina Passamonti[3], Lisiane Porciúncula[4], Carla Denise Bonan[4], Ayodeji Augustine Olabiyi[1,5], João Batista Teixeira da Rocha[1], Vera Maria Morsch[1], Maria Rosa Chitolina Schetinger[1]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, UFSM, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

[2]Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção: Centro de Ciências Farmacêuticas, Químicas e de Alimentos, UFPel, Campus Capão do Leão 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

[3]Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli studi di Trieste, via L. Giorgieri 1, 34127, Trieste Italy

[4]Departamento de Bioquímica, UFRGS, 90040-060 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

[5]Department of Medical Biochemistry, Afe Babalola University, P.M.B 5454, Ado Ekiti. Nigeria.

Abstract

Coffee is a drink prepared from roasted coffee beans and it is lauded for aroma and flavor being the third most popular consumed beverages in the world. Caffeine (1,3,7 trymetylxantine) is derived from purine nucleotides and is present in both coffee, being considered an important bioactive compound. Thus, the main purpose of this review is to focus on the purinergic system and caffeine, coffee and chlorogenic acid. The subject was divided into the relationship between the actions of caffeine, coffee, chlorogenic acid and adenosine, and their effects in the ectonucleotidases activities. Studies evaluating the role of caffeine and chlorogenic acid in the modulation of nucleotide levels in several conditions, such as brain development, ageing, and neurodegenerative diseases could contribute for a better understanding of the effects induced by this xanthine and coffee derived compounds.

Key words: coffee; caffeine; chlorogenic acid; purinergic system; nucleotidases; central nervous system.

1. Introduction

Coffee was discovered about 2000 years ago in the Ethiopia and probably the Ethiopians were the first to recognize the coffee energizing effects. Coffee drinking is used for social engagement, leisure, enhancement of work performance and well-being. Normally, the type of coffee beverage is strictly associated with the social habits and culture of individual countries [1]. Due to great social and cultural importance, it has been studied for a long time, and some compounds have been isolated, i.e, caffeine – an alkaloid- was discovered in tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) in the 1820s [2] and chlorogenic acid – a phenolic compound - was isolated from coffee by Gorter in 1908 [3]. Other compounds found into the coffee that shows biological activities include: cafestol, kahweol and trigonelline [4]. All these compounds can affect the biological system in the body. Consequently, they can be useful in the treatment of certain illness such as diabetes mellitus, cardiovascular and Alzheimer disease [5, 6].

The purinergic system is an important regulatory pathway of different tissues, including vascular and central nervous system, pancreas and bones. This system is formed by the nucleosides and nucleotides, enzymes and receptors that bind these molecules. Purinergic signalling is involved in physiology and pathophysiology conditions and alterations in this system may be involve in insulin resistance, vascular injury, platelets aggregation, inflammation, and cognition [7, 8].

Studies published in the last years have shown the involvement between natural compounds and the purinergic system. Some compound as anthocyanins, caffeic acid, resveratrol, quercetin, caffeine and chlorogenic acid as well as red wine, grape juice, coffee and regulate the purinergic system components [5, 9-14] In this Review, we provide a background on coffee, caffeine and chlorogenic acid effects and their role in purinergic system associated with pathophysiological mechanisms in different illnesses.

2. Coffee chemical composition

This beverage composition include lipids, carbohydrates, alkaloids, phenolic compounds and minerals such as magnesium, potassium, copper, calcium, aluminium and phosphorus [15-17]

The major lipid classes in coffee beans have been related to triacylglicerols, terpene esters and sitosterol [18], while carbohydrates such as sacarose, galactose,

glucose and fructose and the phenolic acids are the main components that contribute to the formation of pigments, taste and flavor during roasting coffee [19]. Roasting coffee and green beans coffee contain some differences in their composition, because the roasting process decreases a large amount of phenolic acids. In addition to phenolic compound, sucrose, protein and trigonelline also decrease their composition with roasting [20]. Depending on the roasting process, coffee beverages preparation results in a great diversity in the chemical composition of the final product, which could account for differences in the biological activities of coffee brews [21].

The biological activities of coffee are attributed mainly to terpenes, alkaloids and phenolic compounds (Figure 1). The most known terpenes are cafestol and kahweol that naturally occur as diterpenes; both are present in the unsaponifiable lipid fraction. The concentration of these diterpenes is influenced by the brewing method. Boiled coffee, such as Scandinavian-style and Turkish-style, contains the highest concentrations, while instant, drip-filtered, and percolated coffees contain negligible amounts of these compounds [22].

Coffee beans also contain mainly two types of alkaloids, caffeine and trigonelline, as major components. Caffeine (1,3,7 trymetylxantine) is present in a class of the compound called methylxanthine. Other methylxanthines are also showed in this group, such as: theobromine, paraxanthine, theophylline and others. Caffeine is synthetized from xanthosine derived from purine nucleotides and is present in both coffee and tea, while trigonelline is found in coffee only [23]. The caffeine is synthetized in the plants because it has a protective effect in soft tissue against predators and may be release in the soil to inhibit the germination of others seeds [2, 24]. Waldhauser and Baumann showed that caffeine can be found as complex with polyphenols. In the coffee beans caffeine/chlorogenic acid complex could be is easily to see well-described crystalline caffeine potassium chlorogenate 1:1complex, which is formed due to physico-chemical proprieties[25].

Classically, chlorogenic acids (CGA) are a family of esters formed between certain trans-cinnamic acids and quinic acid. The most common is 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA). It is present in major quantities in almost all foods and beverages where is possible to found CGA family compounds. Furthermore, due to identity, number and position of the acyl residues, CGAs may be subclassified in other compounds: 1) monoesters of caffeic acid, which include caffeoylquinic acids (CQA), *p*-coumaroylquinic acids (*p*CoQA) and feruloylquinic acids (FQA). 2) diesters and

triesters that include diCQA and triCQA. 3) mixed diesters between caffeic and ferrulic acid, i.e. caffeoylferuloylquinic acids (CFQA), found mainly in robusta coffee [26, 27]. The roasting process promotes a significant reduction of CGA concentration. Duarte and collegues (2005) demonstrated that considerable change in the CGA composition occurred in both coffee samples after the roasting process and this fact may contributed to decrease in the antioxidant activity. In other words, light roasted coffees show higher CGA concentrations that dark roasted coffees.

3. Caffeine and chlorogenic acid metabolism

3.1Caffeine metabolism

Caffeine absorption from the gastrointestinal tract is complete, rapid and reaches 99% in humans about 45 min after its ingestion. Also in humans, the peak plasma of caffeine concentration is reached between 15–120 min after oral ingestion. Its distribution throughout the total body water, its low plasma protein binding, its complete biotransformation in the liver and its renal excretion is negligible. The caffeine half-life is reduced in smokers, increased in women taking oral contraceptives and during the last trimester of pregnancy [28].

First, caffeine undergoes three oxidative N-demethylations to form 1,7-dimethylxanthine or paraxanthine. The paraxanthine is further metabolized by three reactions; 1) by cytochrome P4502A6 (CYP2A6) to form 1,7-dimethylurate, 2) by cytochrome P4501A2 (CYP1A2) to form 1-methylxanthine and, 3) the formation of the 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil, which is catalyzed by N-acetyltransferase. 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil is an unstable product that may be deformylated nonenzymatically to 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil. 1,7-dimethylurate is mainly metabolized by the polymorphic enzyme CYP2A6 (90%) and about 10% is metabolized by CYP1A2. Part of 1-methylxanthine is metabolized to 1-methylurate by xanthine oxidase [29].

The CYP1A2 genetic expression may influence the caffeine metabolization. Buters and co-workers (1996) investigated the involvement of CYP1A2 in the pharmacokinetics and metabolism of caffeine using mice lacking its expression (CYP1A2-/-) and they concluded that the half-life of caffeine elimination from blood was seven times longer in the CYP1A2 -/- than in the wild-type mice [30].

It is important to note that caffeine and its metabolites are found in many tissues of the body due to its high liposolubility, i.e., lung, adipose tissue, liver, kidney and

brain. It crosses the blood brain barrier due to simple diffusion and affects the activity of the central nervous system (CNS) [31]. Kaplan and co-workers (1988) described that there was a linear relationship between caffeine and its metabolites in brain and plasma concentrations [32]. In all these organs, caffeine can reach out and exert its effects as an A2A receptor antagonist [33].

3.2 Chlorogenic acid metabolism

Monteiro and co-workers (2007) suggested that an early absorption of chlorogenic acid occurs in the stomach or in the initial intestinal portion, followed by an absorption throughout the small intestine [34]. In addition, Olthof et al. (2001; 2003) suggested that the uptake of chlorogenic acid is achieved in two ways: 1) around of 33% may be absorved in the small intestine, since small concentrations of intact chlorogenic acid (0.3%) were found in urine and, 2) chlorogenic acid could be hydrolysed by bacteria in the colon and then the products of its degradation could be absorbed [35, 36]. Corroborating with this study, Stalmach et al. (2010) showed that 24 h post-ingestion of the 200 mL of coffee with 385 ± 4 μmol of the chlorogenic acid revealed the presence of 274 ± 28 μmol of chlorogenic acid and its metabolites in the ileal fluid of the ileostomy patients, indicating that 30% is absorbed in the small intestine. It was observed that people with a functioning colon, 70% of the ingested chlorogenic acid pass from the small to the large intestine where they will be metabolized by the colonic microflora [37].

Studies demonstrate that all major compounds in coffee are bioavailable for humans [34, 38]. 5-O-caffeoylquinic acid, the major CGA in coffee brew represents 40% of total hydroxycinnamates identified in plasma 4 h after ingested [34]. Manach (2004) showed that the polyphenols are able to penetrate the tissues. *In vitro* studies also show that dietary flavonoids can penetrate through the blood-brain barrier [39, 40]. Many of these components described above are biologically active and could contribute to the effects associated with the coffee consumption.

4. Physiological and biochemical actions of coffee, caffeine and chlorogenic acid

Epidemiological and experimental studies support the idea that consumption of regular coffee drinking has health benefits. The relationship between coffee and diseases holds great interest, given a large array of the compounds found in the

beverage that could potentially alter risks of degenerative, progressive and chronic diseases through many biological actions [41-43]

4.1 Coffee and metabolic effects

Studies have demonstrated that consumption of two or more cups of coffee per day has been associated with a substantially lower risk of type 2 diabetes [44-46]. In addition, higher risk of type 2 diabetes can be found due to coffee consumption associated with lifestyle habits, i.e., cigarette smoking, lower physical activity, obesity and alcohol consumption [47, 48]. Furthermore, the inverse association has been similar for both caffeinated and decaffeinated coffee as concluded by Dam et al. (2006) in a prospective cohort study in younger and middle aged women. These observations suggest that coffee components other than caffeine also may affect the development of type 2 diabetes. In fact, coffee has some substances, chlorogenic acid, quinic acid, trigonelline, and the lignan secoisolariciresinol that can interfere with glucose metabolism [49].

Johnston et al. (2003) found that both decaffeinated and caffeinated coffee drink modulated glucose uptake, being chlorogenic acid responsible for blocking the glucose transport in the intestine [50]. In an experimental study using diabetic rats the treatment with 250 mg/kg of caffeine for 5 weeks decreased blood glucose, triglycerides and, total cholesterol levels in serum [51]. In addition, 1g of chlorogenic acid and 500 mg of trigonelline also were able to reduce the early glucose and insulin responses during the glucose tolerance test in overweight men [52].

Similarly, type 1 diabetic rats treated with chlorogenic acid (5 mg/kg) for 45 days showed reduction in the plasma glucose levels. A reduction in TBARS and hydroperoxides levels as well as an increase in the antioxidant enzyme activities fromliver and kidney was observed in diabetic rats treated with 5 mg/kg chlorogenic acid [53]. The chlorogenic acid also has beneficial effects by inhibiting the enzyme glucose-6-phosphatase, which is responsible for the dephosphorylation of glucose-6-phosphate to glucose and, with the interference on the glucose absorption in the intestine of rats [54, 55]. Taken together, these findings are consistent with the hypothesis that this compound play a role in the homeostatic regulation of glucose levels contributing for the potential effects of coffee in the diabetic status.

4.2 Coffee and cardiovascular effects

The relationship between coffee ingestion and cardiovascular disease also has been documented in the literature [45, 56]. Tofer et al. (2001) suggested that people

could have an increased risk to myocardial infarction or unstable angine when drinking more that five cups of coffee *per day* [57]. Similar findings were described in another study with 375 subjects where consumption of filtered coffee was positively associated with the risk of myocardial infarction in men [58]. On the other hand, Andersen et al. (2006) concluded that intake of 1-3 cups of coffee *per day* has a protective effect on the total death and death from cardiovascular and other inflammatory diseases in a group of postmenopausal women [59]. In addition, consumption of filtered caffeinated coffee also was not associated with cardiovascular disease in women in a study [60].

Although the results obtained of the association between coffee and cardiovascular diseases are controversial and uncertain, experimental studies have described that coffee and caffeine can induce many effects in the vascular system [61]. For example, administration of coffee has preventive effect on arterial occlusive thrombus formation [62] and inhibits the platelet aggregation [63]. In contrast, caffeinated coffee intake increased the systolic and diastolic blood pressure and decreased brachial artery flow mediated dilatation in healthy subjects and, studies suggesting that coffee exerts unfavorable effect on the endothelial function. These findings suggest that decaffeinated coffee is not associated with changes in the endothelial function [64, 65].

Confirming this hypothesis, Cavalcante and co-workers (2000) showed that 70 mg/kg of caffeine for seven days increases the diastolic blood pressure [66]. Similar results were obtained by Temple et al. (2010) where acute caffeine administration in adolescents at amount of 50, 100 and 200 mg decreased the heart rate and also elevated the diastolic blood pressure in a dose dependent manner [67]. However, other findings reported that caffeine increased endothelium dependent vasodilation [68] and leads to upregulation of A_2 receptors on the platelet surface reducing its aggregation [69]. In addition, we observed that type 1 diabetic rats treated with caffeine (15 mg/kg) did not decrease platelet aggregation when using ADP 5 and 10 uM as agonist (unpublished data). The effects of coffee on the cardiovascular system are not clear. However, it is important to consider that different effects depend on the type, amount of coffee ingested and the time and frequency of consumption [70, 71].

4.3 Coffee and neurological effects

Many actions of coffee in the central nervous system have been attributed to the caffeine presence. It is well established that caffeine has stimulating effects in brain resulting in heightened alertness and arousal. This compound also improves

performance on cognitive tasks and modulated the antioxidant parameters in brain from young rats [72, 73]. A study with non-smoking women demonstrated that caffeine intake was associated with a larger hippocampus [74].

Caffeine is well known as a specific antagonist of adenosine receptors and has been demonstrated neuroprotective effects in many experimental conditions. Caffeine and its metabolites attenuate 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced striatal dopaminergic toxicity, in other words protecting the neurons in a model of Parkinson´s disease in mice [75]. In addition, caffeine decreased the inflammation and upregulated A_1 receptors in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis [76]. Moderate caffeine administration protects cognitive function and suppresses brain amyloid-β production in Alzheimer's disease transgenic mice [77] and during experimental cerebral ischemia [78]. Finally, an inverse association between consumption of caffeinated beverages, including coffee and tea and the risk of glioma development in humans was observed [74, 79].

Apart from the effect of caffeine, other coffee compounds such as chlorogenic acid may also alter the neural function. Previous studies in the animal models showed that chlorogenic acid improved the impairment of memory on scopolamine-induced amnesia [80]; stimulated neurite extension [81]; affects the locomotor activity in mice [82] and have anxiolytic and antioxidant effects in Swiss mice [83]. These observations raised questions about actions of coffee components as promising candidates for the treatment of neurodegenerative diseases (Figure 2).

Moreover, chlorogenic acid and caffeine may protect cells from the damage caused by hyperglycemia in the streptozotocin (60 mg/kg)-induced diabetes in rats. In this context, Stefanello and colleagues (2014) demonstrated that caffeine (15 mg/kg) reverted an increase in acetylcholinesterase (AChE) activity and restored partially delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ-ALA-D) and Na+, K+-ATPase activities in type 1 diabetic rats. Furthermore, caffeine consumption (1 g/L) for 7 months had a potential neuroprotective effect preventing synaptic dysfunction and astrogliosis as well as memory impairment in type 2 diabetes mice [14]. In addition, Chlorogenic acid (5 mg/kg) treatment for 30 days protected brain alterations, such as: prevented the increase in the AChE activity; restored partially δ-ALA-D and Na^+,K^+-ATPase activities; prevented lipid peroxidation; improved the memory and decreased the anxiety-like behavioral in rats [6].

4.4 Coffee, caffeine and oxidative stress

Some, *in vitro* and experimental researches, describe the antioxidant actions of caffeine. An *in vitro* study with liver microsomes, caffeine at millimolar concentrations showed a potent antioxidant action by preventing lipid peroxidation induced by reactive oxygen species: peroxyl radical (ROO·), the hydroxyl radical (·OH) and singlet oxygen ($^1O_2$) [84]. Caffeine was able to inhibit lipid peroxidation more than ascorbic acid as well as decrease the radical peroxyl generation through imidazole ring, which may be necessary to maintain the antioxidant ability. In addition, the higher antioxidant activity is performed by caffeine metabolites especially those that have one methylated imidazole ring, as in 1-methylxanthine and 1-methyluric acid [85]. Moreover, some studies using chronic caffeine administration have also suggested its potential role in increasing antioxidant enzymes activities in liver and heart [86, 87].

Additionally, the chronic administration of caffeine also acts as neuroprotective in experimental models of neurodegenerative diseases such as Alzheimer´s and Parkinson´s disease [88-90]. Besides, chronic administration of caffeine is also able to prevent age-cognitive decline in rodents submitted to a wide range of behavioral analysis for evaluating learning and memory [91, 92]. However, in these studies aforementioned antioxidant properties of caffeine *per se* were not investigated. Recently, it was demonstrated that caffeine treatment (30 mg/kg) during 10 days was able to restore oxygen and nitrogen reactive species brain levels increased with aging (Figure 3). However, brain levels of ascorbic acid that decrease with aging were not modified by caffeine administration [93]. In another study, rats submitted to the model of tardive dyskinesia by haloperidol presented increase on lipid peroxidation and decrease on the reduced glutathione levels, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity in cortical and subcortical areas as well as in the striatum. All these alterations were prevented by concomitant administration of caffeine (30 and 60 mg/kg) and adenosine (50 and 100 mg/kg) during 21 days. However, none of these parameters was modified by caffeine and adenosine administration alone [94].

In another study, rabbits fed with a high-cholesterol diet exhibited cerebral Aβ plaques and increase on oxidative stress parameters, which is considering as a model system for sporadic Alzheimer´s disease (AD). However, treatment with caffeine (0.5 and 30 mg/kg) reduced the cholesterol-induced increase in Aβ plaques, phosphorylated tau, and oxidative stress levels and reversed the cholesterol-induced decrease in A_1R levels. However, the effects of caffeine *per se* were not investigated in these parameters [95].

Adult rats that received caffeine (0.3 g/L or 1 g/L) for 40 days during restraint stress protocol were analyzed for lipid peroxide levels, total radical-trapping potential and antioxidant enzyme activities (SOD, glutathione peroxidase and CAT) in hippocampus, striatum and cerebral cortex [96]. Apart from prevention of oxidative stress by caffeine in rats submitted to the stress protocol, caffeine (1 g/L) alone increased activity of cortical CAT and SOD. These are few studies that found modifications in endogenous antioxidants by administration of caffeine alone [97].

In experimental models of Parkinson´s disease by exposure of differentiated cell lineages that are enriched in dopaminergic neurons to 6-hydroxidopamine (6-OHDA), caffeine was also able to prevent neuronal death as well as oxidative stress [98]. However, none of the oxidative stress parameters evaluated were modified by caffeine *per se*. Although caffeine *per se* possessed antioxidant properties *in vitro* [84], the vast majority of studies have reported antioxidant effects of caffeine only in situations where some event triggered oxidative stress. The dose and schedule of administration (acute, subchronic and chronic) could be responsible for these discrepancies between studies. It seems clear that the beneficial/neuroprotective properties of caffeine may involve antioxidant effects.

In this way, the coffee also has been accepted as a rich source of compounds that possesses antioxidant and radical scavenging properties [99, 100]. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans [99], increase the glutathione levels [101] and reduced salivary cortisol levels during the third trimester of pregnancy suggesting that coffee intake decreases maternal stress during pregnancy (Figure 3) [100].

Coffee also was capable to protect the liver damage induced by the high fat diet in rats by decreasing the levels of oxidized glutathione, malondialdehyde and cytokines related to inflammation [102]. Epidemiologic findings related that coffee intake was able to alters expression of several genes related to inflammation, insulin signaling, and obesity [103]. On the other hand, there is a relationship between moderate and/or high coffee consumption and increased inflammation process [104, 105].

In a study with healthy volunteers, the daily ingestion of 750 mL of freshly brewed coffee reduced oxidative DNA damage and elevated the glutathione level and glutathione reductase activity [101]. Similar results were obtained by Bichler et al. (2007) that demonstrated coffee consumption reduced DNA damage caused by reactive oxygen radicals and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3b]indole acetate.

Ingestion of 800 mL by five days also prevented the endogenous formation of oxidative DNA damage in lymphocytes. However, oxidative parameters such as malondialdeyde, total antioxidant levels in plasma and the activities of the enzymes SOD and glutathione peroxidase (GPX) were not altered [106]. Mursu et al. (2005) also demonstrated that consumption of coffee did not have any detectable short or long term effect on different measurements of lipid peroxidation or in the activity of antioxidant enzymes in healthy men [107].

Although the results about the redox status and coffee ingestion are controversial, other compounds that is not the caffeine might contribute to coffee antioxidant capacity. It has been demonstrated that kahweol and cafestol also reduced significantly the cytotoxicity, lipid peroxidation, reactive species production and DNA damage induced by H_2O_2 in NIH3T3 cells [108]. Chlorogenic acid and caffeic acid have hydroxyl groups on an aromatic residue and exhibit antioxidant activities [109, 110]. The properties of chlorogenic acid can be mainly attributed to the chelate structure formed with iron. It is known that chlorogenic acid may prevent the formation of the hydroxyl radical by forming a chelate with iron whose complex cannot catalyze the Fenton reaction (Figure 4) [109].

5. Impact coffee, caffeine and chlorogenic acid in purinergic signaling

5.1 Purinergic System

Adenosine as a neuromodulator

The term neuromodulation was initially defined in a more restricted way, as the ability of neurons to alter their electrical properties in response to intracellular changes resulting from synaptic or hormonal stimulation. It requires an endogenous substance that once released from the pre or post-synaptic sites ability to modify the release or action of the neurotransmitter. Over the past years, this concept has changed mainly with the advances in our knowledge on the role of glial cells in the functioning of synapses. The tripartite synapse is a structure that the astrocytes make contact with synapses on the neuronal side in several regions of brain [111, 112]. The participation of the astrocytes in the synaptic transmission as active players was reinforced by studies showing the presence of synaptic vesicles and a wide range of substances that can be released from these cells [113].

The presence and release of adenosine from almost all eukaryotic cells as well as the broad expression and distribution of its receptors throughout the brain places this nucleotide as an important neuromodulator in the central nervous system.

Adenosine does not belong to the class of neurotransmitters since it is not stored and released from synaptic vesicles. Otherwise, adenosine is generated by intracellular metabolism of AMP and transported to the extracellular medium by bi-directional facilitated diffusion transporters. In the extracellular medium adenosine can also be formed from the synaptic release of ATP, which is converted into adenosine by the sequential action of ectonucleotidases [114]. Recent findings indicate that synaptic levels of adenosine are largely regulated by astrocytes [115, 116]. Under physiological conditions, the major source of synaptic adenosine has been shown to be derived from astrocytic vesicular release of ATP, followed by extracellular degradation to adenosine via a cascade of ectonucleotidases. The authors demonstrated a reduction of the tonic suppression of neuronal networks in transgenic mice with a defective astrocytic vesicular release system for ATP [117].

The first evidence of the inhibitory action of adenosine was described in experiments using neuromuscular junction. This study sought to evaluate the effect of cyclic AMP on neurotransmitter release and adenosine was simply used to increase cyclic AMP in the CNS. However, adenosine surprisingly inhibited the transmitter release and theophylline, which was used as an inhibitor of phosphodiesterase, preventing it [118]. The concept was reinforced with further experiments that found the release of ATP together with acetylcholine [119] and its was similar to adenosine [120, 121]. This effect was soon understood because a cascade of ectoenzymes degrades ATP into adenosine [114], being a source of extracellular adenosine at the synaptic cleft [122].

Adenosine receptors

Adenosine mediates its actions through activation of specific cell-surface G-protein coupled receptors (GPCRs), for which four subtypes have been so far identified: A1R, A2AR, A2BR and A3R [123]. The first adenosine receptors cloned, A1R and A2AR, came from a library of orphan receptors from the dog thyroid [124, 125]; being also further cloned from rat and human [126, 127]. The A2BR was cloned from rat brain [128] whereas the fourth receptor, A3, was more unexpected [129]. Except for structural variability of A3Rs among mammals, adenosine receptors have been cloned from several mammalian and non-mammalian species and their expression seems to be well conserved among mammals. Adenosine receptors were divided into two broad groups: A1Rs and A3Rs that would negatively couple to

adenylate cyclase and A2ARs and A2BRs that would positively couple to adenylate cyclase.

The most abundant adenosine receptor in many regions is the inhibitory A1R which is functionally coupled to members of the pertussis-toxin-sensitive family of G proteins (Gi1, Gi2, Gi3 and Go) and whose activation regulates the activity of membrane and intracellular proteins such as adenylate cyclase, Ca^{2+} channels, K^{+} channels and phospholipase C [130]. The general distribution of A1Rs is similar between rodents and humans [131-133]. The A1 receptor (A1R) is distributed throughout brain with highest expression in neurons of hippocampus, cerebellum, cortex and striatum [127, 134]. The presence of A1Rs was also detected in other cell types in the brain such as astrocytes [135], microglia [136] and oligodendrocytes [137].

The expression of A2AR receptors (mRNA) is predominantly found in the striatum being selectively expressed in the encephalin-containing striatopallidal neurons [133, 138, 139]. Lower levels are also found in extrastriatal areas, such as lateral septum, cerebellum, cortex, and hippocampus [140, 141]. In fact, a discrete expression of A2ARs can also be found in neurons from the neocortex and limbic cortex [142, 143]. Besides neurons, A2AR were found in astrocytes [135], microglia [136, 144], and blood vessels throughout the brain [145].

Due to their lower availability in the brain, the role of A2BRs and A3Rs has received considerably less attention. Thus, the role of adenosine in the brain is currently mediated by a controlled activation of A1 and A2A receptors. Both were firstly defined in the 1970s from the ability of methylxanthines such as theophylline and caffeine to act as antagonists [146].

5.1.1 Ectonucleotidases

Extracellular nucleotide and nucleoside adenosine levels in the synaptic cleft are controlled by a refined cascade of cell surface-localized enzymes collectively known as ectonucleotidases. These enzymes hydrolyze nucleoside triphosphates, diphosphates, and monophosphates to their respective nucleosides. There are four major families of ectonucleotidases: ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterases (E-NPPs), alkaline phosphatases, and ecto-5'-nucleotidase. The general characteristics of these enzymes are described briefly below.

E-NPPs

The E-NPP (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases) members represent a family of proteins, which possess broad substrate specificity capable of hydrolyzing pyrophosphate and phosphodiester bonds in (di) nucleotides, nucleic acids, nucleotide sugars, as well as in choline phosphate esters and lysophospholipids [147, 148]. The catabolism of extracellular dinucleotides that results in nucleosides may be considered as role of E-NPP. This enzyme can be related with recycling of these nucleosides, purinergic signaling and control of pyrophosphate levels. In addition, E-NPP may be responsibility for cell motility stimulation, bone calcification, insulin receptor and ecto-kinases regulation [147].

This enzyme is part of a protein family where three NPPs (NPP1-3) show significant sequence similarities at three-dimensional structure and they are encoded by seven distinct genes. NPP isoforms are type II transmembrane glycoproteins characterized by a large extracellular domain, intracellular N-terminal domain and a single transmembrane domain [149]. A catalytic domain, a cysteine-rich region, a putative C-terminal “EF-hand” motif and active site are part of extracellular domain [150]. NPP activity is characterized by a divalent cation dependence, strong alkaline pH optimum, inhibition by glycosaminoglycans, and K_M for p-Nph-5'-TMP hydrolysis in the micromolar range, as well as ATP, ADP, and AMP competitively inhibited p-Nph-5'-TMP hydrolysis [151].

NPP1 (plasma cell differentiation antigen-1, PC-1) is expressed in the capillaries of the brain [147] and in rat C6 glioma cells [152], whereas it is not detected in neurons or glia [147]. NPP2 (ATX, autocrine motility factor) and NPP3 ($gp130^{RB13-6}$, B10, phosphodiesterase 1β) are expressed in choroid-plexus epithelial cells [153] and likely contribute to the secretion of cerebral spinal fluid. Moreover, NPP2 can produce lysophosphatidic acid (LPA), an important molecule for cerebral maturation. Studies have shown the elevated expression of NPP3 in solid Walker 256 mammary tumor [154] and in immature astrocytes [147]. It was found that the maturation process could increase the NPP1 mRNA whereas age seems decrease the NPP3 mRNA. In the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, olfactory bulb, and striatum during development was found the mRNA NPP2 expression level Studies have demonstrated E-NPP activity (also named Thiamine pyrophosphatase; TPPase) is associated with the neurophil, particularly in the caudoputamen, hypothalamus, and the middle cerebral peduncle [155].

Alkaline Phosphatases

Alkaline phosphatases (APs) are non-specific phosphomonoesterases that contain three metal ions (two Zn and one Mg) in the catalytic site, which are required for enzyme activity [156]. Mammalian APs have higher specific activity and K_M values when compared to other species. They are optimal at more alkaline pH values (however, they can also hydrolyze ATP at pH 7.4), membrane-bound and inhibited by L-amino acids and peptides through an uncompetitive mechanism [156]. The APs degrade nucleosides 5'-tri, -di- and –monophosphates as well as release inorganic phosphate. In the mouse have been already identified five isoforms of APs [157]. These alkaline phosphatases help regulate extracellular ATP concentration and localized extracellular pH at the sites of bone reabsorption and mineralization by pH-dependent ATP hydrolysis coupled with P2Y-dependent regulation of osteoclast and osteoblast function [158].

Tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) is anchored through a glycosylphosphatidylinositol group in the plasma membrane [159]. Studies have demonstrated that the most prominent TNAP catalytic activity is associated with blood vessels, the choroid plexus, and the meninges [155]. It has also been demonstrated that TNAP is found in olfactory bulb, thalamus, cerebral cortex, medulla oblongata, hypothalamus, caudoputamen, colliculus and even in cerebellum [155]. Levamisole, a TNAP inhibitor, blocked the hydrolysis of ATP to adenosine in neuron-glia signaling through of A2A receptor [160], suggesting that TNAP is relevant in nucleotide-mediated signaling.

E-NTPDases

The protein family of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDase family) contains multiple members that differ in tissue distribution, cellular location and substrate specificity. They hydrolyze nucleoside 5'-triphosphates and nucleoside 5'-diphosphates with varying preference for the individual type of nucleotide.

All cell-surface members of E-NTPDase family are highly glycosylated proteins with molecular masses ~70–80 kDa, which show close immunological cross-reactivity and may exist either in monomeric or in higher homo-oligomeric (dimeric to tetrameric) states [161]. These enzymes contain two predicted transmembrane domains at the N-

and C-terminus with a large extracellular loop containing a more central hydrophobic region with five highly conserved sequence domains known as “apyrase conserved regions” (ACR), with two of them (ACR1 and ACR4) sharing common sequence homology with members of the actin/ HSP70/sugar kinase superfamily [162, 163].

E-NTPDases have an alkaline optimum pH and millimolar concentrations of either Ca^{2+} or Mg^{2+} can stimulate the catalytic activity of this enzyme family [114]. However, the literature relates a variety of physiological or pathological stimuli capable of modify the E-NTPDase activity. These stimuli are critical in mammalian central nervous system, and their responses frequently vary throughout development. Examples of events that evoke these modifications include seizures and epilepsy [164], hormonal alterations [165]; stress [166] and nociceptive response [167].

According to the current nomenclature, at least eight different members of the NTPDase family (NTPDases 1-8) have been discovered, cloned, and functionally characterized. Namely, eight different E-NTPDase genes encode members of the NTPDase protein family. Although these enzymes are integral membrane protein, their active sites are located in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi (NTPDases4-7), or to the plasma membrane (NTPDases1-3 and 8). NTPDase4 is localized to the Golgi apparatus (UDPase) (Wang and Guidotti, 1998) and to lysosomal/autophagic vacuoles (LALP70), respectively [168]. NTPDase5 and NTPDase6 are located to the endoplasmic reticulum or Golgi apparatus, but they can also be released in soluble form from transfected cells [169].

NTPDase1-3 and 8 possess similar amino acid sequences and membrane topology with two membrane spanning domains and catalytic sites facing the extracellular milieu [163, 170]. Since these enzymes vary regarding substrate preference and product pattern formation. NTPDase1 hydrolyses ATP and ADP equally well, while NTPDases3 and 8 prefer to hydrolyze ATP over ADP. NTPDase 2 has high hydrolyzing activity toward nucleoside triphosphates. UDP > GDP > CDP are the preference order of hydrolyzing activity by NTPDase4 and 5, while GDP > IDP > UDP are from NTPDase6. Nucleoside triphosphates are preferred by NTPDase7 (LALP1) once being located in intracellular vesicles [163].

The prototypic member of the E-NTPDase family (E-NTPDase1) has been sequenced and identified as a cell activation antigen CD39 [171]. After that, experiments with purified and cloned soluble apyrase (ATP-diphosphohydrolase) from potato tubers confirmed the significant homology of this enzyme to human CD39 [172].

Histochemical investigations demonstrated the hydrolysis of nucleoside tri- and diphosphates in all cell types of the nervous system [114, 155]. E-NTPDases1, 2 and 3 are expressed in the mammalian brain and mediate the termination of ATP signaling in the synaptic cleft [114, 141].

E-NTPDase1 is localized at the surface of endothelial vessels in the CNS and is strongly expressed in microglia [173]. E-NTPDase2 is associated with progenitor cells in the adult rodent brain [174] and is expressed in muscularised vessels [175], cultured astrocytes [176], non-myelating Schwann cells and other glial cells of the central and peripheral nervous system [163]. E-NTPDase3 is expressed in multiple brain regions and at the surface of PC12 cells, as the predominant ectonucleotidase [177]. Immunohistochemistry studies have revealed that this enzyme is strongly associated with axon-like neuronal structures in the brain, where it may act as a pre-synaptic regulator of extracellular ATP levels and coordinates multiple homeostatic systems, including feeding and sleep–wake behaviors [169].

Interestingly, the recently cloned E-NTPDase8 shares main functional properties with E-NTPDase3 rather than with E-NTPDase1 or E-NTPDase2. E-NTPDase8 expression is very low in the brain but it is expressed in the liver, kidney, and jejunum [178]. Expression of E-NTPDase8 in bile canaliculi and blood vessels of liver suggests the involvement of enzyme in the control of the nucleotide concentrations in hepatocytes, the regulation of bile secretion and/or nucleoside salvage [163, 179].

NTPDases can be altered by reactive oxygen species [180]. Ectonucleotidase activities in brain synaptosomes and platelets are altered in several pathological conditions, such as demyelination and hyperhomocysteinemia, and the antioxidant treatment modulates these changes and the altered oxidative stress parameters in these conditions [181, 182]. In addition, it has been shown an increased ATP and ADP hydrolysis in platelets from hypercholesterolemic patients, which was confirmed by an increase in CD39 expression on its surface. The increase in CD39 activity is correlated to an enhancement of oxidative stress parameters, suggesting a compensatory response to the inflammatory and pro-oxidative state associated with hypercholesterolemia [181, 183, 184].

Ecto-5’-nucleotidase

Ecto-5’-nucleotidase (lymphocyte surface protein CD73; E.C. 3.1.3.5) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored enzyme that catalyzes the hydrolysis of the phosphoric ester bond of 5’-ribonucleotides to the corresponding ribonucleoside and phosphate [145]. On the basis of primary sequence homology, ecto-5'-nucleotidase was found to be an orthologue of bacterial 5’-nucleotidases and to belong to a superfamily of metallophosphoesterases characterized by a binuclear metal center [185]. Seven human 5'-nucleotidases have been found, five 5'-nucleotidases were located in the cytosol, one attached to plasma membrane and the last one in the mitochondrial matrix [162]. The mammalian ecto-5'-nucleotidase show apparent molecular masses of 60–70 kDa with 548 amino acids. Membrane-bound 5'-nucleotidase form exist as a dimmer, while soluble form can exist as dimer or tetramer [145, 161]. The enzyme has a broad tissue distribution, with abundant expression in the kidney, brain, liver, colon, heart, lung, and human placenta [162, 186]. In the case of vasculature, ecto-5'-nucleotidase is predominantly associated with the vascular endothelium of large vessels such as the aorta, carotid and coronary artery [187]. Ecto-5’-nucleotidase may reveal a variety of different functions, depending on its cell and tissue expression. Like other surface-located enzymes, ecto-5'-nucleotidase has been implicated in non-enzymatic functions such as T-cell activation and cell-cell adhesion. However, the main function of ecto-5'-nucleotidase is the hydrolysis of a variety of nucleoside 5’- monophosphates such as AMP, CMP, UMP, IMP and GMP to their respective extracellular nucleosides [188]. AMP is the most successfully hydrolyzed nucleotide, since the K_m values are in the low micromolar range (50 μM). Thus, ecto-5’-nucleotidase plays an important role in the formation of adenosine from extracellular AMP and the subsequent activation of P1 adenosine receptors. In addition, this enzyme, together with other ectonucleotidases, terminates the activity of signaling nucleotides that act on P2X and P2Y receptors and, adenosine can bind in the P1 receptors.

Adenosine is an endogenous purine associated with an important modulatory role in neuronal activity and neuroprotective actions in pathological conditions [145]. Adenosine produced by ecto-5’-nucleotidase also plays a crucial role in cell survival and differentiation of neural cells [141]. Ecto-5'-nucleotidase is transiently active within synaptic clefts during development and regeneration [140, 155]. In addition, age-related alterations were also observed for ecto-5’-nucleotidase activity from CNS. For example, ecto-5'-nucleotidase activity was 5-fold higher in the hippocampus of aged

rats compared to young ones [140]. In addition, alterations were also observed for ecto-5’-nucleotidase activity from CNS in pathological and physiological situations, indicating the relevance of this enzyme for brain pathophysiology [93, 181, 189].

5.2 Caffeine effects on the purinergic system

Adenosine receptors and caffeine

Caffeine is the psychostimulant substance most consumed worldwide. The antagonism of adenosine receptors helps to understand the stimulating effects of this conpound in the brain. Caffeine antagonizes adenosine actions at pre- and postsynaptic sites in both A1 and A2A receptors in low to moderate doses, reducing the inhibitory tonus of adenosine [146]. The blockade of adenosine A1 and A2A receptors can be attained with amounts ranging from 40 to 180 mg of caffeine, usually contained in a single cup of coffee [190]. The concentrations of caffeine many times higher than those required for the blockade of adenosine receptors exert other effects on cell signaling such as calcium release, inhibition of phosphodiesterase and $GABA_A$ receptor binding [190, 191].

Ectonucleotidases and caffeine

There are few studies on the xanthine effects on the ATPase and ectonucleotidases. Previous studies have shown that caffeine and theophylline inhibited competitively the 5'-nucleotidase in sarcolemma cardiac membranes, but theophylline appeared to be a more potent agent. The inhibitory effect of caffeine and theophylline on 5'-nucleotidase may not be related to their actions on phosphodiesterase since dipyridamole and papaverine, which are also known to inhibit phosphodiesterase, did not affect the 5'-nucleotidase activity [192]. Studies have also shown a significant inhibition of rabbit renal 5’-nucleotidase (EC 3.1.3.5), cyclic nucleotide phosphodiesterase (EC 3.1.4.17), and adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) by theophylline, but only at millimolar concentration [193]. Furthermore, a significant inhibition of 5’-nucleotidase from rat brain by different xanthine derivatives has been observed [193, 194]. In contrast, theophylline caused increase of Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activity from crude synaptosomal membranes in hippocampal region [195].

The acute administration of caffeine (30 mg/kg caffeine *i.p.*) promoted an enhancement of ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes of hippocampus and striatum, respectively. However, chronic caffeine exposure at 0.3 g/L and 1 g/L in the

drinking water for 14 days was unable to modify NTPDase and 5’-nucleotidase activities in rat hippocampal and striatal synaptosomes [196]. Thus, it seems that high acute concentrations of caffeine can modulate the ecto-nucleotidase pathway, which could produce an increase in adenosine levels to counteract the antagonist actions of caffeine.

Mate is a xanthine-containing beverage, which is prepared as an infusion of the dried and ground leaves of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliacea). Previous reports have shown that *Ilex paraguariensis* has the highest levels of caffeine and theobromine when compared to other Ilex species. The ingestion of *Ilex paraguariensis* could contribute to the increase of antioxidant defense against free radicals [197]. The chronic ingestion of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* by rats during 15 days significantly decreased ATP, ADP and AMP hydrolysis in blood serum. Thus, it seems that this treatment can alter the nucleotidase pathway, modulating the balance in the purine levels which can induce relevant effects in the cardiovascular system, since *Ilex paraguariensis* has a hypotensive role [198]. It has been also shown that caffeine blocked the increase of ecto-5'-nucleotidase activity and the vasodilator response induced by rosuvastatin, impairing the clinical benefit of statins, in particular in conditions of ischemia [199].

As a risk factor for osteoporosis, epidemiological studies have observed that caffeine can decrease bone mineral density, adversely affect calcium absorption and increase the risk of bone fracture. Genes and protein sequentially expressed in osteogenesis, including Cbfa1/Runx2, collagen I, alkaline phosphatase and its protein, were significantly down-regulated by caffeine in rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, indicating that caffeine down-regulated some important events in osteogenesis and ultimately affected bone mass [200].

Besides its effects in the osteoporosis, caffeine has been related with the development of diabetes. Duarte and coworks (2012) showed that caffeine consumption *per se* could increase the serum insulin in NONcNZO10/LtJ diabetic mice after 20 weeks. On the other hand, its positive effects have also been described i. e. our results showed that caffeine (15 mg/kg) by 30 days treatment improved alterations promoted by hyperglycemia in the diabetes conditions restoring partially the cerebral Na^+,K^+-ATPase [6], as well as restoring the NTPDase and ecto-5'-nucleotidases activities in platelets. In addition, caffeine consumption prevented synaptic degeneration and astrogliosis in the hippocampus of streptozotocin-indued diabetic

rats [33] and caffeine consumption (1 g/L) restored memory performance and prevents the synaptic dysfunction and astrogliosis in type 2 diabetes mice after 20 weeks [14].

5.3 Chlorogenic acid effects on the purinergic system

Chlorogenic acid (5 mg/kg) and coffee (0.5 g/kg) by 30 days treatment demonstrated a great effect in decreasing platelet aggregation in diabetic rats (induced by 60 mg/kg streptozotocin) when ADP (5 and 10 µmol) was used as agonist. Chlorogenic acid and coffee treatment also reverse the increase in the NTPDase activity from platelets (not published yet). This data suggest that chlorogenic acid and coffee may be used to protect damage in the cardiovascular system observed in the diabetes.

5.4 Others compounds from coffee

We also have to give attention to caffeic acid effects once it is a compound widely found in the coffee. Studies performed with caffeic and 5-caffeoylquinic acids have reported a decrease the risk of inflammation and cardiovascular diseases [5, 56]. In fact, Anwar and co-workers (2013) discovered that ATP and AMP hydrolysis in platelets was decreased, while ADP hydrolysis was increased in all groups treated with caffeic acid (10, 50 and 100 mg/kg) for 30 days. They also showed that E-NPP and adenosine deaminase activities were increased in the platelets of animals treated with 10, 50 and 100 mg/kg caffeic acid. These findings suggest that the beneficial effects of caffeic acid in the cardiovascular diseases could be associated with the modulation of adenine nucleotide hydrolysis in platelets. In addition, this compound induced a significant reduction in platelet aggregation at 10, 50 and 100 mg/kg of caffeic acid by 30 days, using ADP (5 µM) as agonist. Based on these evidences and others, Anwar and co-workers suggested that caffeic acid would interfere with the purinoreceptores P2Y1 and P2Y12 [5].

Concluding Remarks

Further studies evaluating the role of caffeine in the modulation of nucleotide levels in several conditions, such as brain development, ageing, and neurodegenerative diseases could contribute for a better understanding of neuroprotective effects induced by this xanthine compound.

In addition to that, chlorogenic acid is described as a promising compound against many different diseases mainly that linked with inflammatory alterations and could possibly act in the purinergic modulation. Others compounds found in coffee can have important effects as trigonelline that acts in the prevention of CNS disease and diabetes. On the other hand, cafestol and kahweol raises serum concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and alanine aminotransferase in humans. These compounds contribute to global effect of coffee.

Coffee effects are controversial, needing more studies to better understand the real mechanisms of coffee drinking. In addition to caffeine and chlorogenic acid, many others phenolic compounds may be present in coffee and have biological activities. Therefore, more studies with animals models and humans are necessary to clarify the mechanism by which they are acting.

Table 1: Effects of caffeine and caffeine sources and caffeic acid on nucleotide hydrolysis in different experimental protocols

Drug	**Nucleotide**	**Dose, period and administration route**	**Effect**	**Tissue**	**Animal Model**	**Reference**
Caffeine	ATP	30 mg/kg – i.p.	↑	Hippocammpus	Adult rat	Da Silva et. al (2003)
	ADP	30 mg/kg– i.p.	↑	Striatum	Adult rat	Da Silva et. al (2003)
	AMP	30 mg/kg– i.p.	No	Striatum and Hippocammpus	Adult rat	Da Silva et. al (2003)
	ATP	0.3-1 g/L/ for 14 days – drinking water	No	Striatum and Hippocammpus	Adult rat	Da Silva et. al (2003)
	ADP	0.3-1 g/L/ for 14 days– drinking water	No	Striatum and Hippocammpus	Adult rat	Da Silva et. al (2003)
	AMP	0.3-1 g/L/ for 14 days– drinking water	No	Striatum and Hippocammpus	Adult rat	Da Silva et. al (2003)
Ilex paraguariensis	ATP	15 days-drinking water	↓	Serum	Adult rat	Gorden et al. (1999)
	ADP	15 days-drinking water	↓	Serum	Adult rat	Gorden et al. (1999)
	AMP	15 days-drinking water	↓	Serum	Adult rats	Gorden et al. (1999)
Caffeine and diabetes	ATP	15 mg/kg/ for 30 days-gavage	↓	Platelets	Adult rats	Stefanello et al. (In press)
	ADP	15 mg/kg/ for 30 days-gavage	↓	Platelets	Adult rats	Stefanello et al. (In press)
	AMP	15 mg/kg/ for 30 days-gavage	↓	Platelets	Adult rats	Stefanello et al. (In press)
Caffeic acid	ATP	10, 50 and 100 mg/kg for 30 days-gavage	↓	Platelets	Adult rats	Anwar et al. (2013)
	ADP	10, 50 and 100 mg/kg for 30 days-gavage	↑	Platelets	Adult rats	Anwar et al. (2013)
	AMP	10, 50 and 100 mg/kg for for 30 days-gavage	↓	Platelets	Adult rats	Anwar et al. (2013)

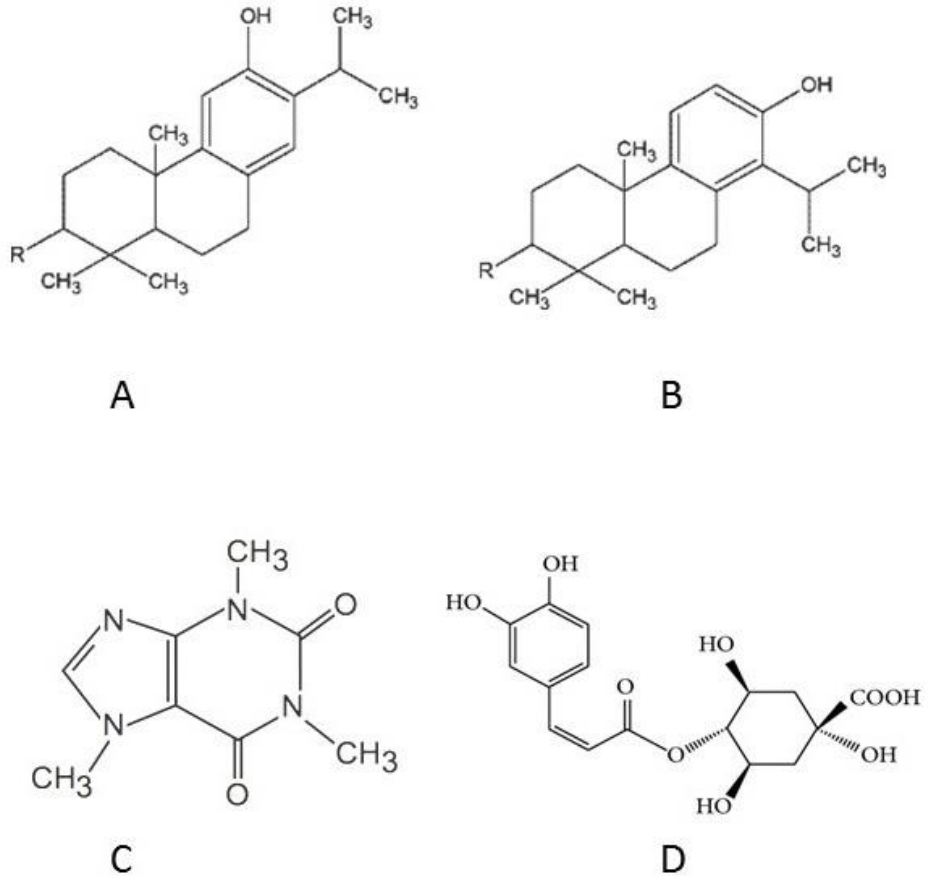


Figure 1. A) Cafestol; B) Kahweol; C) Caffeine; D) Chlorogenic acid.

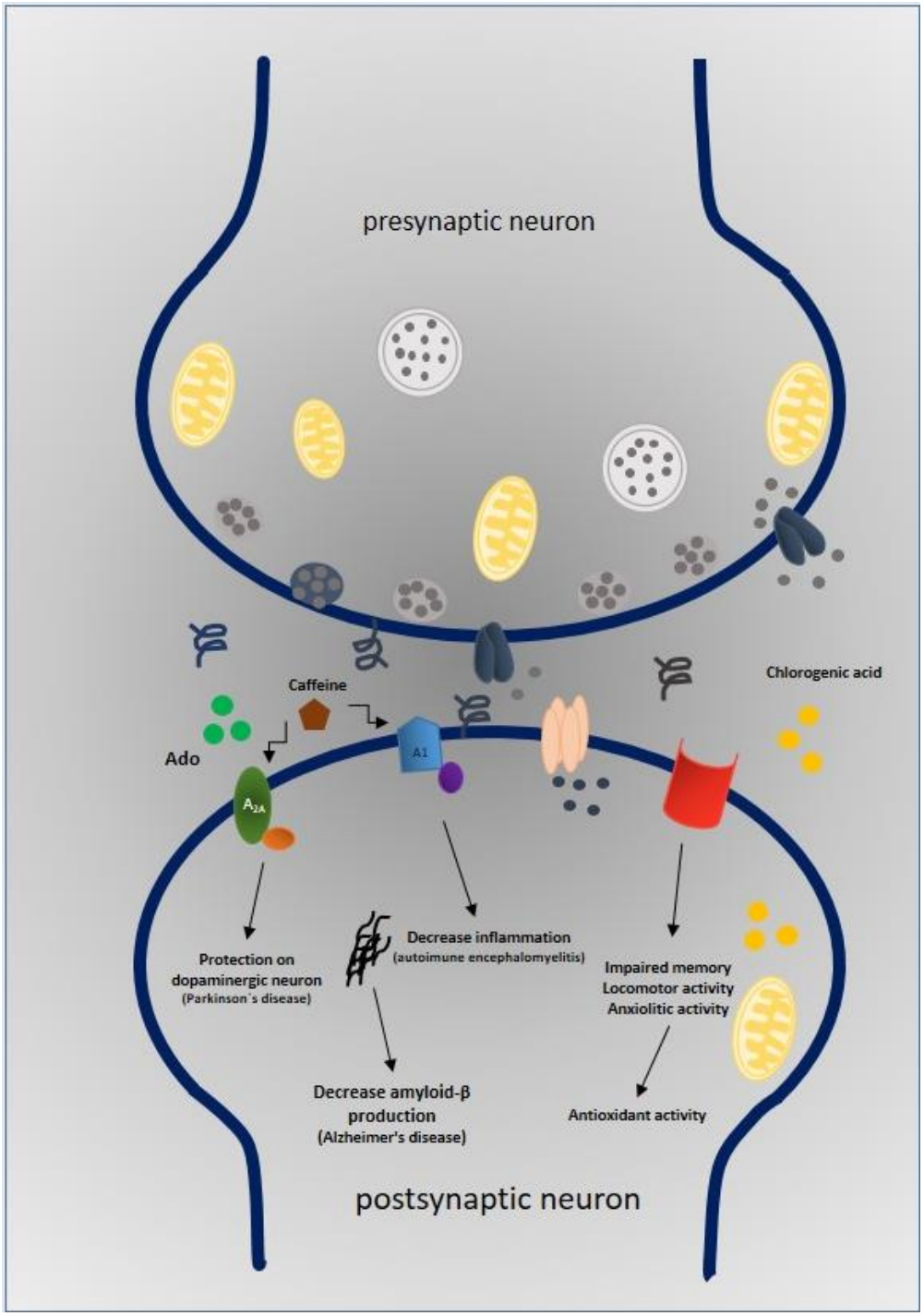


Figure 2: Effect of caffeine and chlorogenic acid on central nervous system. Caffeine is an antagonist of adenosine receptors and can attenuate the dopaminergic toxicity, it decreases the inflammation and upregulate A_1 receptors. The moderate caffeine administration suppresses brain amyloid-β production. Chlorogenic acid improves the impairment of memory, affects the locomotor activity and exerts anxiolytic and antioxidant effects.

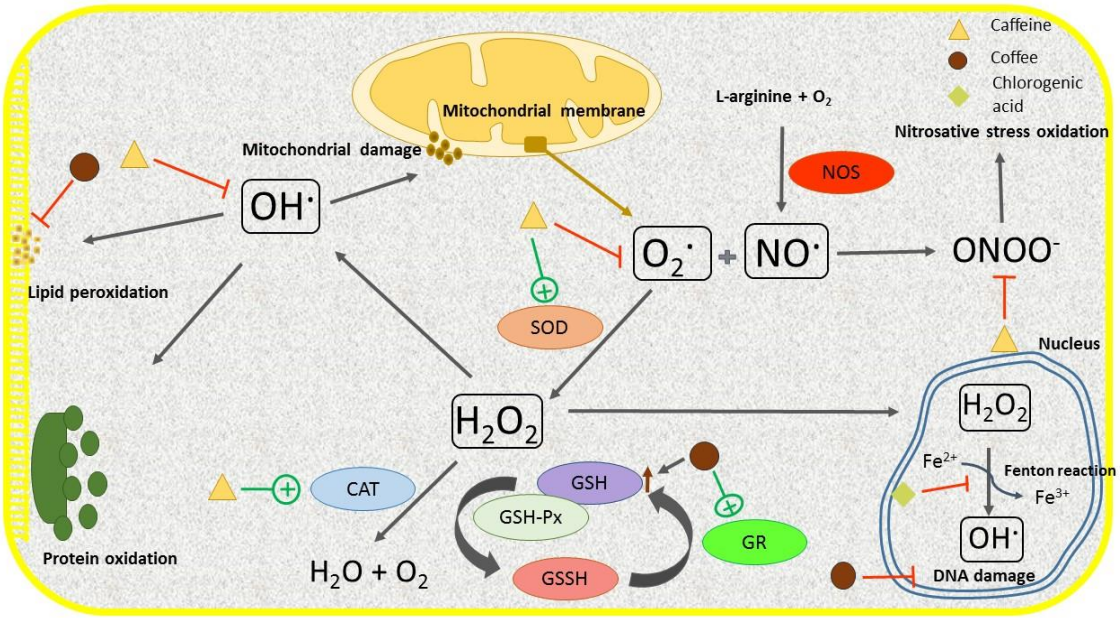


Figure 3. Effect of caffeine (▲), coffee (●) and chlorogenic acid (♦) on components of antioxidant system and in the oxidative stress. Caffeine treatment is able to restore oxygen and nitrogen reactive species. Caffeine (1 g/L) alone increases catalase and superoxide dismutase (SOD) activities. Coffee drinking increases the glutathione (GSH) levels as well as reduces lipid peroxidation and, it reduces oxidative DNA damage. Chlorogenic acid prevents the hydroxyl radical formation by iron chelation. Abbreviations: NOS: oxide nitric synthase; GSH-Px: glutathione peroxidase; GSSG: reduced glutathione; GR: glutathione reductase.

References

[1] Homan DJ, Mobarhan S. Coffee: good, bad, or just fun? A critical review of coffee's effects on liver enzymes. Nutrition reviews. 2006;64:43-6.
[2] Ashihara H, Crozier A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. Trends in plant science. 2001;6:407-13.
[3] Feldman JR, Ryder WS, T. KJ. Importance of Nonvolatile Compounds to the Flavor of coffee. Journal of agricultural and food chemistry. 1969;17:733-9.
[4] Ludwig IA, Clifford MN, Lean ME, Ashihara H, Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. Food & function. 2014;5:1695-717.
[5] Anwar J, Spanevello RM, Pimentel VC, Gutierres J, Thome G, Cardoso A, et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2013;56:459-66.
[6] Stefanello N, Schmatz R, Pereira LB, Rubin MA, da Rocha JB, Facco G, et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. Molecular and cellular biochemistry. 2014;388:277-86.
[7] Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. The Keio journal of medicine. 2013;62:63-73.
[8] Gutierres JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, et al. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. Life sciences. 2014;96:7-17.
[9] Gutierres JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Rodrigues MV, Schmatz R, Pimentel VC, et al. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. Life sciences. 2012;91:1221-8.
[10] Schmatz R, Mann TR, Spanevello R, Machado MM, Zanini D, Pimentel VC, 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 biochemistry and biophysics. 2013;65:129-43.
[11] Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierres J, Maldonado PA, et al. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. Brain research bulletin. 2009;80:371-6.
[12] Abdalla FH, Cardoso AM, Pereira LB, Schmatz R, Goncalves JF, Stefanello N, et al. Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. Molecular and cellular biochemistry. 2013;381:1-8.
[13] Maciel RM, Carvalho FB, Olabiyi AA, Schmatz R, Gutierres JM, Stefanello N, et al. Neuroprotective effects of quercetin on memory and anxiogenic-like behavior in diabetic rats: Role of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2016;84:559-68.
[14] Duarte JM, Agostinho PM, Carvalho RA, Cunha RA. Caffeine consumption prevents diabetes-induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NONcZNO10/LTJ mice. PloS one. 2012;7:e21899.
[15] Grembecka M, Malinowska E, Szefer P. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. The Science of the total environment. 2007;383:59-69.
[16] Wei F, Furihata K, Koda M, Hu F, Miyakawa T, Tanokura M. Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: time course of changes in composition. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60:1005-12.

[17] Wei F, Furihata K, Koda M, Hu F, Kato R, Miyakawa T, et al. (13)C NMR-based metabolomics for the classification of green coffee beans according to variety and origin. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60:10118-25.
[18] Dong W, Tan L, Zhao J, Hu R, Lu M. Characterization of Fatty Acid, Amino Acid and Volatile Compound Compositions and Bioactive Components of Seven Coffee (Coffea robusta) Cultivars Grown in Hainan Province, China. Molecules. 2015;20:16687-708.
[19] Murkovic M, Derler K. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. Journal of biochemical and biophysical methods. 2006;69:25-32.
[20] Sunarharum WB, Williams DJ, Smyth HE. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. Food Res Int. 2014;62:315-25.
[21] del Castillo MD, Ames JM, Gordon MH. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. Journal of agricultural and food chemistry. 2002;50:3698-703.
[22] Gross G, Jaccaud E, Huggett AC. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 1997;35:547-54.
[23] Ashihara H. Metabolism of alkaloids in coffee plants. Braz J Plant Physiol. 2006;18:1-8.
[24] Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. Phytochemistry. 2008;69:841-56.
[25] Waldhauser SSM, Baumann TW. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. Phytochemistry. 1996;42 985-96.
[26] Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. Journal Science Food Agriculture. 1999;79:362-72.
[27] Farah AD, C.M. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology. 2006;18:23-36.
[28] Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. Handbook of experimental pharmacology. 2011:33-91.
[29] Krul C, Hageman G. Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications. 1998;709:27-34.
[30] Buters JT, Tang BK, Pineau T, Gelboin HV, Kimura S, Gonzalez FJ. Role of CYP1A2 in caffeine pharmacokinetics and metabolism: studies using mice deficient in CYP1A2. Pharmacogenetics. 1996;6:291-6.
[31] Che B, Wang L, Zhang Z, Zhang Y, Deng Y. Distribution and accumulation of caffeine in rat tissues and its inhibition on semicarbazide-sensitive amine oxidase. Neurotoxicology. 2012;33:1248-53.
[32] Kaplan GB, Greenblatt DJ, Leduc BW, Thompson ML, Shader RI. Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptor binding and locomotor activity. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1989;248:1078-83.
[33] Duarte JM, Carvalho RA, Cunha RA, Gruetter R. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of neurochemistry. 2009;111:368-79.
[34] Monteiro M, Farah A, Perrone D, Trugo LC, Donangelo C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. The Journal of nutrition. 2007;137:2196-201.
[35] Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. The Journal of nutrition. 2003;133:1806-14.

[36] Olthof MR, Hollman PC, Zock PL, Katan MB. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. The American journal of clinical nutrition. 2001;73:532-8.
[37] Stalmach A, Steiling H, Williamson G, Crozier A. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. Archives of biochemistry and biophysics. 2010;501:98-105.
[38] Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. The Journal of nutrition. 2008;138:2309-15.
[39] Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. Free radical research. 2004;38:771-85.
[40] Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition. 2004;79:727-47.
[41] Caini S, Cattaruzza S, Bendinelli B, Tosti G, Masala G, Gnagnarella P, et al. Coffee, tea and caffeine intake and the risk of non-melanoma skin cancer: a review of the literature and meta-analysis. European journal of nutrition. 2016.
[42] Santos RM, Lima DR. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. European journal of nutrition. 2016;55:1345-58.
[43] Shimoyama AT, Santin JR, Machado ID, de Oliveira e Silva AM, de Melo IL, Mancini-Filho J, et al. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2013;386:5-14.
[44] Hitman GA. Coffee: friend or foe for diabetes risk? Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. 2014;31:763.
[45] Ding M, Bhupathiraju SN, Chen M, van Dam RM, Hu FB. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. Diabetes care. 2014;37:569-86.
[46] Wedick NM, Brennan AM, Sun Q, Hu FB, Mantzoros CS, van Dam RM. Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. Nutrition journal. 2011;10:93.
[47] Muley A, Muley P, Shah M. Coffee to reduce risk of type 2 diabetes?: a systematic review. Current diabetes reviews. 2012;8:162-8.
[48] Patja K, Jousilahti P, Hu G, Valle T, Qiao Q, Tuomilehto J. Effects of smoking, obesity and physical activity on the risk of type 2 diabetes in middle-aged Finnish men and women. Journal of internal medicine. 2005;258:356-62.
[49] van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB. Coffee, caffeine, and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study in younger and middle-aged U.S. women. Diabetes care. 2006;29:398-403.
[50] Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. The American journal of clinical nutrition. 2003;78:728-33.
[51] Yamauchi R, Kobayashi M, Matsuda Y, Ojika M, Shigeoka S, Yamamoto Y, et al. Coffee and caffeine ameliorate hyperglycemia, fatty liver, and inflammatory adipocytokine expression in spontaneously diabetic KK-Ay mice. Journal of agricultural and food chemistry. 2010;58:5597-603.
[52] van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, van Dam RM. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. Diabetes care. 2009;32:1023-5.
[53] Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. General physiology and biophysics. 2010;29:23-30.

[54] Hemmerle H, Burger HJ, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler PW, et al. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. Journal of medicinal chemistry. 1997;40:137-45.
[55] Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. Critical reviews in food science and nutrition. 2006;46:101-23.
[56] Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society. 2007;55:187-98.
[57] Tofler OB, Foy S, Ng K, Hickey G, Burke V. Coffee and coronary heart disease. Heart, lung & circulation. 2001;10:116-20.
[58] Nilsson LM, Wennberg M, Lindahl B, Eliasson M, Jansson JH, Van Guelpen B. Consumption of filtered and boiled coffee and the risk of first acute myocardial infarction; a nested case/referent study. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD. 2010;20:527-35.
[59] Andersen LF, Jacobs DR, Jr., Carlsen MH, Blomhoff R. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. The American journal of clinical nutrition. 2006;83:1039-46.
[60] Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F, Li TY, Mukamal KJ, Hu FB, van Dam RM. Coffee consumption and mortality in women with cardiovascular disease. The American journal of clinical nutrition. 2011;94:218-24.
[61] Riksen NP, Rongen GA, Smits P. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease. Pharmacology & therapeutics. 2009;121:185-91.
[62] Toda E, Ishida H, Aoki T, Urano T, Takahari Y, Tamura N, et al. Possible mechanism of preventive effects of coffee intake on the formation of arterial occlusive thrombosis. The Tokai journal of experimental and clinical medicine. 2010;35:133-6.
[63] Bhaskar S, Rauf AA. Modulatory effect of coffee on platelet function. Indian journal of physiology and pharmacology. 2010;54:141-8.
[64] Li Kwok Cheong JD, Croft KD, Henry PD, Matthews V, Hodgson JM, Ward NC. Green coffee polyphenols do not attenuate features of the metabolic syndrome and improve endothelial function in mice fed a high fat diet. Archives of biochemistry and biophysics. 2014;559:46-52.
[65] Buscemi S, Verga S, Batsis JA, Tranchina MR, Belmonte S, Mattina A, et al. Dose-dependent effects of decaffeinated coffee on endothelial function in healthy subjects. European journal of clinical nutrition. 2009;63:1200-5.
[66] Cavalcante JW, Santos PR, Jr., Menezes MG, Marques HO, Cavalcante LP, Pacheco WS. Influence of caffeine on blood pressure and platelet aggregation. Arquivos brasileiros de cardiologia. 2000;75:97-105.
[67] Temple JL, Dewey AM, Briatico LN. Effects of acute caffeine administration on adolescents. Experimental and clinical psychopharmacology. 2010;18:510-20.
[68] Umemura T, Ueda K, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, et al. Effects of acute administration of caffeine on vascular function. The American journal of cardiology. 2006;98:1538-41.
[69] Varani K, Portaluppi F, Merighi S, Ongini E, Belardinelli L, Borea PA. Caffeine alters A2A adenosine receptors and their function in human platelets. Circulation. 1999;99:2499-502.
[70] Kanno Y, Watanabe R, Zempo H, Ogawa M, Suzuki J, Isobe M. Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. International heart journal. 2013;54:176-80.
[71] Mostofsky E, Rice MS, Levitan EB, Mittleman MA. Habitual coffee consumption and risk of heart failure: a dose-response meta-analysis. Circulation Heart failure. 2012;5:401-5.

[72] Abreu RV, Silva-Oliveira EM, Moraes MF, Pereira GS, Moraes-Santos T. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2011;99:659-64.
[73] Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, Wang F, Kikuchi-Utsumi K, Nakaki T. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. Neuroscience. 2011;181:206-15.
[74] Perlaki G, Orsi G, Kovacs N, Schwarcz A, Pap Z, Kalmar Z, et al. Coffee consumption may influence hippocampal volume in young women. Brain imaging and behavior. 2011;5:274-84.
[75] Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. Neuroscience. 2010;167:475-81.
[76] Chen GQ, Chen YY, Wang XS, Wu SZ, Yang HM, Xu HQ, et al. Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats. Brain research. 2010;1309:116-25.
[77] Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, et al. Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2009;17:681-97.
[78] Evans SM, Pinto Pereira LM, Addae JI. Neuroprotection by caffeine and pentoxifylline during experimental cerebral ischaemia. The West Indian medical journal. 1999;48:23-5.
[79] Holick CN, Smith SG, Giovannucci E, Michaud DS. Coffee, tea, caffeine intake, and risk of adult glioma in three prospective cohort studies. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2010;19:39-47.
[80] Kwon SH, Lee HK, Kim JA, Hong SI, Kim HC, Jo TH, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. European journal of pharmacology. 2010;649:210-7.
[81] Ito H, Sun XL, Watanabe M, Okamoto M, Hatano T. Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2008;72:885-8.
[82] Ohnishi R, Ito H, Iguchi A, Shinomiya K, Kamei C, Hatano T, et al. Effects of chlorogenic acid and its metabolites on spontaneous locomotor activity in mice. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2006;70:2560-3.
[83] Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from Prunus domestica (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. Journal of the neurological sciences. 2007;262:77-84.
[84] Devasagayam TP, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. Biochimica et biophysica acta. 1996;1282:63-70.
[85] Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2000;295:141-54.
[86] Mukhopadhyay S, Mondal A, Poddar MK. Chronic administration of caffeine: effect on the activities of hepatic antioxidant enzymes of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. Indian journal of experimental biology. 2003;41:283-9.
[87] Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. Experientia. 1994;50:465-8.
[88] Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused

by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2009;29:14741-51.
[89] Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. Experimental neurology. 2007;203:241-5.
[90] Cunha RA, Agostinho PM. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. Journal of Alzheimer's disease : JAD. 2010;20 Suppl 1:S95-116.
[91] Costa MS, Botton PH, Mioranzza S, Souza DO, Porciuncula LO. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tirosine kinase receptor (TrkB) content in mice. Neuroscience. 2008;153:1071-8.
[92] Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. Neurobiology of aging. 2005;26:957-64.
[93] Leite MR, Wilhelm EA, Jesse CR, Brandao R, Nogueira CW. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. Experimental gerontology. 2011;46:309-15.
[94] Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Involvement of adenosinergic receptor system in an animal model of tardive dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes. European journal of pharmacology. 2006;552:55-66.
[95] Prasanthi JR, Dasari B, Marwarha G, Larson T, Chen X, Geiger JD, et al. Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. Free radical biology & medicine. 2010;49:1212-20.
[96] Noschang CG, Krolow R, Pettenuzzo LF, Avila MC, Fachin A, Arcego D, et al. Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. Neurochemical research. 2009;34:1568-74.
[97] Noschang CG, Pettenuzzo LF, von Pozzer Toigo E, Andreazza AC, Krolow R, Fachin A, et al. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. Pharmacology, biochemistry, and behavior. 2009;94:63-9.
[98] Nobre HV, Jr., Cunha GM, de Vasconcelos LM, Magalhaes HI, Oliveira Neto RN, Maia FD, et al. Caffeine and CSC, adenosine A2A antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. Neurochemistry international. 2010;56:51-8.
[99] Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. Journal of agricultural and food chemistry. 2002;50:6211-6.
[100] Tsubouchi H, Shimoya K, Hayashi S, Toda M, Morimoto K, Murata Y. Effect of coffee intake on blood flow and maternal stress during the third trimester of pregnancy. International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics. 2006;92:19-22.
[101] Bakuradze T, Boehm N, Janzowski C, Lang R, Hofmann T, Stockis JP, et al. Antioxidant-rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: results from an intervention study. Molecular nutrition & food research. 2011;55:793-7.
[102] Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, Amoruso DC, Ribecco MT, Romano A, et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. Hepatology. 2010;52:1652-61.
[103] Jia H, Aw W, Egashira K, Takahashi S, Aoyama S, Saito K, et al. Coffee intake mitigated inflammation and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle of high-fat diet-induced obese mice. Genes & nutrition. 2014;9:389.

[104] Correa TA, Rogero MM, Mioto BM, Tarasoutchi D, Tuda VL, Cesar LA, et al. Paper-filtered coffee increases cholesterol and inflammation biomarkers independent of roasting degree: a clinical trial. Nutrition. 2013;29:977-81.
[105] Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Stefanadis C. Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. The American journal of clinical nutrition. 2004;80:862-7.
[106] Misik M, Hoelzl C, Wagner KH, Cavin C, Moser B, Kundi M, et al. Impact of paper filtered coffee on oxidative DNA-damage: results of a clinical trial. Mutation research. 2010;692:42-8.
[107] Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, et al. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. Free radical biology & medicine. 2005;38:527-34.
[108] Lee KJ, Jeong HG. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. Toxicology letters. 2007;173:80-7.
[109] Kono Y, Kashine S, Yoneyama T, Sakamoto Y, Matsui Y, Shibata H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 1998;62:22-7.
[110] Shahidi F, Chandrasekara A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. Phytochemical Reviews. 2010;9:147–70.
[111] Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends in neurosciences. 1999;22:208-15.
[112] Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. Trends in molecular medicine. 2007;13:54-63.
[113] Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2004;24:2633-42.
[114] Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. Novartis Foundation symposium. 2006;276:113-28; discussion 28-30, 233-7, 75-81.
[115] Martin ED, Fernandez M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, et al. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. Glia. 2007;55:36-45.
[116] Studer FE, Fedele DE, Marowsky A, Schwerdel C, Wernli K, Vogt K, et al. Shift of adenosine kinase expression from neurons to astrocytes during postnatal development suggests dual functionality of the enzyme. Neuroscience. 2006;142:125-37.
[117] Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, et al. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science. 2005;310:113-6.
[118] Ginsborg BL, Hirst GD. Theophylline and adenosine at the neuromuscular junction. British journal of pharmacology. 1971;43:432P-3P.
[119] Simonato M, Tongiorgi E, Kokaia M. Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. Trends in pharmacological sciences. 2006;27:631-8.
[120] Ribeiro JA, Walker J. Action of adenosine triphosphate on endplate potentials recorded from muscle fibres of the rat-diaphragm and frog sartorius. British journal of pharmacology. 1973;49:724-5.
[121] Ribeiro JA, Walker J. The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. British journal of pharmacology. 1975;54:213-8.
[122] Ribeiro JA, Sebastiao AM. On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. The Journal of physiology. 1987;384:571-85.
[123] Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. Pharmacological reviews. 1994;46:143-56.

[124] Libert F, Schiffmann SN, Lefort A, Parmentier M, Gerard C, Dumont JE, et al. The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. The EMBO journal. 1991;10:1677-82.
[125] Maenhaut C, Van Sande J, Libert F, Abramowicz M, Parmentier M, Vanderhaegen JJ, et al. RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. Biochemical and biophysical research communications. 1990;173:1169-78.
[126] Furlong TJ, Pierce KD, Selbie LA, Shine J. Molecular characterization of a human brain adenosine A2 receptor. Brain research Molecular brain research. 1992;15:62-6.
[127] Mahan LC, McVittie LD, Smyk-Randall EM, Nakata H, Monsma FJ, Jr., Gerfen CR, et al. Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. Molecular pharmacology. 1991;40:1-7.
[128] Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. Molecular endocrinology. 1992;6:384-93.
[129] Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89:7432-6.
[130] Palmer TM, Stiles GL. Adenosine receptors. Neuropharmacology. 1995;34:683-94.
[131] Fastbom J, Pazos A, Palacios JM. The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. Neuroscience. 1987;22:813-26.
[132] Schindler M, Harris CA, Hayes B, Papotti M, Humphrey PP. Immunohistochemical localization of adenosine A1 receptors in human brain regions. Neuroscience letters. 2001;297:211-5.
[133] Svenningsson P, Hall H, Sedvall G, Fredholm BB. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. Synapse. 1997;27:322-35.
[134] Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA. Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. Molecular endocrinology. 1991;5:1037-48.
[135] Cristovao-Ferreira S, Navarro G, Brugarolas M, Perez-Capote K, Vaz SH, Fattorini G, et al. A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and G i/0 proteins modulate GABA transport into astrocytes. Purinergic signalling. 2013;9:433-49.
[136] Gebicke-Haerter PJ, Christoffel F, Timmer J, Northoff H, Berger M, Van Calker D. Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. Neurochemistry international. 1996;29:37-42.
[137] Othman T, Yan H, Rivkees SA. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. Glia. 2003;44:166-72.
[138] Augood SJ, Emson PC. Adenosine A2a receptor mRNA is expressed by enkephalin cells but not by somatostatin cells in rat striatum: a co-expression study. Brain research Molecular brain research. 1994;22:204-10.
[139] Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, et al. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. Brain research Molecular brain research. 1992;14:186-95.
[140] Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. Neurochemistry international. 2001;38:107-25.
[141] Burnstock G, Fredholm BB, Verkhratsky A. Adenosine and ATP receptors in the brain. Current topics in medicinal chemistry. 2011;11:973-1011.

[142] Lopes LV, Halldner L, Rebola N, Johansson B, Ledent C, Chen JF, et al. Binding of the prototypical adenosine A(2A) receptor agonist CGS 21680 to the cerebral cortex of adenosine A(1) and A(2A) receptor knockout mice. British journal of pharmacology. 2004;141:1006-14.
[143] Rebola N, Rodrigues RJ, Oliveira CR, Cunha RA. Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. Neurochemistry international. 2005;47:317-25.
[144] Landolt HP. Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans? Biochemical pharmacology. 2008;75:2070-9.
[145] Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annual review of neuroscience. 2001;24:31-55.
[146] Fredholm BB. Theophylline actions on adenosine receptors. European journal of respiratory diseases Supplement. 1980;109:29-36.
[147] Goding JW, Grobben B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. Biochimica et biophysica acta. 2003;1638:1-19.
[148] Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. Trends in biochemical sciences. 2005;30:542-50.
[149] Cimpean A, Stefan C, Gijsbers R, Stalmans W, Bollen M. Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. The Biochemical journal. 2004;381:71-7.
[150] Sakagami H, Aoki J, Natori Y, Nishikawa K, Kakehi Y, Natori Y, et al. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. The Journal of biological chemistry. 2005;280:23084-93.
[151] Laketa D, Bjelobaba I, Savic J, Lavrnja I, Stojiljkovic M, Rakic L, et al. Biochemical characterization of soluble nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in rat serum. Molecular and cellular biochemistry. 2010;339:99-106.
[152] Grobben B, Anciaux K, Roymans D, Stefan C, Bollen M, Esmans EL, et al. An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. Journal of neurochemistry. 1999;72:826-34.
[153] Fuss B, Baba H, Phan T, Tuohy VK, Macklin WB. Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 1997;17:9095-103.
[154] Buffon A, Casali EA, Cardoso VV, Zerbini LF, Robson SC, Sarkis JJ, et al. Differential expression of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases by Walker 256 mammary cancer cells in solid tumors and malignant ascites. Life sciences. 2010;86:435-40.
[155] Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. Cell and tissue research. 2008;334:199-217.
[156] Millan JL. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. Purinergic signalling. 2006;2:335-41.
[157] Narisawa S, Hoylaerts MF, Doctor KS, Fukuda MN, Alpers DH, Millan JL. A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2007;293:G1068-77.
[158] Kaunitz JD, Yamaguchi DT. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. Journal of cellular biochemistry. 2008;105:655-62.
[159] Fonta C, Negyessy L, Renaud L, Barone P. Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex. The Journal of comparative neurology. 2005;486:179-96.

[160] Doengi M, Deitmer JW, Lohr C. New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2008;22:2368-78.
[161] Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2000;362:299-309.
[162] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochimica et biophysica acta. 2008;1783:673-94.
[163] Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic signalling. 2006;2:409-30.
[164] Cognato GP, Vuaden FC, Savio LE, Bellaver B, Casali E, Bogo MR, et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases role in the pathophysiology of cognitive impairment induced by seizure in early age. Neuroscience. 2011;180:191-200.
[165] Bruno AN, Fontella FU, Crema LM, Bonan CD, Dalmaz C, Barreto-Chaves ML, et al. Hyperthyroidism changes nociceptive response and ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from spinal cord of rats in different phases of development. Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology. 2005;140:111-6.
[166] Horvat A, Stanojevic I, Drakulic D, Velickovic N, Petrovic S, Milosevic M. Effect of acute stress on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in brain synaptosomes in different stages of development. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. 2010;28:175-82.
[167] Bruno AN, Pochmann D, Ricachenevsky FK, Fontella FU, Bonan CD, Dalmaz C, et al. Nociceptive response and adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes isolated from spinal cord of hypothyroid rats. Neurochemical research. 2005;30:1155-61.
[168] Biederbick A, Kosan C, Kunz J, Elsasser HP. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. The Journal of biological chemistry. 2000;275:19018-24.
[169] Belcher SM, Zsarnovszky A, Crawford PA, Hemani H, Spurling L, Kirley TL. Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. Neuroscience. 2006;137:1331-46.
[170] Ivanenkov VV, Sevigny J, Kirley TL. Trafficking and intracellular ATPase activity of human ecto-nucleotidase NTPDase3 and the effect of ER-targeted NTPDase3 on protein folding. Biochemistry. 2008;47:9184-97.
[171] Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. Journal of immunology. 1994;153:3574-83.
[172] Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (Solanum tuberosum). Biochemical and biophysical research communications. 1996;218:916-23.
[173] Braun N, Sevigny J, Robson SC, Enjyoji K, Guckelberger O, Hammer K, et al. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. The European journal of neuroscience. 2000;12:4357-66.
[174] Braun N, Sevigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, et al. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. The European journal of neuroscience. 2003;17:1355-64.
[175] Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2005;31:217-33.

[176] Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku AS, Lenz G, Zerbini LF, Libermann TA, et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. Neuroscience. 2006;138:421-32.
[177] Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sevigny J, Braun N. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. Purinergic signalling. 2005;1:259-70.
[178] Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. Biochemistry. 2004;43:5511-9.
[179] Fausther M, Lecka J, Kukulski F, Levesque SA, Pelletier J, Zimmermann H, et al. Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2007;292:G785-95.
[180] Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ. Free radical-induced inhibition of ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. Biochemistry and molecular biology international. 1997;41:161-8.
[181] Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. Biofactors. 2007;31:77-98.
[182] Zanin RF, Campesato LF, Braganhol E, Schetinger MR, Wyse AT, Battastini AM. Homocysteine decreases extracellular nucleotide hydrolysis in rat platelets. Thrombosis research. 2010;125:e87-92.
[183] Duarte MM, Loro VL, Rocha JB, Leal DB, Bem AF, Dorneles A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. The FEBS journal. 2007;274:2707-14.
[184] Gutierres JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Rodrigues MV, Vieira JM, Maldonado P, et al. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides and platelet aggregation induced by high-fat diet in rats: effects of alpha-tocopherol. Journal of physiology and biochemistry. 2014;70:487-96.
[185] Koonin EV. Conserved sequence pattern in a wide variety of phosphoesterases. Protein science : a publication of the Protein Society. 1994;3:356-8.
[186] Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. The Biochemical journal. 1992;285 (Pt 2):345-65.
[187] Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zernecke A, Flogel U, Braun N, et al. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. Circulation research. 2004;95:814-21.
[188] Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). Purinergic signalling. 2006;2:351-60.
[189] Burnstock G, Novak I. Purinergic signalling in the pancreas in health and disease. The Journal of endocrinology. 2012;213:123-41.
[190] Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. Pharmacological reviews. 1999;51:83-133.
[191] Daly JW. Caffeine analogs: biomedical impact. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2007;64:2153-69.
[192] Heyliger CE, Panagia V, Dhalla NS. Effect of cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors on cardiac sarcolemmal 5'-nucleotidase. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1981;217:489-93.
[193] Fredholm BB, Hedqvist P, Vernet L. Effect of theophylline and other drugs on rabbit renal cyclic nucleotide phosphodiesterase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. Biochemical pharmacology. 1978;27:2845-50.

[194] Jensen MH, Jacobsen JB. The influence of theophylline and phenobarbital on rat brain 5'-nucleotidase. Acta neurologica Scandinavica. 1987;76:46-9.
[195] Lachowicz L, Janiszewska G, Wojtkowiak R, Wojtkowiak Z. Ca2+ Mg2+ -ATPase activity of synaptosome fraction and synaptosomal membranes from different areas of rat brain. The International journal of biochemistry. 1983;15:163-5.
[196] da Silva RS, Bruno AN, Battastini AM, Sarkis JJ, Lara DR, Bonan CD. Acute caffeine treatment increases extracellular nucleotide hydrolysis from rat striatal and hippocampal synaptosomes. Neurochemical research. 2003;28:1249-54.
[197] Schinella GR, Troiani G, Davila V, de Buschiazzo PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of Ilex paraguariensis. Biochemical and biophysical research communications. 2000;269:357-60.
[198] Gorgen M, Turatti K, Medeiros AR, Buffon A, Bonan CD, Sarkis JJ, et al. Aqueous extract of Ilex paraguariensis decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. Journal of ethnopharmacology. 2005;97:73-7.
[199] Meijer P, Wouters CW, van den Broek PH, de Rooij M, Scheffer GJ, Smits P, et al. Upregulation of ecto-5'-nucleotidase by rosuvastatin increases the vasodilator response to ischemia. Hypertension. 2010;56:722-7.
[200] Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW, et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. British journal of pharmacology. 2010;161:1542-52.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito da hiperglicemia em diferentes tecidos, devido ao fato de que as alterações iniciais ocorrem no pâncreas e, após, os outros tecidos são envolvidos em complicações geradas pelo diabetes. Cada tecido possui as suas próprias características, de acordo com a função que desempenham. Através de alterações no sistema purinérgico, metabolismo do ATP e também aumento do estresse oxidativo, a hiperglicemia pode afetá-los de forma única, ao passo que alguns mecanismos também são comuns nesses órgãos.

As alterações encontradas nos diferentes tecidos podem estar interligadas, uma vez que, no metabolismo das purinas, ocorre também a produção de espécies reativas. Como foi visto até então, as purinas, através do seu catabolismo, são hidrolisadas até a inosina. Esta, por sua vez, à hipoxantina, pela enzima purina nucleotídeo fosforilase (PNP), e a xantina oxidase converte a hipoxantina a xantina e a ácido úrico, produto final dessa via (Moriwaki *et al.*, 1999; Yegutkin, 2014). Os passos catalisados pela enzima xantina oxidase são bastante importantes, uma vez que ela é conhecida pela geração de ERO, principalmente H_2O_2 e O_2^-, os quais são removidos do meio celular pela atividade das enzimas SOD e CAT (Doehner e Landmesser, 2011; Chatuphonprasert *et al.*, 2013; Yegutkin, 2014). É descrito que a xantina oxidase encontra-se aumentada em pacientes diabéticos e que ela poderia contribuir para as complicações micro e macrovasculares nessa doença (Lytvyn *et al.*, 2015). A indução na produção de ERO devido ao aumento no catabolismo de proteínas e na hidrólise do ATP no diabetes poderia contribuir, então, para o quadro de estresse oxidativo. A diminuição da expressão e atividade da SOD e CAT (Sadi *et al.*, 2014) poderia estar relacionada com a alteração do estado redox celular devido ao metabolismo alterado nesses pacientes.

No modelo de indução de diabetes por STZ, ocorre a destruição das células β por diversos mecanismos. Essa destruição não é total, uma vez que os resultados demonstraram que um percentual de 40,61% das ilhotas de Langerhans permanecem nos animais diabéticos induzidos por STZ. Contudo, a produção de insulina das células remanescentes não é suficiente, uma vez que a glicemia dos animais diabéticos apresentava-se em torno de 258,55 mg/dL. No entanto, a glicemia pode atingir até 500 mg/dL, como observado por outros pesquisadores (Schmatz *et al.*, 2012; Maciel *et al.*, 2013; Calgaroto *et al.*, 2015).

Alguns dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia causa seus danos estão relacionados com o aumento do desvio da glicose para a via dos polióis, aumento da formação de AGEs e também do seu receptor RAGEs, ativação da PKC e da via das hexosaminas. O fator comum

de todas essas vias é a produção de espécies reativas. Além disso, a hiperglicemia causa danos ao DNA e ativa a proteína PARP (*nuclear poly (ADP-ribose*) *polymerase*), levando à inibição de enzimas da glicólise e ao acúmulo de intermediários, os quais novamente podem direcionar a glicose para os destinos descritos anteriormente (Sena *et al.*, 2013).

Alguns marcadores de glicação podem ser analisados e usados no diagnóstico do DM, incluindo a hemoglobina glicada e a frutosamina. O padrão ouro para o diagnóstico é a HbA1c, que é a medida representada pela concentração média de glicose no plasma ao longo de dois a três meses. Além da hemoglobina, outras proteínas também sofrem glicação não enzimática, dentre elas a mais comum é a albumina. A albumina glicosilada é uma frutosamina e reflete a condição de hiperglicemia de duas a três semanas, uma vez que a albumina tem um tempo de meia vida menor que a hemoglobina (Furusyo e Hayashi, 2013). Neste estudo, foi observado um aumento nos níveis de frutosamina no soro dos ratos induzidos por STZ. Além disso, esses dados corroboram estudos que demonstram que as AGEs são importantes para o desenvolvimento das complicações no diabetes (Sena *et al.*, 2013).

A hiperglicemia não tratada leva a alterações macro e microvasculares. Disfunções no endotélio dos vasos sanguíneos compreendem grande importância para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, estando também relacionadas com a produção de espécies reativas, além do aumento do dano oxidativo (Sena *et al.*, 2013). A hiperglicemia é um dos principais fatores de risco para a disfunção endotelial, condição que é encontrada tanto em pacientes com DM tipo 1 quanto com DM tipo 2 (Lozano *et al.*, 2016). Além disso, a disfunção endotelial tem sido relacionada com o desenvolvimento de aterosclerose e trombose (Sena *et al.*, 2013), estando também ligada ao aumento da agregação das plaquetas no diabetes (Ishida *et al.*, 2014).

Na agregação plaquetária, estão envolvidas muitas etapas mediadoras, incluindo trombina, epinefrina, tromboxanos, colágeno e o ADP. Após a adesão das plaquetas nas células endoteliais, inicia-se o processo de reparação através da liberação de mediadores. Dentre eles, o ADP, que é uma molécula atuante na amplificação e propagação da resposta das plaquetas à agregação (Ruggeri, 2002; Davi e Patrono, 2007). Além disso, outro fator que está bastante associado com a ativação das plaquetas é a presença de ERO, embora seus mecanismos de atuação ainda não sejam bem esclarecidos (Krotz *et al.*, 2004). Como descrito anteriormente, no diabetes ocorre produção de radicais livres e, neste estudo, foi identificado um aumento na atividade das enzimas que hidrolisam nucleotídeos de adenina, dentre eles o ADP. Ambos os resultados se somam para demonstrar um aumento na agregação plaquetária em animais tratados com o agente hiperglicemiante, estreptozotocina.

Além disso, a insulina também é uma importante molécula sinalizadora na inibição da ativação das plaquetas, sendo que uma das vias é sua inibição na supressão induzida pelo receptor $P2Y_{12}$ na formação do AMPc, atuante na inibição da agregação plaquetária (Ferreira *et al.*, 2006). Uma vez que está diminuída ou as células são resistentes a ela, a insulina não pode exercer seus efeitos na inibição da agregação plaquetária, por isso tanto os animais quanto os pacientes diabéticos possuem maior agregação plaquetária. Por outro lado, neste estudo, o tratamento com café e ácido clorogênico demonstrou uma diminuição no aumento da agregação plaquetária e também na hidrólise dos nucleotídeos pela NTPDase. Corroborando esses dados, Fuentes e colaboradores (2014) também observaram o efeito na redução da agregação plaquetária promovida pelo ACG *in vitro* em plaquetas de voluntários saudáveis. Esse ácido fenólico aumentou os níveis de AMPc nas plaquetas, através da ativação do receptor A_{2A} (Fuentes *et al.*, 2014).

Além das complicações promovidas pela hiperglicemia na função das plaquetas, as complicações microvasculares – neuropatia, retinopatia e nefropatia – são bastante conhecidas e estudadas em pacientes com diabetes (Tesfaye e Selvarajah, 2012; Wada e Makino, 2013). Essas complicações também estão associadas com a produção de espécies reativas. O complexo II da cadeia respiratória é a principal fonte de formação de superóxido no diabetes. Além disso, no rim, a enzima NAD(P)H oxidase é comprovadamente a maior geradora de espécies reativas. Outra fonte de radicais livres no diabetes é a glicose, que se auto-oxida, reage com H_2O_2 na presença de íons metálicos, levando à produção de radical hidroxila (Valko *et al.*, 2007). Além da produção aumentada de radicais livres, como observado nos ratos diabéticos sem tratamento, estudos também têm demonstrado que o sistema de defesa antioxidante celular está reduzido no diabetes, incluindo os níveis de vitamina C, níveis de tióis não proteicos (NPSH) e também uma diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT (Schmatz *et al.*, 2012; Prabakaran e Ashokkumar, 2013; Palma *et al.*, 2014; Stefanello, Pereira, *et al.*, 2014). Ainda, pode-se destacar que a expressão da enzima CuZn-SOD encontra-se diminuída no fígado de camundongos diabéticos (Chatuphonprasert *et al.*, 2013).

No rim, as complicações do DM afetam até 40% dos pacientes com essa doença e as alterações estão relacionadas com anormalidades no metabolismo de lipídios que levam a lesões renais, estando ligadas a radicais livres produzidos na auto-oxidação da glicose (Meng *et al.*, 2013), no metabolismo da glicose e também através da formação das AGEs (Sun *et al.*, 2013). Esses fatores podem contribuir para lesões renais e para a diminuição do sistema de defesa antioxidante. Embora a enzima δ-ALAD não seja uma enzima antioxidante, ela pode ser afetada pelos radicais livres, sendo também um marcador da ocorrência de estresse oxidativo nas

células. Essa enzima apresenta grupos SH suscetíveis a oxidação em seu sítio catalítico e, dessa forma, quando há estresse oxidativo, a atividade da δ-ALAD pode encontrar-se alterada. Estudos demonstraram que, em modelos de animais de diabetes, a atividade da δ-ALAD encontra-se diminuída em diferentes tecidos, entre eles fígado, rim e também no SNC (Rocha *et al.*, 2012; Schmatz *et al.*, 2012; Stefanello, Schmatz, *et al.*, 2014).

No fígado, as lesões oriundas dos danos têm de forma geral a mesma origem. Além disso, as alterações nesse órgão podem ser descritas por uma acentuada fibrinogênese, migração e proliferação celular, síntese de colágeno e também produção de citocinas pró-inflamatórias (Al-Qattan *et al.*, 2016). Essas alterações poderiam ser diagnosticadas através de marcadores bioquímicos bem conhecidos, como as enzimas AST, ALT e a γ-GT, as quais se encontram aumentadas no soro de ratos diabéticos (Hanley *et al.*, 2005). Além das alterações fisiopatológicas, pode-se observar mudanças no estado redox das células. Nesse contexto, estudos têm demonstrado que o aumento na produção de H_2O_2 pode levar à fosforilação de enzimas e alterar a sua atividade e expressão (Parsons e Gates, 2013; Sadi *et al.*, 2014). Sadi *et al.* (2014) demonstraram que há um aumento na concentração de proteínas fosforiladas no fígado de ratos diabéticos induzidos por STZ. Além disso, há uma diminuição na atividade e expressão do RNAm e densidade da CAT, bem como um aumento na densidade da CAT fosforilada. Da mesma forma, neste estudo, observou-se uma diminuição na atividade dessa enzima e também uma diminuição na atividade da SOD, bem como uma diminuição no sistema de defesa não enzimático, como a vitamina C e os NPSHs. Esses resultados corroboram dados já descritos, demonstrando que há um desequilíbrio no estado redox celular no fígado e rim, o qual poderia estar interligado com as complicações decorrentes da hiperglicemia nessa doença (Sadi *et al.*, 2014; Mushtaq *et al.*, 2015).

Dessa forma, compostos que diminuem ou inativam a produção das espécies reativas poderiam contribuir para uma redução dos danos decorrentes do estresse oxidativo. Os achados do presente estudo demonstraram que o ACG reverteu a diminuição nos níveis de vitamina C e NPSH, bem como na atividade da CAT no fígado de ratos diabéticos tratados com ACG 5 mg/kg. O ACG apresenta atividade antioxidante bem descrita, através de sua interação com as proteínas, e também protege membranas biológicas (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2015; Fernandez-Gomez *et al.*, 2015). Ainda, por apresentar um anel catecol em sua estrutura, é um excelente doador de elétrons ou átomo de hidrogênio (Zang *et al.*, 2003). Além disso, Zang *et al.* (2003) afirmam que o ACG elimina fortemente radicais hidroxila e, dessa forma, pode impedir o esgotamento de antioxidantes endógenos. Nesse contexto, os alimentos que contêm ACG podem ser benéficos para a saúde humana, incluindo o café.

O consumo crônico de café pode diminuir a peroxidação lipídica das membranas, aumentando a concentração de GSH, e a atividade de duas enzimas antioxidantes, a GPx e a SOD no cérebro de ratos jovens. Esses efeitos benéficos do café devem-se, em parte, à cafeína (Abreu *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento crônico *per se* de cafeína 15 mg/kg neste estudo diminuiu a concentração de NPSH no fígado e rim, como também diminuiu a concentração dos níveis de vitamina C no fígado e, ainda, diminuiu a atividade da ALT e AST nos animais diabéticos. O tratamento com café teve o mesmo efeito, além de também reduzir a atividade da enzima γ-GT nos animais diabéticos. Alguns estudos têm demonstrado a influência da cafeína no sistema da glutationa, a qual é o principal tiol não proteico da célula, contudo o mecanismo pelo qual a cafeína atua ainda não é esclarecido (Cechella *et al.*, 2014). Além disso, alguns estudos corroboram os resultados deste estudo, nos quais a cafeína também reduz os níveis plasmáticos de AST e ALT, diminuindo o risco de doenças crônicas no fígado (Barcelos *et al.*, 2014). Furtado *et al.* (2012) demonstraram que esse composto pode atuar impedindo o esgotamento de GSH hepática induzida pelo modelo de toxicidade hepática. Esse efeito antioxidante pode ser mediado pela via Nrf2-ARE (Furtado *et al.*, 2012). O café parece ter um efeito direto sobre a atividade da γ-GT em pacientes com problemas hepáticos, incluindo cirrose e hepatites (Saab *et al.*, 2014), e também está relacionado com o metabolismo da glutationa (Lanca e Israel, 1991). Pode-se ainda destacar que a cafeína diminui *per se* os níveis de tióis não proteicos e ácido ascórbico. Isso poderia ser explicado de acordo com um estudo demonstrando que há uma relação direta entre os ciclos de redução e oxidação da GSH/GSSG e o ácido ascórbico/dihidroxiascorbato, em que um atua reoxidando o outro (Winkler *et al.*, 1994).

Além de todas as complicações descritas até então, a longo prazo a hiperglicemia também promove alterações no SNC, as quais estão relacionadas a danos neuronais e distúrbios na homeostase de neurotransmissores. De fato, Son e colaboradores (2015) demonstraram que as flutuações na glicose sanguínea podem levar a alterações nos astrócitos responsáveis pelo ciclo glutamina/glutamato, o que acarretaria em um aumento na concentração de glutamato devido a um aumento na oxidação pelo ciclo do ácido tricarboxílico e a uma diminuição na enzima glutamina sintetase em hipocampo de camundongos diabéticos (Son *et al.*, 2015). Outras possíveis vias também são afetadas pela hiperglicemia, incluindo acúmulo de sorbitol, aumento da atividade da aldose redutase e alterações na atividade da Na^+, K^+- ATPase (Biessels *et al.*, 2002).

Juntamente com o glutamato, o ATP pode ser coliberado na fenda sináptica para a propagação do impulso nervoso (Burnstock, 2013). Estudos têm demonstrado que os

aminoácidos excitatórios e as purinas podem ser considerados como diferentes componentes que, sob condições fisiológicas e/ou patológicas, regulam em conjunto a eficiência da transmissão sináptica. Assim, os aminoácidos excitatórios e as purinas agem em sinergismo e podem contribuir para a neurodegeneração encontrada em diferentes doenças (Amadio *et al.*, 2002; Orellana *et al.*, 2011). Em adição, uma inibição da atividade da Na^+, K^+- ATPase é encontrada no córtex cerebral de ratos diabéticos induzidos por STZ (Stefanello *et al.*, 2014). Essa enzima utiliza uma grande quantidade de energia química – ATP – em sua função biológica (De Lores Arnaiz e Ordieres, 2014), contudo, devido à sua inibição pela hiperglicemia, esse ATP poderia se acumular, justificando o aumento na concentração desse nucleotídeo no córtex cerebral encontrado neste estudo.

Schmatz e colaboradores (2009) encontraram um aumento na atividade da NTPDase em preparados de córtex cerebral, o qual não foi observado no presente estudo. Pode-se afirmar que as ectonucleotidases sofrem alteração em sua atividade proporcionalmente à concentração de glicose, de acordo com Lunkes e coautores (Lunkes *et al.*, 2008). Da mesma forma, os animais testados neste estudo apresentaram um alto índice glicêmico, contudo parece não ser alto o suficiente para causar alterações na atividade das ectonucleotidases e também em sua expressão. Em adição, diferenças entre os níveis de danos estão correlacionadas com o tempo de progressão do diabetes, uma vez que mudanças mais leves são observadas vinte dias após a indução por STZ (Alvarez *et al.*, 2009) e, em dez semanas, são observadas alterações cognitivas mais intensas. Cardoso *et al.* (2010) demonstraram que os mesmos parâmetros, incluindo os de estresse oxidativo, estavam alterados em ratos Wistar pré-diabéticos (níveis de glicose eram de 6,6 mmol/L), enquanto os outros permaneceram inalterados (Gispen e Biessels, 2000; Cardoso *et al.*, 2010).

Contudo, a atividade da enzima eN encontrou-se aumentada em terminais sinápticos isolados a partir de neurônios de córtex cerebral de ratos diabéticos. Essa enzima atua na degradação de nucleotídeos monofosfatados em seus respectivos nucleosídeos. Além do transporte de adenosina pelos transportadores de nucleosídeos do meio intracelular para o espaço extracelular (Dos Santos-Rodrigues *et al.*, 2014) na fenda sináptica, a outra possível fonte de adenosina é a hidrólise dos nucleotídeos pelas ectonucleotidases. O ATP é desfosforilado principalmente pela CD39 e outras enzimas associadas à superfície da membrana, tal como fosfatases alcalinas, pirofosfatases e fosfodiesterases (Antonioli *et al.*, 2015), as quais poderiam levar a um aumento dos níveis de AMP e, consequentemete, da eN. Além disso, outros estudos já têm descrito um aumento na atividade da eN em diferentes tecidos

nos modelos animais de diabetes ou em pacientes (Lunkes *et al.*, 2003; De Bona *et al.*, 2010; Oyarzun *et al.*, 2015).

A concentração de adenosina, contudo, não está alterada no córtex cerebral de ratos diabéticos. A remoção da adenosina na fenda sináptica pode se dar através da sua recaptação pelos transportadores de nucleosídeos (Dos Santos-Rodrigues *et al.*, 2014), através da hidrólise pela enzima ADA (Dunwiddie e Masino, 2001) e também pela fosforilação da ADO em AMP pela adenosina cinase (Burnstock e Novak, 2013). Estudos publicados têm demonstrado que a atividade da ADA é encontrada aumentada em diferentes tecidos e que há uma estreita relação entre a insulina e a atividade dessa enzima (De Bona *et al.*, 2010; Khemka *et al.*, 2013). Considerando o exposto, pode-se especular que, no modelo estudado, a ADA encontra-se aumentada, removendo a ADO produzida, o que de certa forma explica os níveis normais dessa molécula. Ainda, neste trabalho não foi avaliada a participação dos outros componentes do SNC e sua influência nas alterações causadas pela hiperglicemia.

Os animais diabéticos tratados com café apresentaram uma interação entre o tratamento e a hiperglicemia na atividade da NTPDase. Como há um aumento nas concentrações de ATP e ADP no córtex cerebral desses animais, poder-se-ia justificar um aumento na atividade dessas enzimas. O efeito combinatório de todos os compostos presentes no café poderia afetar o encéfalo de uma forma diferente daquela observada pelo tratamento da cafeína e do ácido clorogênico separadamente, embora ambos os compostos sejam encontrados em concentrações altas no café. Nos experimentos *in vitro* com os sinaptossomas de córtex cerebral, observou-se que, quando esses compostos foram colocados juntos na presença dessas enzimas, estas apresentam comportamento diferente. A combinação de ambos aumentou a hidrólise do ADP, demonstrando que podem atuar de forma potencializada. É possível que todos os outros compostos presentes no café também possam atuar na modulação da atividade dessas enzimas e influenciar nos efeitos biológicos do café.

Em conclusão, os experimentos realizados neste estudo confirmam que o modelo de indução de diabetes por STZ leva à morte de células β e ao aumento da glicemia possivelmente pela diminuição da circulação de insulina. A hiperglicemia produzida a partir desse dano leva a complicações diabéticas em diferentes tecidos, incluindo fígado, rins, plaquetas, e também no SNC. Além disso, os resultados mostram que o café e seus componentes majoritários – cafeína e ácido clorogênico – possuem efeitos benéficos em cada um dos parâmetros analisados neste trabalho, porém destacam-se os efeitos do café e do ácido clorogênico no combate das complicações diabéticas induzidas pela administração da STZ.

6.CONCLUSÕES

1) Os compostos testados não protegem o cérebro das alterações no sistema purinérgico promovidas pela hiperglicemia no modelo experimental de diabetes induzidas por STZ.
2) O ácido clorogênico, cafeína e café reverteram as alterações promovidas pela hiperglicemia nos parâmetros analisados do sistema purinérgico de plaquetas de ratos diabéticos.
3) O tratamento com café e ácido clorogênico contribuem para restauração a níveis normais da agregação plaquetária em animais diabéticos induzidos por STZ.
4) O ácido clorogênico foi o composto mais eficiente em reverter as alterações oxidativas promovidos pela hiperglicemia no fígado de ratos induzidos pelo modelo experimental de diabetes. No entanto, nem mesmo o ácido clorogênico restaurou os parâmetros alterados no rim desses animais.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R. V. et al. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. **Pharmacol Biochem Behav,** v. 99, n. 4, p. 659-64, Oct 2011. ISSN 1873-5177 (Electronic)
0091-3057 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693129 >.

ADA. Commum Terms. American Diabetes Association, 2014. Acesso em: 18/05/2014.

AL-QATTAN, K. K. et al. Garlic decreases liver and kidney receptor for advanced glycation end products expression in experimental diabetes. **Pathophysiology,** v. 23, n. 2, p. 135-45, Jun 2016. ISSN 0928-4680 (Print)
0928-4680 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968224 >.

ALLRED, K. F. et al. Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. **J Nutr,** v. 139, n. 10, p. 1833-8, Oct 2009. ISSN 1541-6100 (Electronic)
0022-3166 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710155 >.

ALVAREZ, E. O. et al. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. **Behav Brain Res,** v. 198, n. 1, p. 224-30, Mar 2 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic)
0166-4328 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041902 >.

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care,** v. 37 Suppl 1, p. S81-90, Jan 2014. ISSN 1935-5548 (Electronic)
0149-5992 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357215 >.

_____. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care,** v. 39 Suppl 1, p. S13-22, Jan 2016. ISSN 1935-5548 (Electronic)
0149-5992 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26696675 >.

ANAYA, A. L.; CRUZ-ORTEGA, R.; WALLER, G. R. Metabolism and ecology of purine alkaloids. **Front Biosci,** v. 11, p. 2354-70, 2006. ISSN 1093-9946 (Print)
1093-4715 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720319 >.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine signalling in diabetes mellitus--pathophysiology and therapeutic considerations. **Nat Rev Endocrinol,** v. 11, n. 4, p. 228-41, Apr 2015. ISSN 1759-5037 (Electronic)
1759-5029 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687993 >.

ANWAR, J. et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. **Food Chem Toxicol,** v. 56, p. 459-66, Jun 2013. ISSN 1873-6351 (Electronic)
0278-6915 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454297 >.

ARBLE, D. M.; SANDOVAL, D. A. CNS control of glucose metabolism: response to environmental challenges. **Front Neurosci,** v. 7, p. 20, 2013. ISSN 1662-4548 (Print)
1662-453X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23550218 >.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry,** v. 69, n. 4, p. 841-56, Feb 2008. ISSN 0031-9422 (Print)

0031-9422 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18068204 >.

AYALA, A.; MUNOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev,** v. 2014, p. 360438, 2014. ISSN 1942-0994 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24999379 >.

BAGATINI, M. D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clin Biochem,** v. 41, n. 14-15, p. 1181-5, Oct 2008. ISSN 1873-2933 (Electronic)
0009-9120 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692493 >.

BARCELOS, R. P. et al. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. **Life Sci,** v. 96, n. 1-2, p. 40-5, Feb 6 2014. ISSN 1879-0631 (Electronic)
0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24334002 >.

BARONA, J. et al. A Mediterranean-style low-glycemic-load diet increases plasma carotenoids and decreases LDL oxidation in women with metabolic syndrome. **J Nutr Biochem,** v. 23, n. 6, p. 609-15, Jun 2012. ISSN 1873-4847 (Electronic)
0955-2863 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21775117 >.

BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food Chem Toxicol,** v. 34, n. 1, p. 119-29, Jan 1996. ISSN 0278-6915 (Print)
0278-6915 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603790 >.

BARTLETT, R.; STOKES, L.; SLUYTER, R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. **Pharmacol Rev,** v. 66, n. 3, p. 638-75, Jul 2014. ISSN 1521-0081 (Electronic)
0031-6997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24928329 >.

BASSOLI, B. K. et al. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochem Funct,** v. 26, n. 3, p. 320-8, Apr 2008. ISSN 1099-0844 (Electronic)
0263-6484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17990295 >.

BAZ, B.; RIVELINE, J. P.; GAUTIER, J. F. ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. **Eur J Endocrinol,** v. 174, n. 2, p. R43-51, Feb 2016. ISSN 1479-683X (Electronic)
0804-4643 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26431552 >.

BERTELLI, E.; REGOLI, M.; BASTIANINI, A. Endocrine tissue associated with the pancreatic ductal system: a light and electron microscopic study of the adult rat pancreas with special reference to a new endocrine arrangement. **Anat Rec,** v. 239, n. 4, p. 371-8, Aug 1994. ISSN 0003-276X (Print)
0003-276X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7978361 >.

BIEDERBICK, A. et al. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **J Biol Chem,** v. 275, n. 25, p. 19018-24, Jun 23 2000. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858452 >.

BIESSELS, G. J. et al. Ageing and diabetes: implications for brain function. **Eur J Pharmacol,** v. 441, n. 1-2, p. 1-14, Apr 19 2002. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007915 >.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry,** v. 43, n. 18, p. 5511-9, May 11 2004. ISSN 0006-2960 (Print)
0006-2960 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122917 >.

BIRK, A. V. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **J Lab Clin Med,** v. 140, n. 3, p. 166-75, Sep 2002. ISSN 0022-2143 (Print)
0022-2143 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12271274 >.

BONARSKA-KUJAWA, D.; CYBORAN-MIKOLAJCZYK, S.; KLESZCZYNSKA, H. Molecular mechanism of action of chlorogenic acid on erythrocyte and lipid membranes. **Mol Membr Biol,** v. 32, n. 2, p. 46-54, 2015. ISSN 1464-5203 (Electronic)
0968-7688 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945513 >.

BONITA, J. S. et al. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. **Pharmacol Res,** v. 55, n. 3, p. 187-98, Mar 2007. ISSN 1043-6618 (Print)
1043-6618 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368041 >.

BORN, G. V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature,** v. 194, p. 927-9, Jun 9 1962. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13871375 >.

BOUWENS, L.; PIPELEERS, D. G. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. **Diabetologia,** v. 41, n. 6, p. 629-33, Jun 1998. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662042 >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)
0003-2697 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051 >.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol Sci,** v. 27, n. 3, p. 166-76, Mar 2006. ISSN 0165-6147 (Print)
0165-6147 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487603 >.

_____. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. **Keio J Med,** v. 62, n. 3, p. 63-73, 2013. ISSN 1880-1293 (Electronic)
0022-9717 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24067872 >.

BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; VERKHRATSKY, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. **Curr Top Med Chem,** v. 11, n. 8, p. 973-1011, 2011. ISSN 1873-4294 (Electronic)
1568-0266 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401499 >.

BURNSTOCK, G.; NOVAK, I. Purinergic signalling and diabetes. **Purinergic Signal**, Apr 3 2013. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23546842 >.
BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. **Keio J Med,** v. 62, n. 3, p. 63-73, 2013. ISSN 1880-1293 (Electronic)
0022-9717 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24067872 >.

BURNSTOCK, G.; VAUGHN, B.; ROBSON, S. C. Purinergic signalling in the liver in health and disease. **Purinergic Signal,** v. 10, n. 1, p. 51-70, Mar 2014. ISSN 1573-9546 (Electronic)
1573-9538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271096 >.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Crit Rev Food Sci Nutr,** v. 51, n. 4, p. 363-73, Apr 2011. ISSN 1549-7852 (Electronic)
1040-8398 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21432699 >.

BYERS, T.; PERRY, G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. **Annu Rev Nutr,** v. 12, p. 139-59, 1992. ISSN 0199-9885 (Print)
0199-9885 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1503801 >.

CALGAROTO, N. S. et al. Vitamin D(3) prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats. **Mol Cell Biochem,** v. 405, n. 1-2, p. 11-21, Jul 2015. ISSN 1573-4919 (Electronic)
0300-8177 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25893731 >.

CARDOSO, A. M. et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. **Mol Cell Biochem,** v. 371, n. 1-2, p. 147-56, Dec 2012. ISSN 1573-4919 (Electronic)
0300-8177 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915168 >.

CARDOSO, S. et al. Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia. **Biochim Biophys Acta,** v. 1802, n. 11, p. 942-51, Nov 2010. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620209 >.

CASELLA, S. et al. Molecular Pathways Regulating Macrovascular Pathology and Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype in Type 2 Diabetes. **Int J Mol Sci,** v. 16, n. 10, p. 24353-68, 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic)
1422-0067 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473856 >.

CECHELLA, J. L. et al. Moderate swimming exercise and caffeine supplementation reduce the levels of inflammatory cytokines without causing oxidative stress in tissues of middle-aged rats. **Amino Acids,** v. 46, n. 5, p. 1187-95, May 2014. ISSN 1438-2199 (Electronic)
0939-4451 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481487 >.

CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca2+ -stimulated ATPase activity. **Anal Biochem,** v. 157, n. 2, p. 375-80, Sep 1986. ISSN 0003-2697 (Print)
0003-2697 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2946250 >.

CHANG-CHEN, K. J.; MULLUR, R.; BERNAL-MIZRACHI, E. Beta-cell failure as a complication of diabetes. **Rev Endocr Metab Disord,** v. 9, n. 4, p. 329-43, Dec 2008. ISSN 1389-9155 (Print)
1389-9155 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777097 >.

CHATUPHONPRASERT, W.; LAO-ONG, T.; JARUKAMJORN, K. Improvement of superoxide dismutase and catalase in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2-diabetes in mice by berberine and glibenclamide. **Pharm Biol**, Nov 5 2013. ISSN 1744-5116 (Electronic)
1388-0209 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188560 >.

CHENG, Y. et al. Enhanced lipid peroxidation by extracellular ATP in PC12 cells. **Neurochem Res,** v. 21, n. 1, p. 27-33, Jan 1996. ISSN 0364-3190 (Print)
0364-3190 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8833220 >.

CHETYRKIN, S. et al. Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. **Biochemistry,** v. 50, n. 27, p. 6102-12, Jul 12 2011. ISSN 1520-4995 (Electronic)
0006-2960 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21661747 >.

CHIA, J. S. et al. The protective effects of CD39 overexpression in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Diabetes,** v. 62, n. 6, p. 2026-35, Jun 2013. ISSN 1939-327X (Electronic)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364452 >.

CHO, A. S. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food Chem Toxicol,** v. 48, n. 3, p. 937-43, Mar 2010. ISSN 1873-6351 (Electronic)
0278-6915 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064576 >.

CHOI, J. W. Influence of caffeine on the responsiveness of human platelet to agonists. **Thromb Res,** v. 110, n. 4, p. 209-12, Jun 1 2003. ISSN 0049-3848 (Print)
0049-3848 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512083 >.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal Science Food Agriculture,** v. 79, p. 362-372, 1999. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3%3C362::AID-JSFA256%3E3.0.CO;2-D/abstract >.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes,** v. 54 Suppl 2, p. S97-107, Dec 2005. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306347 >.

COLEMAN, E. et al. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. **Glia,** v. 48, n. 2, p. 166-78, Nov 1 2004. ISSN 0894-1491 (Print)
0894-1491 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378652 >.

COLGAN, S. P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal,** v. 2, n. 2, p. 351-60, Jun 2006. ISSN 1573-9538 (Print)
1573-9538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404475 >.

COLWELL, J. A.; NESTO, R. W. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. **Diabetes Care,** v. 26, n. 7, p. 2181-8, Jul 2003. ISSN 0149-5992 (Print)
0149-5992 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832332 >.

CORREA, T. A. et al. Paper-filtered coffee increases cholesterol and inflammation biomarkers independent of roasting degree: a clinical trial. **Nutrition,** v. 29, n. 7-8, p. 977-81, Jul-Aug 2013. ISSN 1873-1244 (Electronic)
0899-9007 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510568 >.

COSTENLA, A. R.; CUNHA, R. A.; DE MENDONCA, A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. **J Alzheimers Dis,** v. 20 Suppl 1, p. S25-34, 2010. ISSN 1875-8908 (Electronic)
1387-2877 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182030 >.

COUTINHO-SILVA, R. et al. P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. **Mol Cell Endocrinol,** v. 204, n. 1-2, p. 141-54, Jun 30 2003. ISSN 0303-7207 (Print)
0303-7207 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850289 >.

COUTINHO-SILVA, R. et al. Changes in expression of P2X7 receptors in NOD mouse pancreas during the development of diabetes. **Autoimmunity,** v. 40, n. 2, p. 108-16, Mar 2007. ISSN 0891-6934 (Print)
0891-6934 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364502 >.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep,** v. 26, n. 8, p. 1001-43, Aug 2009. ISSN 0265-0568 (Print)
0265-0568 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19636448 >.

CROZIER, T. W. et al. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. **Food Funct,** v. 3, n. 1, p. 30-3, Jan 2012. ISSN 2042-650X (Electronic)
2042-6496 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130653 >.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. **Purinergic Signal,** v. 1, n. 2, p. 111-34, Jun 2005. ISSN 1573-9538 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404497 >.

DAVI, G.; PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. **N Engl J Med,** v. 357, n. 24, p. 2482-94, Dec 13 2007. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077812 >.

DE BONA, K. S. et al. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: beneficial effect of Syzygium cumini leaf extract in vitro. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 94, n. 1, p. 84-90, Oct 2011. ISSN 1872-8227 (Electronic)
0168-8227 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737173 >.

DE BONA, K. S. et al. Syzygium cumini is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions in vitro. **J Physiol Biochem,** v. 70, n. 2, p. 321-30, Jun 2014. ISSN 1877-8755 (Electronic)

1138-7548 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24407852 >.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **J Agric Food Chem,** v. 50, n. 13, p. 3698-703, Jun 19 2002. ISSN 0021-8561 (Print)
0021-8561 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12059145 >.

DELEKATE, A. et al. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. **Nat Commun,** v. 5, p. 5422, 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic)
2041-1723 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25406732 >.

DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Res,** v. 72, n. 21, p. 5441-7, Nov 1 2012. ISSN 1538-7445 (Electronic)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090120 >.

DOEHNER, W.; LANDMESSER, U. Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options. **Semin Nephrol,** v. 31, n. 5, p. 433-40, Sep 2011. ISSN 1558-4488 (Electronic)
0270-9295 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000650

DOS SANTOS, M. D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biol Pharm Bull,** v. 29, n. 11, p. 2236-40, Nov 2006. ISSN 0918-6158 (Print)
0918-6158 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077520 >.

DUARTE, J. M. et al. Caffeine consumption prevents diabetes-induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NONcZNO10/LTJ mice. **PLoS One,** v. 7, n. 4, p. e21899, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514596 >.

DUARTE, J. M. et al. Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Neurochem Int,** v. 48, n. 2, p. 144-50, Jan 2006. ISSN 0197-0186 (Print)
0197-0186 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16256246 >.

DUARTE, J. M. et al. Modification of purinergic signaling in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuroscience,** v. 149, n. 2, p. 382-91, Oct 26 2007. ISSN 0306-4522 (Print)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17869435 >.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu Rev Neurosci,** v. 24, p. 31-55, 2001. ISSN 0147-006X (Print)
0147-006X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283304 >.

DWYER, K. M. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signal,** v. 3, n. 1-2, p. 171-80, Mar 2007. ISSN 1573-9538 (Print)
1573-9538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404431 >.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. **N Engl J Med,** v. 368, n. 13, p. 1260, Mar 28 2013. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23534573 >.

EMANUELLI, T. et al. Effects of 5-aminolevulinic acid on the glutamatergic neurotransmission. **Neurochem Int,** v. 42, n. 2, p. 115-21, Jan 2003. ISSN 0197-0186 (Print) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421591 >.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **J Nutr,** v. 138, n. 12, p. 2309-15, Dec 2008. ISSN 1541-6100 (Electronic) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022950 >.

FARAH, A. D., C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology,** v. 18, p. 23-36, 2006. ISSN 1677-0420. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1677-04202006000100003&script=sci_arttext >.

FAUSTHER, M. et al. Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v. 292, n. 3, p. G785-95, Mar 2007. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095758 >.

FERNANDEZ-GOMEZ, B. et al. New knowledge on the antiglycoxidative mechanism of chlorogenic acid. **Food Funct,** v. 6, n. 6, p. 2081-90, Jun 2015. ISSN 2042-650X (Electronic) 2042-6496 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26037734 >.

FERREIRA, I. A. et al. Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 26, n. 2, p. 417-22, Feb 2006. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339499 >.

FREDHOLM, B. B. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. **Pharmacol Toxicol,** v. 76, n. 2, p. 93-101, Feb 1995. ISSN 0901-9928 (Print) 0901-9928 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7746802 >.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev,** v. 51, n. 1, p. 83-133, Mar 1999. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049999 >.

FUENTES, E. et al. Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation. **PLoS One,** v. 9, n. 3, p. e90699, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24598787 >.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Curr Protoc Pharmacol,** v. 70, p. 5 47 1-20, 2015. ISSN 1934-8290 (Electronic) 1934-8282 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331889 >.

FURTADO, K. S. et al. Coffee and caffeine protect against liver injury induced by thioacetamide in male Wistar rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol,** v. 111, n. 5, p. 339-47, Nov 2012. ISSN 1742-7843 (Electronic) 1742-7835 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22646289 >.

FURUSYO, N.; HAYASHI, J. Glycated albumin and diabetes mellitus. **Biochim Biophys Acta,** v. 1830, n. 12, p. 5509-14, Dec 2013. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673238 >.

GAKKAI, B. S. **Saúde é sabedoria**. Terceira Civilização 22 p. 2012.

GANNON, M. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. **Trends Genet,** v. 17, n. 10, p. S23-8, Oct 2001. ISSN 0168-9525 (Print)
0168-9525 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585673 >.

GARCIA-SOUZA, L. F.; OLIVEIRA, M. F. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 50, p. 156-60, May 2014. ISSN 1878-5875 (Electronic)
1357-2725 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569121 >.

GASPARYAN, A. Y. et al. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? **Curr Pharm Des,** v. 17, n. 1, p. 47-58, 2011. ISSN 1873-4286 (Electronic)
1381-6128 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247392 >.

GENUTH, S. et al. Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes. **Diabetes,** v. 64, n. 1, p. 266-78, Jan 2015. ISSN 1939-327X (Electronic)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187362 >.

GILON, P. et al. Calcium signaling in pancreatic beta-cells in health and in Type 2 diabetes. **Cell Calcium,** v. 56, n. 5, p. 340-61, Nov 2014. ISSN 1532-1991 (Electronic)
0143-4160 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25239387 >.

GISPEN, W. H.; BIESSELS, G. J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. **Trends Neurosci,** v. 23, n. 11, p. 542-9, Nov 2000. ISSN 0166-2236 (Print)
0166-2236 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074263 >.

GLAS, R. et al. Purinergic P2X7 receptors regulate secretion of interleukin-1 receptor antagonist and beta cell function and survival. **Diabetologia,** v. 52, n. 8, p. 1579-88, Aug 2009. ISSN 1432-0428 (Electronic)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396427 >.

GOLD, M.; EL KHOURY, J. beta-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. **Semin Immunopathol,** v. 37, n. 6, p. 607-11, Nov 2015. ISSN 1863-2300 (Electronic)
1863-2297 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26251237 >.

GRANT, R. W.; DIXIT, V. D. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. **Front Immunol,** v. 4, p. 50, 2013. ISSN 1664-3224 (Electronic)
1664-3224 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483669 >.

GRAY, S. P. et al. NADPH oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atheroclerois. **Circulation,** v. 127, n. 18, p. 1888-902, May 7 2013. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564668 >.

GREENBERG, J. A.; BOOZER, C. N.; GELIEBTER, A. Coffee, diabetes, and weight control. **Am J Clin Nutr,** v. 84, n. 4, p. 682-93, Oct 2006. ISSN 0002-9165 (Print)
0002-9165 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023692 >.

GROSSO, G. et al. Effects of vitamin C on health: a review of evidence. **Front Biosci (Landmark Ed),** v. 18, p. 1017-29, 2013. ISSN 1093-4715 (Electronic)
1093-4715 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747864 >.

GUTIERRES, J. M. et al. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Sci,** v. 96, n. 1-2, p. 7-17, Feb 6 2014. ISSN 1879-0631 (Electronic)
0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291256 >.

GUTIERRES, J. M. et al. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sci,** v. 91, n. 23-24, p. 1221-8, Dec 10 2012. ISSN 1879-0631 (Electronic)
0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23044227 >.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans,** v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, Nov 2007. ISSN 0300-5127 (Print)
0300-5127 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956298 >.

_____. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev,** v. 70, n. 5, p. 257-65, May 2012. ISSN 1753-4887 (Electronic)
0029-6643 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537212 >.

HARDIKAR, A. A.; KARANDIKAR, M. S.; BHONDE, R. R. Effect of partial pancreatectomy on diabetic status in BALB/c mice. **J Endocrinol,** v. 162, n. 2, p. 189-95, Aug 1999. ISSN 0022-0795 (Print)
0022-0795 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10425456 >.

HATTORI, M.; GOUAUX, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. **Nature,** v. 485, n. 7397, p. 207-12, May 10 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535247 >.

HECHLER, B.; GACHET, C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 35, n. 11, p. 2307-15, Nov 2015. ISSN 1524-4636 (Electronic)
1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26359511 >.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **J Food Sci,** v. 75, n. 3, p. R77-87, Apr 2010. ISSN 1750-3841 (Electronic)
0022-1147 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20492310 >.

HEINE, P. et al. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. **Eur J Biochem,** v. 262, n. 1, p. 102-7, May 1999. ISSN 0014-2956 (Print)
0014-2956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10231370 >.

HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D. M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab,** v. 15 Suppl 3, p. 39-50, Sep 2013. ISSN 1463-1326 (Electronic)
1462-8902 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24003920 >.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol,** v. 26, n. 4, p. 277-85, Oct 1989. ISSN 0037-1963 (Print)
0037-1963 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683097 >.

HEYMANN, D.; REDDINGTON, M.; KREUTZBERG, G. W. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. **J Neurochem,** v. 43, n. 4, p. 971-8, Oct 1984. ISSN 0022-3042 (Print)
0022-3042 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088700 >.

HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. **Biochem J,** v. 256, n. 1, p. 205-12, Nov 15 1988. ISSN 0264-6021 (Print)
0264-6021 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2851978 >.

IDZKO, M. et al. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. **Blood,** v. 124, n. 7, p. 1029-37, Aug 14 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001468 >.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nat Rev Microbiol,** v. 11, n. 7, p. 443-54, Jul 2013. ISSN 1740-1534 (Electronic)
1740-1526 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23712352 >.

IMLAY, J. A.; FRIDOVICH, I. Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli. **J Biol Chem,** v. 266, n. 11, p. 6957-65, Apr 15 1991. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849898 >.

ISER, B. P. M. S., S. R.; CHUERI, P. S.; SZWARCWALD, C. L.; MALTA, D. C.; MONTEIRO, H. O. C.; DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I. Self-reported diabetes prevalence in Brazil: results from National Health Survey 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** v. 24, n. 2, p. 305-314, 2015.

ISHIDA, K. et al. Activated platelets from diabetic rats cause endothelial dysfunction by decreasing Akt/endothelial NO synthase signaling pathway. **PLoS One,** v. 9, n. 7, p. e102310, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25047034 >.

ITO, W. D. et al. Differential impact of diabetes mellitus type II and arterial hypertension on collateral artery growth and concomitant macrophage accumulation. **Vasa,** v. 44, n. 1, p. 31-41, Jan 2015. ISSN 0301-1526 (Print)
0301-1526 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25537056 >.

JANGALE, N. M. et al. Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Food Chem,** v. 141, n. 1, p. 187-95, Nov 1 2013. ISSN 0308-8146 (Print)
0308-8146 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768346 >.

JAYANARAYANAN, S. et al. NMDA and AMPA receptor mediated excitotoxicity in cerebral cortex of streptozotocin induced diabetic rat: ameliorating effects of curcumin. **Chem Biol Interact,** v. 201, n. 1-3, p. 39-48, Jan 25 2013. ISSN 1872-7786 (Electronic)
0009-2797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267840 >.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **Am J Clin Nutr,** v. 78, n. 4, p. 728-33, Oct 2003. ISSN 0002-9165 (Print)
0002-9165 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522730 >.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: physiology and biochemistry. **Semin Thromb Hemost,** v. 31, n. 4, p. 381-92, 2005. ISSN 0094-6176 (Print)
0094-6176 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16149014 >.

KAMBOJ, S. S.; CHOPRA, K.; SANDHIR, R. Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound enzymes: beneficial effect of N-acetylcysteine supplementation. **Neuroscience,** v. 162, n. 2, p. 349-58, Aug 18 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426784 >.

KANETO, H. et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. **J Biol Chem,** v. 277, n. 33, p. 30010-8, Aug 16 2002. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011047 >.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V. P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **Gen Physiol Biophys,** v. 29, n. 1, p. 23-30, Mar 2010. ISSN 0231-5882 (Print)
0231-5882 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371877 >.

KHEMKA, V. K. et al. Raised serum adenosine deaminase level in nonobese type 2 diabetes mellitus. **ScientificWorldJournal,** v. 2013, p. 404320, 2013. ISSN 1537-744X (Electronic)
1537-744X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453844 >.

KIM, J. H.; BAE, H. Y.; KIM, S. Y. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. **Diabetes Metab J,** v. 37, n. 6, p. 423-8, Dec 2013. ISSN 2233-6079 (Print)
2233-6079 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24404513 >.

KING, A.; BOWE, J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. **Biochem Pharmacol,** v. 99, p. 1-10, Jan 1 2016. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26432954 >.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends Biochem Sci,** v. 32, n. 1, p. 44-50, Jan 2007. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158050 >.

KNOWLES, A. F.; LI, C. Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain. **Biochemistry,** v. 45, n. 23, p. 7323-33, Jun 13 2006. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16752921 >.

KONO, H. et al. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. **J Clin Invest,** v. 120, n. 6, p. 1939-49, Jun 2010. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501947 >.

KOUPENOVA, M.; RAVID, K. Adenosine, adenosine receptors and their role in glucose homeostasis and lipid metabolism. **J Cell Physiol**, Mar 4 2013. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460239 >.

KROTZ, F.; SOHN, H. Y.; POHL, U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v. 24, n. 11, p. 1988-96, Nov 2004. ISSN 1524-4636 (Electronic)
1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374851 >.

KUHAD, A.; SETHI, R.; CHOPRA, K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. **Life Sci,** v. 83, n. 3-4, p. 128-34, Jul 18 2008. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18585396 >.

KURTUL, N. et al. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. **Acta Medica (Hradec Kralove),** v. 47, n. 1, p. 33-5, 2004. ISSN 1211-4286 (Print) 1211-4286 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168879 >.

KWON, S. H. et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **Eur J Pharmacol,** v. 649, n. 1-3, p. 210-7, Dec 15 2010. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20854806 >.

LANCA, A. J.; ISRAEL, Y. Histochemical demonstration of sinusoidal gamma-glutamyltransferase activity by substrate protection fixation: comparative studies in rat and guinea pig liver. **Hepatology,** v. 14, n. 5, p. 857-63, Nov 1991. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1718834 >.

LANGER, D. et al. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. **Cell Tissue Res,** v. 334, n. 2, p. 199-217, Nov 2008. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843508 >.

LAVOIE, E. G. et al. Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,** v. 300, n. 4, p. G608-20, Apr 2011. ISSN 1522-1547 (Electronic)
0193-1857 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233276 >.

LI, Y. et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. **Environ Toxicol Pharmacol,** v. 26, n. 1, p. 13-21, Jul 2008. ISSN 1382-6689 (Print)
1382-6689 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783882 >.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. **Molecules,** v. 19, n. 11, p. 19180-208, 2014. ISSN 1420-3049 (Electronic)
1420-3049 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415479 >.

LIGTHART, S. et al. Lifetime risk of developing impaired glucose metabolism and eventual progression from prediabetes to type 2 diabetes: a prospective cohort study. **Lancet Diabetes Endocrinol,** v. 4, n. 1, p. 44-51, Jan 2016. ISSN 2213-8595 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26575606 >.

LIU, J. et al. AGEs Induce Apoptosis in Rat Osteoblast Cells by Activating the Caspase-3 Signaling Pathway Under a High-Glucose Environment In Vitro. **Appl Biochem Biotechnol,** v. 178, n. 5, p. 1015-27, Mar 2016. ISSN 1559-0291 (Electronic)
0273-2289 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26573666 >.

LOHMAN, A. W.; BILLAUD, M.; ISAKSON, B. E. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. **Cardiovasc Res,** v. 95, n. 3, p. 269-80, Aug 1 2012. ISSN 1755-3245 (Electronic)
0008-6363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678409 >.

LORIST, M. M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue, and cognition. **Brain Cogn,** v. 53, n. 1, p. 82-94, Oct 2003. ISSN 0278-2626 (Print)
0278-2626 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572506 >.

LOU, L. et al. Chlorogenic acid and luteolin synergistically inhibit the proliferation of interleukin-1beta-induced fibroblast-like synoviocytes through regulating the activation of NF-kappaB and JAK/STAT-signaling pathways. **Immunopharmacol Immunotoxicol,** v. 37, n. 6, p. 499-507, 2015. ISSN 1532-2513 (Electronic)
0892-3973 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26471424 >.

LOZANO, I. et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. **Nutr Metab (Lond),** v. 13, p. 15, 2016. ISSN 1743-7075 (Electronic)
1743-7075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918024 >.

LUDWIG, I. A. et al. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food Funct,** v. 5, n. 8, p. 1695-717, Aug 2014. ISSN 2042-650X (Electronic)
2042-6496 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671262 >.

LUDWIG, I. A. et al. Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking? **Food Funct,** v. 5, n. 8, p. 1718-26, Aug 2014. ISSN 2042-650X (Electronic)
2042-6496 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014672 >.

LUNKES, G. I. et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 81, n. 3, p. 351-7, Sep 2008. ISSN 1872-8227 (Electronic)
0168-8227 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644642 >.

LUNKES, G. I. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 65, n. 1, p. 1-6, Jul 2004. ISSN 0168-8227 (Print)
0168-8227 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163471 >.

LYTVYN, Y.; PERKINS, B. A.; CHERNEY, D. Z. Uric acid as a biomarker and a therapeutic target in diabetes. **Can J Diabetes,** v. 39, n. 3, p. 239-46, Jun 2015. ISSN 2352-3840 (Electronic)
1499-2671 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600084 >.

MACIEL, R. M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. **Res Vet Sci,** v. 95, n. 2, p. 389-97, Oct 2013. ISSN 1532-2661 (Electronic)
0034-5288 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706762 >.

MACKENZIE, N. C. et al. New insights into NPP1 function: lessons from clinical and animal studies. **Bone,** v. 51, n. 5, p. 961-8, Nov 2012. ISSN 1873-2763 (Electronic)
1873-2763 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842219 >.

MAEDLER, K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J Clin Invest,** v. 110, n. 6, p. 851-60, Sep 2002. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235117 >.

MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. **Ann N Y Acad Sci,** v. 777, p. 380-7, Jan 17 1996. ISSN 0077-8923 (Print)
0077-8923 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624117 >.

MARCHETTI, P. et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. **Diabetologia,** v. 50, n. 12, p. 2486-94, Dec 2007. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906960 >.

MARGIS, R. et al. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. **FEBS J,** v. 275, n. 15, p. 3959-70, Aug 2008. ISSN 1742-464X (Print)
1742-464X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18616466 >.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B., 3RD. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol,** v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003. ISSN 1095-6670 (Print)
1095-6670 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12616644 >.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol,** v. 27, p. 229-65, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302040 >.

MAYOR, S. Risk of developing diabetes increases with time spent watching TV, study shows. **BMJ,** v. 350, p. h1800, 2015. ISSN 1756-1833 (Electronic)
0959-535X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838354 >.

MCCALL, A. L. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. **Eur J Pharmacol,** v. 490, n. 1-3, p. 147-58, Apr 19 2004. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15094081 >.

MCCARTY, M. F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. **Med Hypotheses,** v. 64, n. 4, p. 848-53, 2005. ISSN 0306-9877 (Print)
0306-9877 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694706 >.

MENG, B.; LI, J.; CAO, H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. **Curr Pharm Des,** v. 19, n. 11, p. 2101-13, 2013. ISSN 1873-4286 (Electronic)
1381-6128 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23116316 >.

MIJNHOUT, G. S. et al. Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition. **Diabetologia,** v. 49, n. 6, p. 1447-8, Jun 2006. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16598451 >.

MIKAMI, Y.; YAMAZAWA, T. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. **Life Sci,** v. 139, p. 69-74, Oct 15 2015. ISSN 1879-0631 (Electronic)
0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26285175 >.

MISCIAGNA, G.; DE MICHELE, G.; TREVISAN, M. Non enzymatic glycated proteins in the blood and cardiovascular disease. **Curr Pharm Des,** v. 13, n. 36, p. 3688-95, 2007. ISSN 1873-4286 (Electronic)
1381-6128 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220807 >.

MISSO, N. L.; THOMPSON, P. J. Xanthines inhibit human platelet aggregation induced by platelet-activating factor. **Clin Exp Pharmacol Physiol,** v. 19, n. 8, p. 599-602, Aug 1992. ISSN 0305-1870 (Print)
0305-1870 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1526066 >.

MORIWAKI, Y.; YAMAMOTO, T.; HIGASHINO, K. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. **Histol Histopathol,** v. 14, n. 4, p. 1321-40, Oct 1999. ISSN 0213-3911 (Print)
0213-3911 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506947 >.

MUSHTAQ, N. et al. Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of strepotozotocin-induced diabetic rats. **J Physiol Biochem,** v. 71, n. 4, p. 743-51, Dec 2015. ISSN 1877-8755 (Electronic)
1138-7548 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26452500 >.

NAGY, A.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). **J Neurochem,** v. 43, n. 4, p. 1114-23, Oct 1984. ISSN 0022-3042 (Print)
0022-3042 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088694 >.

NATELLA, F. et al. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. **Br J Nutr,** v. 100, n. 6, p. 1276-82, Dec 2008. ISSN 1475-2662 (Electronic)
0007-1145 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439332 >.

NELSON, P. T. et al. Human cerebral neuropathology of Type 2 diabetes mellitus. **Biochim Biophys Acta,** v. 1792, n. 5, p. 454-69, May 2009. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789386 >.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature,** v. 404, n. 6779, p. 787-90, Apr 13 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783895 >.

NUNES, A. R. et al. Daily consumption of white tea (Camellia sinensis (L.)) improves the cerebral cortex metabolic and oxidative profile in prediabetic Wistar rats. **Br J Nutr,** v. 113, n. 5, p. 832-42, Mar 14 2015. ISSN 1475-2662 (Electronic)
0007-1145 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25716141 >.

OBOH, G. et al. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. **J Basic Clin Physiol Pharmacol,** v. 26, n. 2, p. 165-70, Mar 2015. ISSN 2191-0286 (Electronic)
0792-6855 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825096 >.

OBOH, G. et al. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. **Neurochem Res,** v. 38, n. 2, p. 413-9, Feb 2013. ISSN 1573-6903 (Electronic)
0364-3190 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184188 >.

OKIZAKI, S. et al. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF-beta1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. **Biomed Pharmacother,** v. 70, p. 317-25, Mar 2015. ISSN 1950-6007 (Electronic)
0753-3322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677561 >.

ORGANIZATION, W. H. **Global Report on Diabetes**. World Health Organization. 2014

_____. **Global report on diabetes.** http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/, 2016.

PALMA, H. E. et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Mol Cell Biochem,** v. 386, n. 1-2, p. 199-210, Jan 2014. ISSN 1573-4919 (Electronic)
0300-8177 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130039 >.

PARSONS, Z. D.; GATES, K. S. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases: methods for kinetic analysis of covalent enzyme inactivation. **Methods Enzymol,** v. 528, p. 129-54, 2013. ISSN 1557-7988 (Electronic)
0076-6879 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849863 >.

PASCUAL, O. et al. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. **Science,** v. 310, n. 5745, p. 113-6, Oct 7 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210541 >.

PETIT, P.; LAJOIX, A. D.; GROSS, R. P2 purinergic signalling in the pancreatic beta-cell: control of insulin secretion and pharmacology. **Eur J Pharm Sci,** v. 37, n. 2, p. 67-75, May 12 2009. ISSN 1879-0720 (Electronic)
0928-0987 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429412 >.

PI, J. et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 244, n. 1, p. 77-83, Apr 1 2010. ISSN 1096-0333 (Electronic)
0041-008X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501608 >.

PIMENTEL, V. C. et al. Hypoxia-ischemia alters nucleotide and nucleoside catabolism and Na+,K+-ATPase activity in the cerebral cortex of newborn rats. **Neurochem Res,** v. 38, n. 4, p. 886-94, Apr 2013. ISSN 1573-6903 (Electronic)
0364-3190 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397287 >.

PRABAKARAN, D.; ASHOKKUMAR, N. Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. **Biochimie,** v. 95, n. 2, p. 366-73, Feb 2013. ISSN 1638-6183 (Electronic)
0300-9084 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079336 >.

PRAUSE, M. et al. TRAF2 mediates JNK and STAT3 activation in response to IL-1beta and IFNgamma and facilitates apoptotic death of insulin-producing beta-cells. **Mol Cell Endocrinol,** v. 420, p. 24-36, Nov 22 2015. ISSN 1872-8057 (Electronic)
0303-7207 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610752 >.

RAFFAELLI, F. et al. In vitro effects of fermented papaya (Carica papaya, L.) on platelets obtained from patients with type 2 diabetes. **Nutr Metab Cardiovasc Dis,** v. 25, n. 2, p. 224-9, Feb 2015. ISSN 1590-3729 (Electronic)
0939-4753 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25511784 >.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev,** v. 50, n. 3, p. 413-92, Sep 1998. ISSN 0031-6997 (Print)
0031-6997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289 >.

ROBERTS-TOLER, C.; O'NEILL, B. T.; CYPESS, A. M. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. **Obesity (Silver Spring),** v. 23, n. 9, p. 1765-70, Sep 2015. ISSN 1930-739X (Electronic)
1930-7381 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26242777 >.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.

Purinergic Signal, v. 2, n. 2, p. 409-30, Jun 2006. ISSN 1573-9538 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404480 >.

ROBSON, S. C. et al. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. **Semin Thromb Hemost,** v. 31, n. 2, p. 217-33, Apr 2005. ISSN 0094-6176 (Print)
0094-6176 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15852225 >.

ROCHA, J. B. T. et al. Aminolevulinate dehydratase (δ-ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicology Research,** v. 1, p. 85-102, 2012.

ROCHETTE, L. et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta,** v. 1840, n. 9, p. 2709-29, Sep 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905298 >.

ROSCA, M. G. et al. Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes. **Diabetes,** v. 61, n. 8, p. 2074-83, Aug 2012. ISSN 1939-327X (Electronic)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22586586 >.

ROSEMBERG, D. B. et al. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,** v. 155, n. 3, p. 230-40, Mar 2010. ISSN 1879-1107 (Electronic)
1096-4959 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19922813 >.

RUDELLE, S. et al. Effect of a thermogenic beverage on 24-hour energy metabolism in humans. **Obesity (Silver Spring),** v. 15, n. 2, p. 349-55, Feb 2007. ISSN 1930-7381 (Print)
1930-7381 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299107 >.

RUGGERI, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nat Med,** v. 8, n. 11, p. 1227-34, Nov 2002. ISSN 1078-8956 (Print)
1078-8956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411949 >.

RUIZ, S. et al. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. **Kidney Int,** v. 83, n. 6, p. 1029-41, Jun 2013. ISSN 1523-1755 (Electronic)
0085-2538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325084 >.

RUTKIEWICZ, J.; GORSKI, J. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. **FEBS Lett,** v. 271, n. 1-2, p. 79-80, Oct 1 1990. ISSN 0014-5793 (Print)
0014-5793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2146155 >.

RYDER, J. M. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish products by high-performance liquid chromatography. **J Agric Food Chem,** v. 33, p. 678-80, 1985.

SAAB, S. et al. Impact of coffee on liver diseases: a systematic review. **Liver Int,** v. 34, n. 4, p. 495-504, Apr 2014. ISSN 1478-3231 (Electronic)
1478-3223 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24102757 >.

SADI, G.; BOZAN, D.; YILDIZ, H. B. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. **Mol Cell Biochem,** v. 393, n. 1-2, p. 111-22, Aug 2014. ISSN 1573-4919 (Electronic)
0300-8177 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740756 >.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. [Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition]. **Cad Saude Publica,** v. 19 Suppl 1, p. S29-36, 2003. ISSN 0102-311X (Print)
0102-311X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886433 >.

SCHETINGER, M. R. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors,** v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007. ISSN 0951-6433 (Print)
0951-6433 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806312 >.

SCHETINGER, M. R. et al. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. **Neurochem Res,** v. 25, n. 7, p. 949-55, Jul 2000. ISSN 0364-3190 (Print)
0364-3190 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10959491 >.

SCHMATZ, R. et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem Biophys,** v. 65, n. 2, p. 129-43, Mar 2013. ISSN 1559-0283 (Electronic)
1085-9195 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956389 >.

SCHMATZ, R. et al. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. **Brain Res Bull,** v. 80, n. 6, p. 371-6, Dec 16 2009. ISSN 1873-2747 (Electronic)
0361-9230 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723569 >.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie,** v. 94, n. 2, p. 374-83, Feb 2012. ISSN 1638-6183 (Electronic)
0300-9084 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864646 >.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci,** v. 84, n. 11-12, p. 345-50, Mar 13 2009. ISSN 1879-0631 (Electronic)
0024-3205 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19166862 >.

SCHNEDL, W. J. et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes,** v. 43, n. 11, p. 1326-33, Nov 1994. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926307 >.

SCHOBER, E. et al. Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: experience from a large multicentre database. **Diabet Med,** v. 26, n. 5, p. 466-73, May 2009. ISSN 1464-5491 (Electronic)
0742-3071 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646184 >.

SCHULINGKAMP, R. J. et al. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 24, n. 8, p. 855-72, Dec 2000. ISSN 0149-7634 (Print)
0149-7634 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118610 >.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEICA, R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochim Biophys Acta,** v. 1832, n. 12, p. 2216-31, Dec 2013. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994612 >.

SHEETZ, M. J.; KING, G. L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **JAMA,** v. 288, n. 20, p. 2579-88, Nov 27 2002. ISSN 0098-7484 (Print)
0098-7484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444865 >.

SHI, G.; MORRELL, C. N. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. **Thromb Res,** v. 127, n. 5, p. 387-90, May 2011. ISSN 1879-2472 (Electronic)
0049-3848 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094986 >.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem,** v. 215, n. 2, p. 213-9, Jul 15 1993. ISSN 0014-2956 (Print)
0014-2956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688300 >.

SIMÔES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. 2007. 1104.

SOLINI, A.; USUELLI, V.; FIORINA, P. The dark side of extracellular ATP in kidney diseases. **J Am Soc Nephrol,** v. 26, n. 5, p. 1007-16, May 2015. ISSN 1533-3450 (Electronic)
1046-6673 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452669 >.

SON, H. et al. Type 1 diabetes alters astrocytic properties related with neurotransmitter supply, causing abnormal neuronal activities. **Brain Res,** v. 1602, p. 32-43, Mar 30 2015. ISSN 1872-6240 (Electronic)
0006-8993 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25578257 >.

SPANEVELLO, R. et al. Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. **Brain Res Bull,** v. 80, n. 1-2, p. 45-51, Aug 28 2009. ISSN 1873-2747 (Electronic)
0361-9230 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463911 >.

SPANEVELLO, R. M. et al. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **J Neurol,** v. 257, n. 1, p. 24-30, Jan 2010. ISSN 1432-1459 (Electronic)
0340-5354 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629564 >.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacol Res,** v. 52, n. 4, p. 313-20, Oct 2005. ISSN 1043-6618 (Print)
1043-6618 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15979893 >.

STALMACH, A. et al. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. **Drug Metab Dispos,** v. 37, n. 8, p. 1749-58, Aug 2009. ISSN 1521-009X (Electronic)
0090-9556 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460943 >.

STALMACH, A.; WILLIAMSON, G.; CROZIER, A. Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. **Food Funct,** v. 5, n. 8, p. 1727-37, Aug 2014. ISSN 2042-650X (Electronic)
2042-6496 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947504 >.

STEFANELLO, N. et al. Chlorogenic acid, caffeine and coffee reverse damages in liver, kidney and pancreas parameters of diabetic rats. **Journal of Diabetes and Health,** v. 108, p. 214-228, 2014. Disponível em: < https://sites.google.com/site/photonfoundationorganization/home/journal-of-diabetes-and-health >.

STEFANELLO, N. et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. **Mol Cell Biochem,** v. 388, n. 1-2, p. 277-86, Mar 2014. ISSN 1573-4919 (Electronic)
0300-8177 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24370728 >.

STRATER, N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. **Purinergic Signal,** v. 2, n. 2, p. 343-50, Jun 2006. ISSN 1573-9538 (Print)
1573-9538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404474 >.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W. Redox regulation of transcriptional activators. **Free Radic Biol Med,** v. 21, n. 3, p. 335-48, 1996. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8855444 >.

SUN, Y. M. et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 433, n. 4, p. 359-61, Apr 19 2013. ISSN 1090-2104 (Electronic)
0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541575 >.

SZYMONIK-LESIUK, S. et al. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. **J Hepatobiliary Pancreat Surg,** v. 10, n. 4, p. 309-15, 2003. ISSN 0944-1166 (Print)
0944-1166 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14598152 >.

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 28 Suppl 1, p. 8-14, Feb 2012. ISSN 1520-7560 (Electronic)
1520-7552 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271716 >.

TRIPLITT, C. L. Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation. **Am J Manag Care,** v. 18, n. 1 Suppl, p. S11-6, Jan 2012. ISSN 1936-2692 (Electronic)
1088-0224 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22559853 >.

TRUDEAU, F.; GAGNON, S.; MASSICOTTE, G. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. **Eur J Pharmacol,** v. 490, n. 1-3, p. 177-86, Apr 19 2004. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15094084 >.

TSIKAS, D. et al. No effects of atorvastatin (10 mg/d or 80 mg/d) on nitric oxide, prostacyclin, thromboxane and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients of the DALI study. **Pharmacol Res,** v. 94, p. 1-8, Apr 2015. ISSN 1096-1186 (Electronic)
1043-6618 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662039 >.

VALCHEVA-KUZMANOVA, S. et al. Effects of chlorogenic acid on learning and memory in rats. **Trakia Journal of Sciences,** v. 12, p. 132-136, 2014. ISSN 1313-3551.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)
1357-2725 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905 >.

VAN DAM, R. M. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. **Nutr Metab Cardiovasc Dis,** v. 16, n. 1, p. 69-77, Jan 2006. ISSN 0939-4753 (Print)
0939-4753 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399494 >.

_____. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. **Appl Physiol Nutr Metab,** v. 33, n. 6, p. 1269-83, Dec 2008. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088789 >.

VARANI, K. et al. Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A(2A) receptors : functional and biochemical aspects. **Circulation,** v. 102, n. 3, p. 285-9, Jul 18 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899090 >.

VAZZANA, N. et al. Diabetes mellitus and thrombosis. **Thromb Res,** v. 129, n. 3, p. 371-7, Mar 2012. ISSN 1879-2472 (Electronic)
0049-3848 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197180 >.

VERZELLONI, E. T., D.; DEL RIO, D.;CALANI, L.; CONTE, A. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. **Food Chem,** v. 124, n. 4, p. 1430–1435, 2011.

VIEIRA, F. S. et al. P2X7 receptor knockout prevents streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. **Mol Cell Endocrinol**, Oct 23 2015. ISSN 1872-8057 (Electronic)
0303-7207 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483196 >.

_____. P2X7 receptor knockout prevents streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. **Mol Cell Endocrinol,** v. 419, p. 148-57, Jan 5 2016. ISSN 1872-8057 (Electronic)
0303-7207 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483196 >.

WADA, J.; MAKINO, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clin Sci (Lond),** v. 124, n. 3, p. 139-52, Feb 2013. ISSN 1470-8736 (Electronic)
0143-5221 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075333 >.

WANG, C. Y.; GUO, X. C.; ZHANG, J. P. Research Advances in NLRP3 Inflammasome-related Regulatory Mechanisms. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao,** v. 37, n. 5, p. 618-22, Oct 31 2015. ISSN 1000-503X (Print)
1000-503X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26564518 >.

WANG, R. N.; KLOPPEL, G.; BOUWENS, L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. **Diabetologia,** v. 38, n. 12, p. 1405-11, Dec 1995. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786013 >.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. **J Biol Chem,** v. 273, n. 18, p. 11392-9, May 1 1998. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9556635 >.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. **Sci Signal,** v. 3, n. 105, p. cm2, 2010. ISSN 1937-9145 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086236 >.

WILDING, J. P. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. **Metabolism,** v. 63, n. 10, p. 1228-37, Oct 2014. ISSN 1532-8600 (Electronic)
0026-0495 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104103 >.

WINKLER, B. S.; ORSELLI, S. M.; REX, T. S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. **Free Radic Biol Med,** v. 17, n. 4, p. 333-49, Oct 1994. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001837 >.

WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Ann Nutr Metab,** v. 51, n. 4, p. 301-23, 2007. ISSN 1421-9697 (Electronic)
0250-6807 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726308 >.

WU-ZHANG, A. X.; NEWTON, A. C. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. **Biochem J,** v. 452, n. 2, p. 195-209, Jun 1 2013. ISSN 1470-8728 (Electronic)
0264-6021 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662807 >.

YAMAUCHI, R. et al. Coffee and caffeine ameliorate hyperglycemia, fatty liver, and inflammatory adipocytokine expression in spontaneously diabetic KK-Ay mice. **J Agric Food Chem,** v. 58, n. 9, p. 5597-603, May 12 2010. ISSN 1520-5118 (Electronic)
0021-8561 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20405946 >.

YANG, C. S.; SUH, N.; KONG, A. N. Does vitamin E prevent or promote cancer? Cancer Prev Res (Phila), v. 5, n. 5, p. 701-5, May 2012. ISSN 1940-6215 (Electronic)
1940-6215 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22490437 >.

YANG, N. et al. Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects. **Food Chem,** v. 211, p. 206-14, Nov 15 2016. ISSN 0308-8146 (Print)
0308-8146 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283624 >.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim Biophys Acta,** v. 1783, n. 5, p. 673-94, May 2008. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18302942 >.

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Crit Rev Biochem Mol Biol,** v. 49, n. 6, p. 473-97, Nov-Dec 2014. ISSN 1549-7798 (Electronic)
1040-9238 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418535 >.

_____. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. **Crit Rev Biochem Mol Biol,** v. 49, n. 6, p. 473-97, Nov-Dec 2014. ISSN 1549-7798 (Electronic)
1040-9238 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418535 >.

ZANG, L. Y. et al. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. **Mol Cell Biochem,** v. 247, n. 1-2, p. 205-10, May 2003. ISSN 0300-8177 (Print)
0300-8177 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12841649 >.

ZANINI, D. et al. delta-Aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress. **Biomed Pharmacother,** v. 68, n. 5, p. 603-9, Jun 2014. ISSN 1950-6007 (Electronic)
0753-3322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855033 >.

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomed Pharmacother,** v. 66, n. 1, p. 40-5, Feb 2012. ISSN 1950-6007 (Electronic)
0753-3322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22244962 >.

ZAVIALOV, A. V.; ENGSTROM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochem J,** v. 391, n. Pt 1, p. 51-7, Oct 1 2005. ISSN 1470-8728 (Electronic)
0264-6021 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15926889 >.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med,** v. 33, n. 3, p. 337-49, Aug 1 2002. ISSN 0891-5849 (Print)
0891-5849 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126755 >.

ZHANG, X. et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Injury,** v. 41, n. 7, p. 746-52, Jul 2010. ISSN 1879-0267 (Electronic)
0020-1383 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227691 >.

ZHAO, Y. et al. Prevalence of other diabetes-associated complications and comorbidities and its impact on health care charges among patients with diabetic neuropathy. **J Diabetes Complications,** v. 24, n. 1, p. 9-19, Jan-Feb 2010. ISSN 1873-460X (Electronic)
1056-8727 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930413 >.

ZHENG, Y. et al. Metabonomic profiles delineate potential role of glutamate-glutamine cycle in db/db mice with diabetes-associated cognitive decline. **Mol Brain,** v. 9, p. 40, 2016. ISSN 1756-6606 (Electronic)
1756-6606 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090642 >.

ZHOU, L.; SCHMAIER, A. H. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. **Am J Clin Pathol,** v. 123, n. 2, p. 172-83, Feb 2005. ISSN 0002-9173 (Print)
0002-9173 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15842039 >.

ZHU, K. et al. NADPH oxidase NOX1 is involved in activation of protein kinase C and premature senescence in early stage diabetic kidney. **Free Radic Biol Med,** v. 83, p. 21-30, Jun 2015. ISSN 1873-4596 (Electronic)
0891-5849 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701431 >.

ZHU, W.; LI, W.; SILVERSTEIN, R. L. Advanced glycation end products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36. **Blood,** v. 119, n. 25, p. 6136-44, Jun 21 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431576 >.

ZIMMERMANN, H. Nucleotides and cd39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. **Nat Med,** v. 5, n. 9, p. 987-8, Sep 1999. ISSN 1078-8956 (Print)
1078-8956 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470068 >.

_____. Ectonucleotidases in the nervous system. **Novartis Found Symp,** v. 276, p. 113-28; discussion 128-30, 233-7, 275-81, 2006. ISSN 1528-2511 (Print)
1528-2511 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805426 >.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal,** v. 8, n. 3, p. 437-502, Sep 2012. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22555564 >.

8.APÊNDICE

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica em parceria com o Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale da Università degli Studi di Ferrara

Resultados preliminares do Doutoramento Sanduíche PDSE-CAPES

Efeito protetor do ácido clorogênico sobre parâmetros inflamatórios em pâncreas de camundongos *PmLuc* submetidos a indução de diabetes aguda por estreptozotocina

Doutorando: Naiara Stefanello
Orientador: Prof Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-orientador no Exterior: Prof Dr. Francesco Di Virgilio

Ferrara, Itália
2015-2016

Resumo

O diabetes mellitus é uma patologia amplamente conhecida e bastante estudada devido às alterações no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios que ocorrem dos problemas na sinalização da insulina. O pâncreas é o principal alvo de estudo devido a ser o órgão responsável pela síntese e liberação desse hormônio e é onde agentes hiperglicemiantes atuam. O ácido clorogênico possuem algumas atividades biológicas conhecidas, incluindo antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora e ainda não há nenhum estudo relacionando seus efeitos benéficos sobre pâncreas. O foco desse trabalho foi investigar o efeito da ácido clorogênico na prevenção de alterações provocadas pela estreptozotocina (STZ) no pâncreas de camundongos. Para esse propósito diferentes protocolos de estudo foram planejados. Primeiramente, animais *PmLuc* foram tratados com STZ para avaliação da concentração de ATP através da intensidade de fótons liberada pela ação da Luciferase na região abdominal correspondente a posição do pâncreas. Também foi avaliado o efeito do ácido clorogênico 1 h após o tratamento com STZ para avaliar o efeito protetor desse composto e por último foi avaliado a discriminação entre os órgãos na região estudada, com o intuito de observar se o aumento da intensidade estava relacionada com o pâncreas. Nós observamos através do protocolo 1 que em 24 h após o tratamento com STZ há um aumento na intensidade do sinal na região de posição do pâncreas e que há uma diferença nos níveis glicêmicos dos animais tratados com STZ. O mesmo foi observado no experimento 2, e também obtivemos um aumento na expressão de marcadores inflamatórios tais como o NLRP3 e IL-1β nesses animais após 24h do tratamento com STZ. Além disso, não foram observadas alterações nesse período de tempo na expressão da CD39, CD73 e do $P2X_7$. Nós observamos também que o aumento da intensidade observado na região de posição do pâncreas em 24 h do tratamento com STZ estava relacionado com um aumento nos níveis de ATP no fígado e não no pâncreas, contudo nenhuma alteração foi observada nos marcadores inflamatórios. Mais estudos precisam ser realizados para compreender melhor a dinâmica dos níveis de ATP nas alterações pancreáticas, bem como de outros componentes do sistema purinérgico. Além disso, alterações no sistema imune e na resposta inflamatória é bastante importante principalmente no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1.

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é um grande problema de saúde pública porque a expectativa é aumentar seus número no decorrer dos próximos anos. Segundo dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF), em 2013 haviam 382 milhões de diabéticos em todo o mundo e estima-se que esse número irá crescer 55%, ou seja, 592 milhões de pessoas terão diabetes em 2035. Na américa central e sul, em 2013 eram 24 milhões de pessoas com essa patologia e crescerá 59,8% em 2035 segundo pesquisas. No Brasil, esses dados são ainda mais alarmantes, devido esse possuir o 4º lugar no número de pessoas diabéticas que chegam a 11,9 milhões de pessoas entre as idades de 20-79 anos (World Health Organization, 2014).

Essa patologia é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por elevada taxa de glicose sanguínea (hiperglicemia) e distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Esta hiperglicemia é decorrente da falta de insulina ou incapacidade deste hormônio em exercer adequadamente seus efeitos em tecidos alvos (Gannon, 2001)

O DM pode ser classificado em três principais categorias: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 e diabetes gestacional (American Diabetes, 2016). No diabetes tipo 1, responsável por aproximadamente 10% dos casos, ocorre uma destruição autoimune das células β pancreáticas, levando a uma absoluta deficiência na secreção da insulina. Já o diabetes tipo 2, correspondente a 90 % dos casos, é caracterizada por graus variáveis de resistência tecidual à insulina e uma deficiência relativa na secreção desse hormônio pelas células pancreáticas (Gerich, 1998). O diabetes gestacional aparece durante a gravidez, pode levar a sérios riscos para a saúde da mãe e seu bebê e aumentar o risco de desenvolver diabetes tipo 2 posteriormente (American Diabetes, 2016).

Essas alterações também podem ser mimetizadas em estudos animais com modelos de indução de diabetes tipo 1 e tipo 2. Entre os modelos mais utilizados estão DM induzida por estreptozotocina (STZ). A STZ tem estrutura semelhante à glicose, dessa forma, é transportada para o interior da célula β (Schnedl *et al.*, 1994). Uma vez no interior das células β pancreáticas a STZ leva a morte celular das células endócrinas (produtoras de hormônios) do pâncreas levando a diminuição da produção de insulina e induzido um quadro de hiperglicemia.

O pâncreas é um órgão com um papel central na repartição de nutrientes, detecção de nutrientes e liberação de hormônios que regulam toda a homeostase desses nutrientes no corpo. O pâncreas pode ser subdividido em pâncreas exócrino e pâncreas endócrino. Células acinares pancreáticas secretam enzimas digestivas e ATP. Ductos pancreáticos expressam receptores que estão envolvidos na regulação da secreção do líquido rico em bicarbonato. Ambas as células

exócrinas podem contribuir para o meio intersticial sob a forma de nucleotídeos/nucleosídeos ou citocinas secretadas (Burnstock e Novak, 2013). Células endócrinas nas ilhotas de Langerhans constituem apenas 3-5% da massa de tecido do pâncreas. As ilhotas de Langerhans estão dispersas por todo o órgão e compreendem as células α, β, δ e PP, que secretam hormônios glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídio pancreático, respectivamente (Bertelli *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Bouwens e Pipeleers, 1998).

Nos últimos anos, tornou-se aceito que o ATP e outros nucleosídeos/nucleotídeos extracelulares desempenham papéis importantes na regulação de diversas funções biológicas quando se ligam a seus receptores. ATP e ADP induzem a secreção de insulina na presença de glicose (Chapal *et al.*, 1997). Essa função está relacionada principalmente com o receptor $P2Y_1$ (Fernandez-Alvarez *et al.*, 2001; Farret *et al.*, 2006). Embora esse receptor pode ser o receptor P2Y mais importante na regulação da secreção da insulina, existem também evidências de outros receptores P2Y, e também receptores P2X que possam estar relacionados com as funções na regulação pancreática (Coutinho-Silva *et al.*, 2003). O receptor de $P2X_4$ foi clonado a partir de ilhotas pancreáticas de ratos e o receptor $P2X_7$ foi encontrado em células α e transitoriamente em células β do pâncreas de ratos em desenvolvimento. Em ratos diabéticos não-obesos, as células marcadas com receptor $P2X_7$ migram para o centro de ilhotas no decorrer do desenvolvimento da doença (Coutinho-Silva *et al.*, 2007).

O $P2X_7$ é um membro da família do receptor purinérgico, ionotrópico acoplado à proteína G. Seu agonista é o ATP extracelular que quando se liga ao receptor pode atuar regulando a permeabilidade celular, promover a ativação do inflamassoma nos macrófagos e também a apoptose (Narcisse *et al.*, 2005). Além disso, o ATP está ligado com a liberação de interleucinas. Glas e colaboradores (2009) demonstraram que a *Interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1Ra) intracelulares e a IL-1β são segregadas por um mecanismo que envolve a ativação de $P2X_7$ extracelular dependente de ATP. E que esse mecanismo parece estar relacionado com o aumento da apoptose das células β e desenvolvimento do diabetes (Glas *et al.*, 2009).

As citocinas são proteínas ou polipeptídios micromoleculares secretados principalmente por células imunes. Elas desempenham um papel regulador importante em muitas atividades celulares, tais como o crescimento, a diferenciação e as interações entre as células (Zou *et al.*, 2013). A IL-1β é uma citocina importante no contexto da diabetes tipo 2, porque está relacionada com a resistência à insulina e a disfunção das células β. Por um lado, a IL-1β interfere com a sinalização de insulina, em adipócitos e hepatócitos, suprime a captação de glicose induzida pela insulina e, inibe a lipogênese (Herder *et al.*, 2013). Além disso, a

expressão de IL-1β e o fator de necrose tumoral (TNF-α) tem sido detectada em ilhotas de pacientes com diabetes do tipo 1, e estas citocinas podem induzir *in vitro* a morte de células β (Thomas *et al.*, 2013).

O inflamassoma parece também interligar todo esse processo entre $P2X_7$ e IL-1β. Vários são os estímulos que levam a ativação do inflamassoma, incluindo situações de acolhimento "perigo", infecção e desregulação metabólica entre outras (Schroder *et al.*, 2010) O inflamassoma são complexos multiproteícos com diferentes tipos de domínios na sua composição: incluindo domínio rico em leucina (NLR), o domínio pyrin e domínio HIN200 contendo membros da família de proteínas PYHIN. É formado no citoplasma, que ativam a caspase 1 e levando a clivagem da pró-IL-1β e consequentemente sua ativação e liberação (Latz, 2010). Diversos ligantes podem ativar os inflamassomas, contudo em relação a ativação do NALP3 pouco se sabe. Concentrações elevadas de eATP (5 mM) poderia atuar como um sinal forte para provocar a transformação da pró-IL-1β na forma ativa IL-1β, através da sinalização pelo receptor $P2X_7$ (Gombault *et al.*, 2012).

Muitas drogas podem aumentar a secreção de insulina *in vitro*, mas apenas alguns têm um potencial terapêutico para o tratamento de pacientes com DM tipo 1 ou seja aqueles que dependem de administração de insulina. Um exemplo descrito são agonistas do receptor P2Y que podem amplificar a secreção de insulina, como demonstrado numa preparação *in vitro* a partir de pâncreas Ratos diabéticos Zucker (Tang *et al.*, 1996). Além disso, alguns compostos naturais podem ser associados com a diminuição nos níveis glicêmicos por atuar em outros sítios de interesse.

O ácido clorogênico é um produto natural encontrado em grandes quantidades no café, frutas cítricas, maçã, pêra e tomate. Esse composto fenólico é um éster formado entre o ácido cafeico e o ácido quínico e é um dos polifenóis mais abundantemente encontrado em produtos de origem vegetais (Clifford, 1999). Alguns estudos realizados têm sugerido que este composto apresenta atividade anti-inflamatória (Dos Santos *et al.*, 2006) antioxidante (Kono *et al.*, 1998) e neuroprotetora (Li *et al.*, 2008). Além disso, evidências experimentais apontam que o ácido clorogênico é um potente inibidor da glicose - 6 - fosfatase, uma enzima importante na regulação da glicemia (Johnston *et al.*, 2003; Bassoli *et al.*, 2008).

Em adição, o tratamento com o ácido clorogênico demonstrou que inibe a produção induzida de IL-1β, TNF-α, IL-6, INF-γ, a proteína quimiotática de monócitos (MCP) -l, proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -lα, e MIP-lβ pela exotoxina estafilocócica em células mononucleares do sangue periférico humano (Krakauer, 2002). Além disso, Shan et al. (2012) mostrou que o CGA regula a expressão de citocinas inflamatórias em células de macrófagos

ativados por lipopolissacarídeo. Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que o CGA desempenha um papel ativo no mecanismo de proteção contra a resposta inflamatória (Shen *et al.*, 2012).

O presente estudo teve por objetivo investigar o efeito do uso do ácido clorogênico na proteção de alterações em parâmetros inflamatórios e em componentes do sistema purinérgico de camundongos induzidos diabetes pelo modelo experimental de estreptozotocina. Esse estudo visa melhor compreender o efeito do ácido clorogênico e da hiperglicemia na progressão e desenvolvimento do diabetes mellitus através da lesão pancreática induzida pela STZ.

Materiais e Métodos

Materiais

ATP, estreptozotocina e o ácido clorogênico foram comprados pela SIGMA®. O Kit para enzima Luciferase foi usado pela Promega (ENLITEN® rLuciferase Reagent).

Animais

Para o experimento, foram usados 24 camundongos, da linhagem *pmLuc*, machos com variação de idade e peso oriundos do Biotério do Dipartimento di Medicina Sperimentale da Università degli Studio di Ferrara. Os mesmos eram previamente ambientados a alimentados diariamente com ração comercial e água a vontade e ambiente com temperatura e umidade controlada (23ºC; 70% UR). Os camundongos *pmLuc* possuem em sua membrana plasmática de quase todos os tipos celulares uma enzima a Luciferase que são sondas utilizados para a medição da ATP através da reação que segue:

$$\mathrm{Luc + LH2 + ATP} \longrightarrow \mathrm{Luc \cdot LH2 - AMP + PPi} \quad (1)$$

$$\mathrm{Luc \cdot LH2 - AMP + O_2} \longrightarrow \mathrm{Luc \cdot AMP + oxyluciferin^* + CO_2} \quad (2)$$

$$\mathrm{Luc \cdot AMP \cdot oxyluciferin^*} \longrightarrow \mathrm{Luc + oxyluciferin + AMP + h\nu} \quad (3)$$

Fonte: Detecting adenosine triphosphate in the pericellular, Falzoni et al. (2013) The Royal Society.

O primeiro passo envolve a formação inicial de um intermediário da enzima D-luciferil adenilato (D-LH2-AMP), com liberação de pirofosfato inorgânico. Subsequentemente, este intermediário é oxidado pelo oxigênio molecular com a formação de dióxido de carbono e a excitação do complexo enzima-oxiluciferina-AMP. No último passo da reação, a rápida perda de energia a partir do complexo excitado produz emissão de fótons com dissociação dos

componentes individuais. Para cada um quantum de luz emitida, 1 mol de ATP, 1 mol de oxigênio e 1 mol de luciferina são consumidos.

Delineamento experimental

Foram realizados 3 experimentos com o intuito de avaliar as alterações nos níveis de ATP e outros componentes do sistema purinérgico e inflamatório. E avaliar o efeito do ácido clorogênico como molécula anti-inflamatória. Para tanto foram usados 24 animais

Experimento 1 – Avaliação do modelo de indução de diabetes tipo 1 através da STZ em camundongos pmLuc

Foram utilizados 6 camundongos de 7 semanas de idade para o experimento 1. Para a indução do DM Tipo 1, foi administrado estreptozotocina (diluída in 0.1 M de tampão citrato de sódio; pH 4,5) 3 mg por camundongo, intraperitoneal (i.p.), dose única. Foram divididos em dois grupos:

1) STZ (n=3)
2) CIT (veículo) (n=3)

Foram feitas aquisições das imagens antes (Basal) e em 15 min, 5 e 24 horas após a indução de diabetes. Após a aquisição no equipamento foram medidos os níveis glicêmicos de cada animal. E após o período de tempo estimado para o estudo os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia. As amostras de pâncreas foram coletas para análise.

Experimento 2 – Efeito do ácido clorogênico no modelo de indução de diabetes tipo 1 através da STZ em camundongos *pmLuc*

Foram utilizados 12 camundongos de 7 semanas para o experimento 2. Para a indução do DM Tipo 1, foi administrado estreptozotocina (diluída in 0.1 M de tampão citrato de sódio; pH 4,5) 200 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), dose única. Foram feitas aquisições de imagens basais de todos os animais seguidos pela medida da glicemia. Então, administramos STZ ou citrato. Uma hora após a administração da STZ foi administrado ACG 100 mg/kg ou DPBS (veículo), i.p.. O estudo foi dividido em quatro grupos:

I: CTRL (CIT + DPBS),
II: CGA (CIT + CGA 100 mg/kg),
III: STZ (STZ 200 mg/kg + DPBS) e
IV: STZ + CGA (STZ 200 mg/ kg + CGA 100 mg/kg)

Após 24 horas da indução de diabetes foi feita uma última aquisição de imagem no equipamento, a glicemia foi medida e os animais foram submetidos a eutanásia e o pâncreas foi coletado para análise.

Experimento 3 – Discriminação dos tecidos responsáveis pelas alterações nos níveis de ATP no modelo de indução de diabetes tipo 1 através da STZ em camundongos *pmLuc*

Foram utilizados 6 camundongos de 5 semanas para o experimento 3. Para a indução do DM Tipo 1, foi administrado estreptozotocina (diluída in 0.1 M de tampão citrato de sódio; pH 4,5) 141 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), dose única. Foram divididos em dois grupos:

1) CTRL (veículo) (n=3)
2) STZ (n=3)

Fizemos aquisições de imagens antes (Basal) e 24 horas depois da indução de diabetes. Após a aquisição foram medidos os níveis glicêmicos de cada animal. E após o período de tempo estimado para o estudo os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia. As amostras de pâncreas e fígado foram coletas para análise *ex vivo*.

Tomada das imagens *in vivo* em tempo real

As imagens bioluminescentes *in vivo* foram realizadas com um ultra espectro de alta sensibilidade ligado a uma câmara de controle de temperatura, montado sobre uma câmara de imagem à prova de luz (IVIS 100 System ™, Xenogen, Roissy, França). Rastreamento, monitoramento e quantificação de sinais foram controlados pela aquisição e análise da imagem pelo software Living Image® (Xenogen). Os animais foram anestesiados (1-3% de isoflurano), 150 mg/kg de D-luciferina foi administrado i.p. (3 mg por camundongo) 5 minutos antes da aquisição das imagens. Camundongos anestesiados foram então colocadas no IVIS™ Imagem System e fotografados e a luminescência foi capturada a partir dos pontos de vista ventral dos camundongos. Os animais permaneceram anestesiados enquanto estavam dentro do espectro. Três camundongos foram fotografados por análise, sendo o tempo de aquisição da imagem de 5 minutos. As regiões de interesse de imagens foram exibidas e identificados em torno da região peitoral e abdominal. E foram quantificados como o total de fótons/s usando o Living Image® software. A luminescência foi medida antes da indução de diabetes e definida como nível basal para cada animal e posteriormente nos tempos escolhidos de acordo com cada experimento.

Tomada das imagens *ex vivo*

Fígado e o pâncreas foram colocados em placas de petri, um órgão em cada placa submersos em uma solução de meio de cultura HBSS (Solução salina balanceada de Hanks). Foram adicionadas 60 mg de D-luciferina (Xenogen) a cada placa e as imagens foram registradas. Além disso, foram colocadas duas placas por vez no espectro e a aquisição das imagens foi realizada por 5 minutos.

Expressão do mRNA por RT-PCR

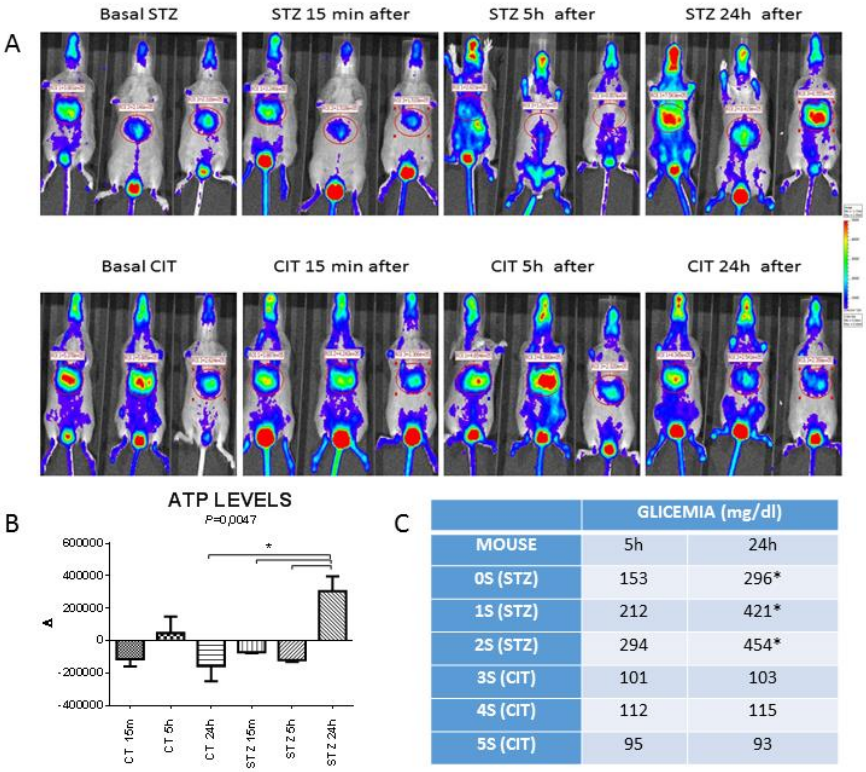
O pâncreas e o fígado foram coletados e imersos em TRIzol® e guardadas a -80°C até a análise. O RNA total foi isolado usando PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, Califórnia), de acordo com instruções do KIT. O rendimento de extração foi quantificado espectrofotometricamente (NanoDrops Lite Spectrophotometer 2000, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc.). Uma quantidade constante de RNA total (1 ug) foi usada para os ciclos de retrotranscrição com um volume de reação total de 20 ul utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Germany). O cDNA foi mantido em ciclos de temperatura, incubado a 25 ° C durante 10 minutos para ativação dos componentes do meio reacional, depois 37°C por 120 minutos para a atividade enzimática da transcriptase reversa e 85°C por 5 minutos para a inativação da enzima. Esse cDNA serviu como um molde de DNA para os ciclos de amplificação, utilizando um termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Germany). A PCR foi realizada numa mistura reacional de 3 µl do cDNA e 17 µl do Mix formado pelo Master Mix com os anticorpos de ensaio: GAPDH como controle interno e P2X7, CD39, CD73, NLRP3 e IL-1β como *target*, e ainda água livre de nuclease de acordo com o Kit TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Germany).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste *t* de Student quando dois grupos ou análise de variância de uma via (ANOVA) quando mais que dois grupos, utilizando o teste post-hoc adequado com 95% de significância ($p < 0,05$). Os valores foram expressos como média ± S.E.M.

Resultados e discussão

Experimento 1

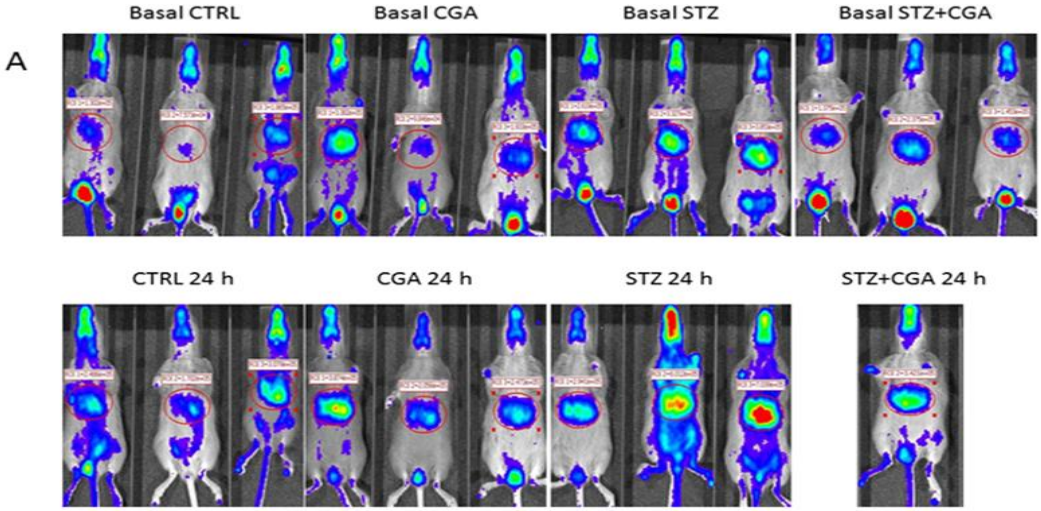


	GLICEMIA (mg/dl)	
MOUSE	5h	24h
0S (STZ)	153	296*
1S (STZ)	212	421*
2S (STZ)	294	454*
3S (CIT)	101	103
4S (CIT)	112	115
5S (CIT)	95	93

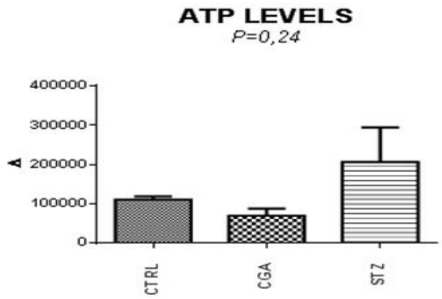
Figura 1: Efeito do tratamento com STZ (200 mg/kg) em camundongos pmLuc. A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase em animais tratados com STZ (fotos superiores) e controles tratados com citrato (fotos inferiores) nos tempos Basal (antes do tratamento com STZ), 15 minutos, 5 horas e 24 horas após o tratamento com STZ. B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais de fótons/s. C) tabela com os valores de glicemia dos camundongos tratados com STZ e citrato nos tempos de 5 h e 24 h após o tratamento com STZ, os resultados são expressos em mg de glicose por dl de sangue total. Anova de uma via (n=3)

Podemos observar que o nível de sinal de fótons (Figura 1A e 1B) liberados nos animais controles à nível basal era maior que aqueles selecionados aleatoriamente para pertencerem ao grupo tratado com STZ. Além disso, observamos que em geral essa intensidade foi diminuindo com o passar do tempo. Diferentemente, os animais tratados com STZ apresentaram um aumento na intensidade do sinal ao tempo final de 24 horas. Em suma, podemos observar que com a dose de 200 mg/kg de STZ, os camundongos a 24 horas apresentaram um aumento nos níveis de ATP na região do pâncreas. Então também medimos a glicemia desses animais nos tempos de 5 e 24 horas após o tratamento com STZ com o intuito de comprovar se esse aumento é condizente com o aumento na glicose sanguínea, os quais estão representados na tabela (Figura 1C). E de fato podemos observar que há um aumento na intensidade do sinal nos camundongos tratados com STZ. Uma vez que a STZ penetra na célula β pelo transportador de glicose 2, ela promove seus efeitos tóxicos levando a morte das células β por necrose (Furman, 2015), como na necrose há uma diminuição nos níveis de ATP (Vanden Berghe *et al.*, 2014),

essas alterações só podem estar relacionadas com o aumento da glicose no sangue e consequentemente aumentando a produção de ATP.



B



C

	Glicemia (mg/dl)	
MOUSE	0h	24h
0S (STZ)	130	140
1S (STZ)	94	107
2S (STZ)	163	303*
3S (STZ/CGA)	58	X
4S (STZ/CGA)	137	370*
5S (STZ/CGA)	70	X
0S (CGA)	139	128
1S (CGA)	144	70
2S (CGA)	101	109
3S (CT)	135	-
4S (CT)	119	-
5S (CT)	99	-

Figura 2: Efeito do tratamento com STZ (200 mg/kg) e ácido clorogênico (100 mg/kg) em camundongos pmLuc. A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase nos camundongos antes do tratamento com STZ (fotos superiores) e após 24 horas (fotos inferiores) nos grupos **CTRL** (controles que receberam Citrato e 1 h depois DPBS), **CGA** (que receberam citrato e 1h depois 100 mg/kg de ACG), **STZ** (que receberam 200mg/kg de STZ e 1h depois DPBS) e **STZ+CGA** (que receberam 200 mg/kg de STZ e 1h depois 200 mg/kg de ACG) da esquerda para a direita, respectivamente. B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais em fótons/s dos grupo CTRL, CGA e STZ. C) tabela com os valores de glicemia dos camundongos tratados com STZ, STZ+ACG, ACG e citrato nos tempos antes e 24 h após o tratamento com STZ, os resultados são expressos em mg de glicose por dl de sangue total. Os animais controles não foram medidos após 24 h do tratamento com STZ. Anova de uma via (n=3).

Experimento 2

Nós então testamos o efeito do ácido clorogênico no quadro descrito anteriormente. Foi observado um leve aumento na intensidade de sinal nos ratos tratados com STZ (Figura 2A e 2B), contudo em um dos animais esse aumento nos níveis de ATP não está relacionado com o aumento da glicemia (Figura 2C).

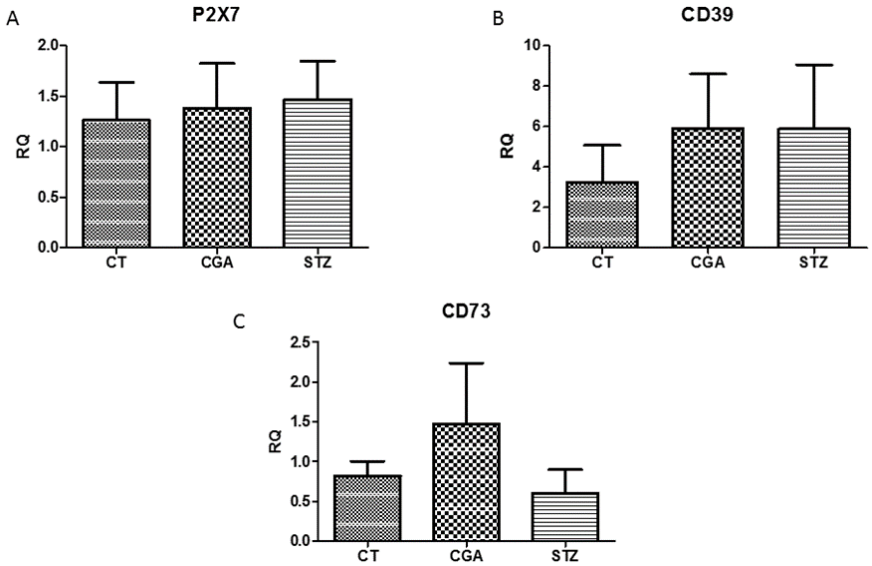


Figura 3: Efeito do tratamento com ACG e STZ na expressão do receptor P2X7 (3A), CD39 (3B) e CD 73 (3C) em pâncreas de camundongos pmLuc após 24 h do tratamento com STZ. Anova de uma via (n=3-5). Dados apresentados como RQ – Coeficiente entre a razão do grupo teste com um animal do grupo controle.

Além disso, os animais receberam ácido clorogênico na dose de 100 mg/kg baseado em Zhang *et al.* (2010) após 1 h após a administração da STZ na tentativa de avaliar o efeito protetor do ACG frente a STZ. Porém, devido ao efeito hipoglicemiante da STZ (Furman, 2015) associado com animais naturalmente hiperglicêmicos para o grupo STZ/ACG, esses animais não resistiram até o término do experimento. Somente um animal que possuía uma glicemia basal maior sobreviveu ao tratamento.

Embora os níveis de glicose não estivessem alterados nós medimos a expressão de algumas proteínas relacionadas com o sistema purinérgico (Figura 3) e também com o processo inflamatório (Figura 4). Nós observamos que em 24 h após o tratamento com STZ, a expressão do $P2X_7$, CD39 e CD73 em pâncreas de camundongos não se mostrou alterada. Parece que em nível molecular essas proteínas precisam de um pouco mais de tempo para serem alteradas, uma vez que com esse conjunto de animais observamos uma tendência a um aumento na expressão da CD39 e CD73 . Além disso, Coutinho-Silva e colaboradores tem demonstrado que o receptor $P2X_7$ aumenta sua densidade proteica com o desenvolvimento e progressão do diabetes (Coutinho-Silva *et al.*, 2007). Diferentemente, as proteínas NLRP3 (Figura 4A) e IL-1β (Figura 4B) estão associadas com a morte celular, uma vez que a IL-1β secretada pela própria célula β estimulada pela glicose vem sendo descrita como indutora do apoptose das células β (Maedler *et al.*, 2002) se encontram aumentadas em ratos tratados com STZ. O inflamassoma está relacionado com a ativação da IL-1β, normalmente através da estimulação do ATP e através do

receptor $P2X_7$ (Wang *et al.*, 2015). Além disso, o único camundongo do grupo STZ/ACG apresentou uma diminuição na expressão dessas duas proteínas (dados não apresentados), contudo devido a ser uma única amostra não podemos apresentar esses efeitos benéficos como molécula anti-inflamatória, uma vez que o ACG é descrito por possuir estas propriedades (Krakauer, 2002; Dos Santos *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010).

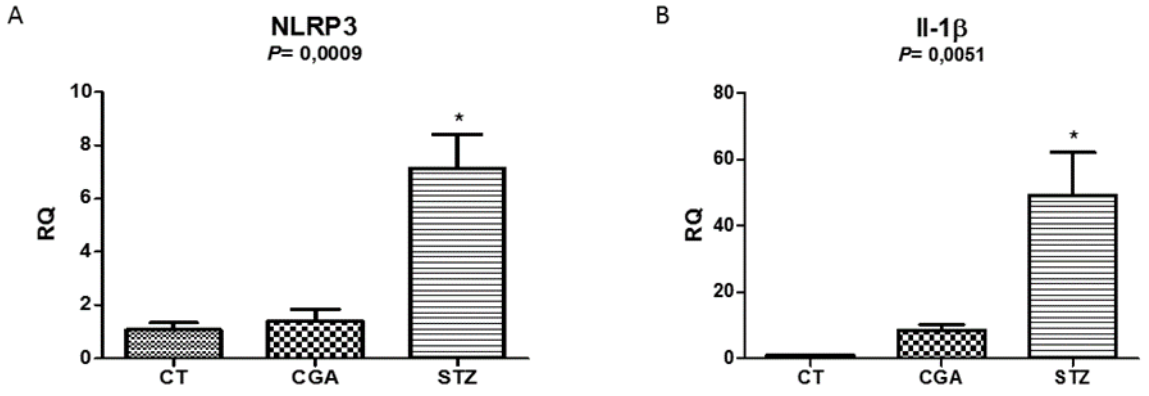


Figura 4: Efeito do tratamento com ACG e STZ na expressão do receptor NLRP 3 (4A) e IL-1β (4B) em pâncreas de camundongos pmLuc após 24 h do tratamento com STZ. Anova de uma via (n=3-5). Dados apresentados como RQ – Coeficiente entre a razão do grupo teste com um animal do grupo controle. * significa diferença em relação ao grupo controle.

Experimento 3

Uma vez que nós observamos um aumento nos fótons/s na região peitoral e abdominal nos animais tratados com STZ. Nosso objetivo foi determinar se esse aumento era relacionado com as alterações pancreáticas. No experimento 3, os animais foram tratados com STZ na dose de 141 mg/kg e não observamos grandes mudanças nos fótons emitidos (Figura 5A e 5B) e nem na glicemia após 24 h de indução de diabetes (Figura 5C).

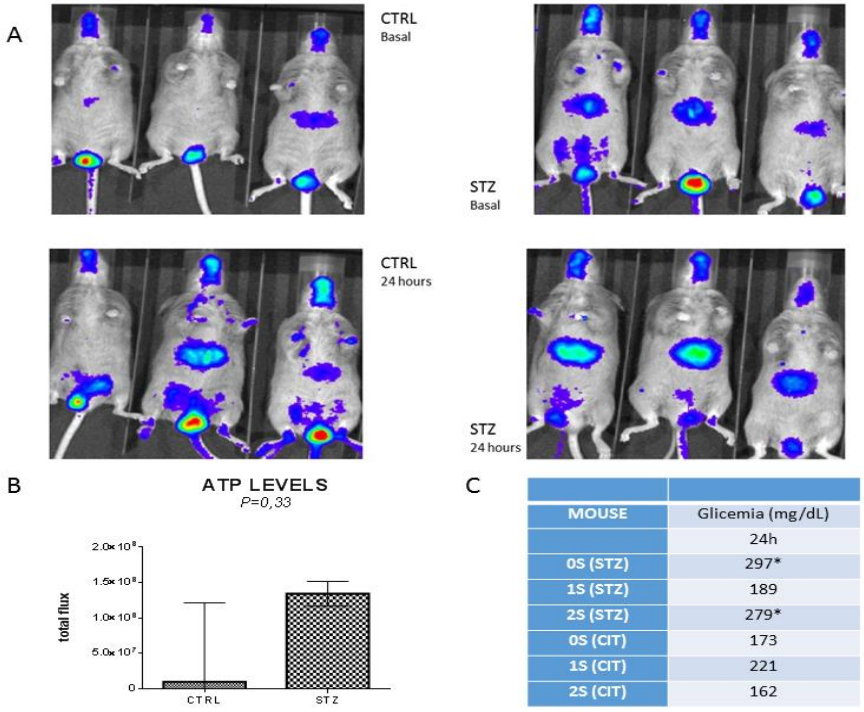


Figura 5: Efeito do tratamento com STZ (141 mg/kg) em camundongos pmLuc. A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase em animais tratados com citrato (foto superior esquerda) e STZ (foto superior direita) no tempo basal (antes do tratamento com STZ) e 24 horas após o tratamento com citrato (foto inferior esquerda) e STZ (foto inferior direita). B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais em fótons/s. C) tabela com os valores de glicemia dos camundongos tratados com STZ e citrato no tempo de 24 h após o tratamento com STZ, os resultados são expressos em mg de glicose por dl de sangue total. Teste T de Student (n=3)

Então o fígado e o pâncreas desses animais foram dessecados e analisamos individualmente a emissão dos fótons/s (Figura 6A e 6B). Nós observamos que há um aumento na intensidade do sinal no fígado dos camundongos tratados com STZ em relação ao grupo controle mas não houve alteração no pâncreas.

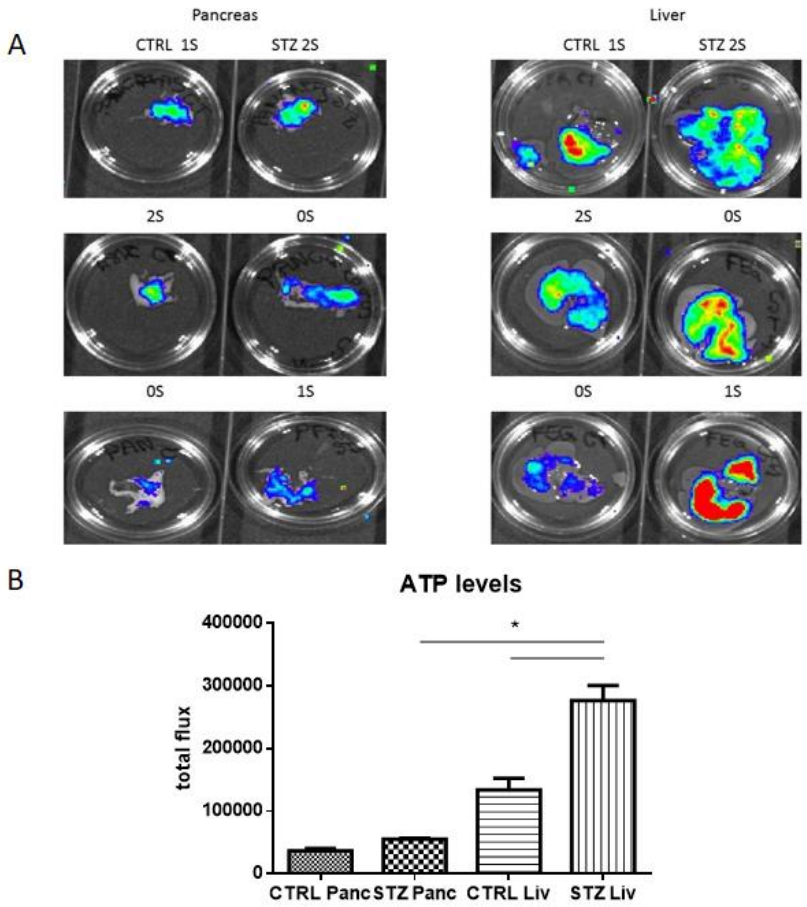


Figura 6: Ex vivo resultados dos camundongos pmLuc tratados com STZ (141 mg/kg). A) fotografias expondo a intensidade do sinal dos fótons/s liberados pela reação da enzima Luciferase em pâncreas à esquerda e fígado à direita, onde sempre era colocado um órgão do animal controle (à esquerda) e um órgão do animal tratado com STZ (à direita). B) representação gráfica da diferença entre a intensidade do sinal no final dos tempos determinados e os níveis basais em fótons/s. Anova de uma via (n=3)

Então nós avaliamos se a expressão das proteínas seria alterada no fígado e pâncreas (Figura 7) dos animais estudados e observamos que não houve nenhuma alteração na expressão dessas proteínas nesses tecidos. É conhecido que o fígado também possui o transportador de glicose (GLUT 2) responsável pela entrada de STZ na célula. Dessa forma, essa droga também entra nos hepatócitos, contudo como o fígado é um tecido responsável pela detoxificação de xenobióticos (Rowland *et al.*, 2013) poderia atuar metabolizando a STZ para eliminação. Além disso, a dose de STZ para a indução do dano no pâncreas e indução da hiperglicemia não foi alta o suficiente, uma vez que estudos preconizam uma dose de 200 mg/kg (Furman, 2015).

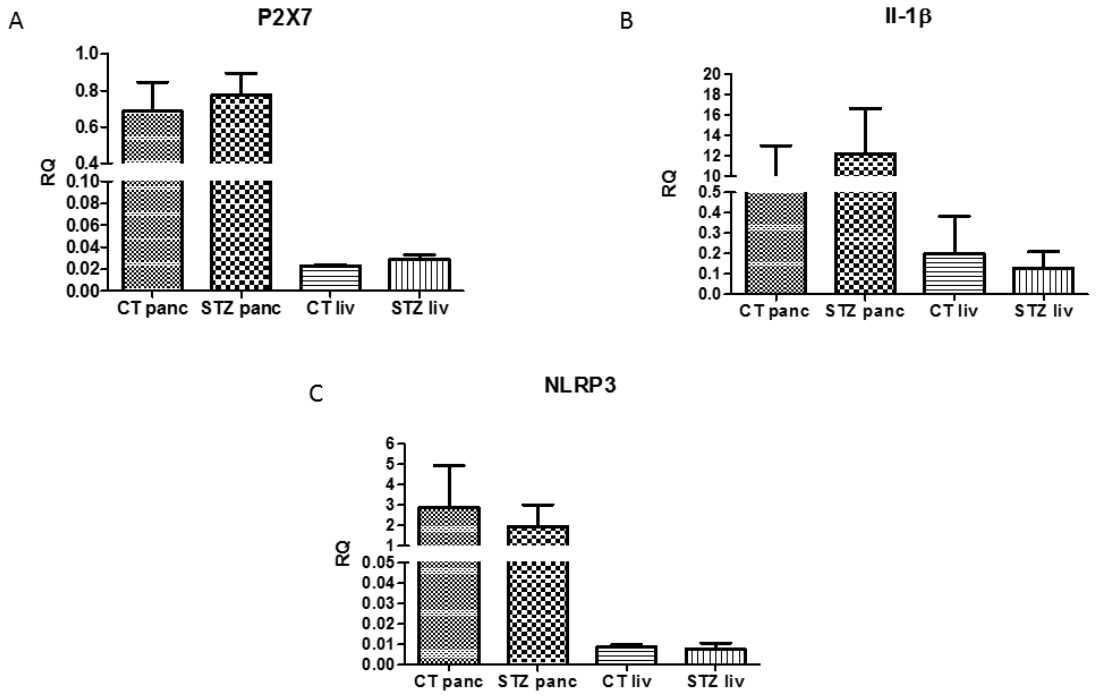


Figura 7: Efeito do tratamento com STZ na expressão do receptor P2X7 (7A), IlL-1β (7B) NLRP 3 (7C) em pâncreas e fígado de camundongos *pmLuc* após 24 h do tratamento com STZ. Teste T de Student (n=3-5). Dados apresentados como RQ – Coeficiente entre a razão do grupo teste com um animal do grupo controle.

Nossos resultados demonstraram que a hiperglicemia parece estar relacionada com o aumento das concentrações de ATP no fígado de camundongos tratados com STZ. Além disso, alterações no receptor $P2X_7$ e nas enzimas que degradam o ATP em 24 horas após o tratamento com STZ não foi encontrado. Embora o ACG apresente efeitos como molécula anti-inflamatória, nossos resultados são inconclusivos em relação ao seu efeito na reversão dos danos nas células pancreáticas oriundos da hiperglicemia.

Referências

AMERICAN DIABETES, A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care,** v. 39 Suppl 1, p. S13-22, Jan 2016. ISSN 1935-5548 (Electronic)
0149-5992 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26696675 >.

BASSOLI, B. K. et al. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochem Funct,** v. 26, n. 3, p. 320-8, Apr 2008. ISSN 1099-0844 (Electronic)
0263-6484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17990295 >.

BERTELLI, E.; REGOLI, M.; BASTIANINI, A. Endocrine tissue associated with the pancreatic ductal system: a light and electron microscopic study of the adult rat pancreas with special reference to a new endocrine arrangement. **Anat Rec,** v. 239, n. 4, p. 371-8, Aug 1994. ISSN 0003-276X (Print)

0003-276X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7978361 >.

BOUWENS, L.; PIPELEERS, D. G. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. **Diabetologia,** v. 41, n. 6, p. 629-33, Jun 1998. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662042 >.

BURNSTOCK, G.; NOVAK, I. Purinergic signalling and diabetes. **Purinergic Signal**, Apr 3 2013. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23546842 >.

CHAPAL, J. et al. Comparative effects of adenosine-5'-triphosphate and related analogues on insulin secretion from the rat pancreas. **Fundam Clin Pharmacol,** v. 11, n. 6, p. 537-45, 1997. ISSN 0767-3981 (Print)
0767-3981 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9444521 >.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal Science Food Agriculture,** v. 79, p. 362-372, 1999. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3%3C362::AID-JSFA256%3E3.0.CO;2-D/abstract >.

COUTINHO-SILVA, R. et al. P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. **Mol Cell Endocrinol,** v. 204, n. 1-2, p. 141-54, Jun 30 2003. ISSN 0303-7207 (Print)
0303-7207 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850289 >.

COUTINHO-SILVA, R. et al. Changes in expression of P2X7 receptors in NOD mouse pancreas during the development of diabetes. **Autoimmunity,** v. 40, n. 2, p. 108-16, Mar 2007. ISSN 0891-6934 (Print)
0891-6934 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364502 >.

DOS SANTOS, M. D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biol Pharm Bull,** v. 29, n. 11, p. 2236-40, Nov 2006. ISSN 0918-6158 (Print)
0918-6158 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077520 >.

FARRET, A. et al. P2Y receptor mediated modulation of insulin release by a novel generation of 2-substituted-5'-O-(1-boranotriphosphate)-adenosine analogues. **Pharm Res,** v. 23, n. 11, p. 2665-71, Nov 2006. ISSN 0724-8741 (Print)
0724-8741 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048117 >.

FERNANDEZ-ALVAREZ, J. et al. P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. **Pancreas,** v. 22, n. 1, p. 69-71, Jan 2001. ISSN 0885-3177 (Print)
0885-3177 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138974 >.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Curr Protoc Pharmacol,** v. 70, p. 5 47 1-20, 2015. ISSN 1934-8290 (Electronic)
1934-8282 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331889 >.

GANNON, M. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. **Trends Genet,** v. 17, n. 10, p. S23-8, Oct 2001. ISSN 0168-9525 (Print)
0168-9525 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585673 >.

GERICH, J. E. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. **Endocr Rev,** v. 19, n. 4, p. 491-503, Aug 1998. ISSN 0163-769X (Print)
0163-769X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715377 >.

GOMBAULT, A.; BARON, L.; COUILLIN, I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. **Front Immunol,** v. 3, p. 414, 2012. ISSN 1664-3224 (Electronic)
1664-3224 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316199 >.

GLAS, R. et al. Purinergic P2X7 receptors regulate secretion of interleukin-1 receptor antagonist and beta cell function and survival. **Diabetologia,** v. 52, n. 8, p. 1579-88, Aug 2009. ISSN 1432-0428 (Electronic)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396427 >.

HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D. M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab,** v. 15 Suppl 3, p. 39-50, Sep 2013. ISSN 1463-1326 (Electronic)
1462-8902 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24003920 >.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **Am J Clin Nutr,** v. 78, n. 4, p. 728-33, Oct 2003. ISSN 0002-9165 (Print)
0002-9165 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522730 >.

KONO, H. et al. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. **J Clin Invest,** v. 120, n. 6, p. 1939-49, Jun 2010. ISSN 1558-8238 (Electronic)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501947 >.

KONO, Y. et al. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. **Biosci Biotechnol Biochem,** v. 62, n. 1, p. 22-7, Jan 1998. ISSN 0916-8451 (Print)
0916-8451 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501514 >.

KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology,** v. 24, n. 1, p. 112-9, 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022439 >.

LATZ, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. **Curr Opin Immunol,** v. 22, n. 1, p. 28-33, Feb 2010. ISSN 1879-0372 (Electronic)
0952-7915 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060699 >.

LI, Y. et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. **Environ Toxicol Pharmacol,** v. 26, n. 1, p. 13-21, Jul 2008. ISSN 1382-6689 (Print)
1382-6689 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783882 >.

MAEDLER, K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J Clin Invest,** v. 110, n. 6, p. 851-60, Sep 2002. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235117 >.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol,** v. 27, p. 229-65, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302040 >.

NARCISSE, L. et al. The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. **Glia,** v. 49, n. 2, p. 245-58, Jan 15 2005. ISSN 0894-1491 (Print)
0894-1491 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472991 >.

ORGANIZATION, W. H. **Global Report on Diabetes**. World Health Organization. 2014

PRAUSE, M. et al. TRAF2 mediates JNK and STAT3 activation in response to IL-1beta and IFNgamma and facilitates apoptotic death of insulin-producing beta-cells. **Mol Cell Endocrinol,** v. 420, p. 24-36, Nov 22 2015. ISSN 1872-8057 (Electronic)
0303-7207 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610752 >.

ROWLAND, A.; MINERS, J. O.; MACKENZIE, P. I. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 45, n. 6, p. 1121-32, Jun 2013. ISSN 1878-5875 (Electronic)
1357-2725 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500526 >.

SCHNEDL, W. J. et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes,** v. 43, n. 11, p. 1326-33, Nov 1994. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926307 >.

SCHRODER, K.; ZHOU, R.; TSCHOPP, J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? **Science,** v. 327, n. 5963, p. 296-300, Jan 15 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20075245 >.

SHEN, W. et al. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. **Brain Res Bull,** v. 88, n. 5, p. 487-94, Aug 1 2012. ISSN 1873-2747 (Electronic)
0361-9230 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580132 >.

TANG, J. et al. Preservation of insulin secretory responses to P2 purinoceptor agonists in Zucker diabetic fatty rats. **Am J Physiol,** v. 270, n. 3 Pt 1, p. E504-12, Mar 1996. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638699 >.

THOMAS, H. E. et al. Proinflammatory cytokines contribute to development and function of regulatory T cells in type 1 diabetes. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1283, p. 81-6, Apr 2013. ISSN 1749-6632 (Electronic)
0077-8923 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167495 >.

VANDEN BERGHE, T. et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 15, n. 2, p. 135-47, Feb 2014. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452471 >.

WANG, C. Y.; GUO, X. C.; ZHANG, J. P. Research Advances in NLRP3 Inflammasome-related Regulatory Mechanisms. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao,** v. 37, n. 5, p. 618-22, Oct 31 2015. ISSN 1000-503X (Print)
1000-503X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26564518 >.

WANG, R. N.; KLOPPEL, G.; BOUWENS, L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. **Diabetologia,** v. 38, n. 12, p. 1405-11, Dec 1995. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786013 >.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. **Sci Signal,** v. 3, n. 105, p. cm2, 2010. ISSN 1937-9145 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086236 >.

ZHANG, X. et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Injury,** v. 41, n. 7, p. 746-52, Jul 2010. ISSN 1879-0267 (Electronic)
0020-1383 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227691 >.

ZOU, Q. et al. An approach for identifying cytokines based on a novel ensemble classifier. **Biomed Res Int,** v. 2013, p. 686090, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24027761 >.

9. ANEXO – Carta de aprovação do Comite em Experimentação Animal - UFSM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ INTERNO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Atividade das ectonucleotidases, acetilcolinesterase e parametros de estresse oxidativo em ratos diabeticos e tratados com café, cafeína e ácido clorogênico"

Numero do Parecer: 023/2011

Pesquisador Responsável: Maria Rosa Chitolina Schetinger

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

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:

Santa Maria, 11 de Abril de 2011.

Marta Lizandra do Rêgo Leal
Coordenador do Comitê de Ética em Uso Animal - UFSM

Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal - UFSM - Av. Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria - 2º andar - Campus Universitário 97105-900 – Santa Maria – RS - - Tel: 0 xx 55 3220 9362 .