

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MIKAELLE COSTA CORREIA

**EFEITO DA FRAÇÃO HIDRO-METANÓLICA DE *Sabicea brasiliensis*
WERNH SOBRE AS ATIVIDADES ECTONUCLEOTIDASES EM CÉLULAS
MUSCULARES LISAS VASCULARES**

**PATOS DE MINAS
DEZEMBRO DE 2018**

MIKAELLE COSTA CORREIA

**EFEITO DA FRAÇÃO HIDRO-METANÓLICA DE *Sabicea brasiliensis*
WERNH SOBRE AS ATIVIDADES ECTONUCLEOTIDASES EM CÉLULAS
MUSCULARES LISAS VASCULARES**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof (a). Dr (a). Cristina Ribas Fürstenau

PATOS DE MINAS – MG

DEZEMBRO DE 2018

MIKAELLE COSTA CORREIA

Efeito da fração hidro-metanólica de *Sabicea brasiliensis* Wernh sobre as atividades ectonucleotidasas em células musculares lisas vasculares

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

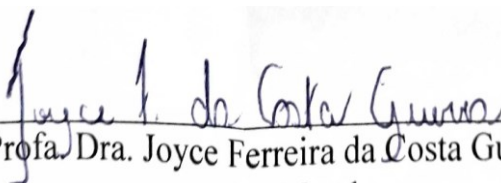
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau - IBTEC
Presidente



Profa. Dra. Tháise Gonçalves de Araújo - IBTEC
Membro



Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra - IBTEC
Membro

Patos de Minas – MG, 10 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Valdimar e Maria, a quem devo tudo que sou, pelo apoio, paciência, compreensão durante todos esses anos distante e por me proporcionarem essa oportunidade.

Ao meu namorado, Matheus Henrique, por me incentivar desde o início, ser paciente, me dar forças e principalmente por sempre ter acreditado em mim, estando ao meu lado em todos os momentos.

À minha melhor amiga Vitória Fornasiere, que apesar da distância e da rotina, sempre torceu por mim e esteve presente como uma irmã, de fundamental importância na minha vida.

À minha orientadora, Cristina Ribas Fürstenau, pela oportunidade em fazer parte deste grupo de pesquisa, por ter acreditado em meu potencial e por todo o carinho durante esses anos. Você é uma inspiração para todos dessa Universidade, por sempre transparecer serenidade, positividade e incentivar seus alunos, afinal tudo dará certo.

Às queridas Bruna Juber e Fernanda Cardoso, que dedicaram parte do seu tempo para me auxiliar em meus experimentos. Obrigada por toda paciência, apoio e companhia durante esta jornada, admiro muito vocês.

Às professoras Thaíse Gonçalves de Araújo e Joyce Ferreira da Costa Guerra por aceitarem o convite para avaliarem este trabalho e todo o corpo docente da UFU campus Patos de Minas, cada um contribuiu de alguma forma para a minha formação e tenho uma imensa gratidão a todos.

Às Lideranças estudantis que fiz parte, LiNA Biotec e Diretório Acadêmico, onde obtive diferentes aprendizados, fiz amigos e pude conhecer profissionais de diversas áreas.

Aos meus amigos: Flávia, Isabella, Leonardo, Dayanne, João Lucas, Willow, Iara, Amanda e Beatriz, por todo o companheirismo e apoio durante essa caminhada.

Às demais pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

As doenças cardiovasculares são a maior causa de mortes no mundo e a hipertensão arterial constitui um importante fator de risco. Qualquer alteração no diâmetro dos vasos sanguíneos pode provocar modificações na pressão arterial. A *Sabicea brasiliensis* Wernh, conhecida como “sangue de Cristo”, é popularmente utilizada no controle da pressão arterial. A sinalização purinérgica modula processos de vasorelaxamento e vasoconstrição pela disponibilidade de nucleotídeos, que são metabolizados pelas ectonucleotidases. Assim, avaliamos o efeito da fração hidro-metanólica (HM) das raízes de *S. brasiliensis* sobre a atividade das ectonucleotidases em células musculares lisas vasculares A7r5. A viabilidade celular foi determinada nos períodos 24, 48 e 72h de tratamento pelo ensaio de MTT nas concentrações da fração HM 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e as atividades ectonucleotidases foram avaliadas por método colorimétrico a partir da incubação de seus substratos, após 48h de tratamento com a fração HM nas mesmas concentrações. Os resultados obtidos mostram que a fração HM não apresentou efeito citotóxico sobre as células A7r5 nas concentrações testadas e nos períodos analisados. Entretanto, a mesma influenciou a proliferação das células em 48 horas, evidenciando novas possibilidades de estudo. Ainda, embora se observe uma tendência à inibição da atividade fosfodiesterase (E-NPP) pela fração HM, não houve modificação significativa ($p < 0,05$) na hidrólise dos substratos testados. Sabe-se que as raízes de *S. brasiliensis* apresentam alto potencial antioxidante, podendo impactar sobre as atividades ectonucleotidases. Nesse sentido, experimentos adicionais são necessários para confirmar se há modulação dessas enzimas pela fração HM de sangue-de-Cristo, o que poderia elucidar, em parte, seu efeito anti-hipertensivo.

Palavras-chave: Hipertensão. Sinalização purinérgica. Moléculas vasoativas. Tônus vascular.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the largest cause of death worldwide, and arterial hypertension is an important risk factor. Any change in the diameter of blood vessels may cause changes in blood pressure. Sabicea brasiliensis Wernh, commonly known as "blood of Christ", is popularly used to control blood pressure. Purinergic signalling modulates vasorelaxation and vasoconstriction processes by the availability of nucleotides, which undergo hydrolysis by ectonucleotidases. We thus evaluated the potential of hydro-methanolic (HM) fraction of the roots of S. brasiliensis on the activity of ectonucleotidases in vascular smooth muscle cells A7r5. Cell viability was determined at treatment periods 24, 48 and 72h by the MTT assay at different concentrations of HM fraction 62.5; 125; 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and ectonucleotidase activities were evaluated by colorimetric method incubating their substrates after 48 hours of treatment with HM at the same concentrations. Results show that none of HM tested concentrations were cytotoxic on A7r5 cells at all periods analyzed. However, the fraction influenced the proliferation of A7r5 after 48 hours, showing new possibilities of study. Also, despite one could observe a tendency in inhibit phosphodiesterase (E-NPP) activity, there was no significant change ($p < 0.05$) in the hydrolysis of all substrates tested. It is known that the roots of S. brasiliensis present a high antioxidant potential, which could impact the activities of ectonucleotidases. In this sense, additional experiments are needed to clarify the modulation of ectonucleotidases by HM fraction, which could, at least in part, elucidate the antihypertensive effect of the plant.

Keywords: Hypertension. Purinergic signalling. Vasoactive molecules. Vascular tone.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADO: Adenosina
ADP: Difosfato de adenosina
AE: Acetato de etila
AMP: Monofosfato de adenosina
APs: Fosfatases alcalinas
ATP: Trifosfato de adenosina
CaCl₂: Cloreto de cálcio
CML: Células musculares lisas
CMLVs: Células musculares lisas vasculares
CMP: Monofosfato de citidina
DCV: Doenças cardiovasculares
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO: Dimetilsufóxido
E-NPP: Ectonucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterases
E-NTPDase: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
FBS: Soro Fetal Bovino, do inglês *foetal bovine serum*
GMP: Monofosfato de guanina
HAS: Hipertensão arterial sistêmica
HM: Hidro-metanólica
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NaCl: Cloreto de sódio
NaOH: Hidróxido de sódio
OMS: Organização Mundial da Saúde
PA: Pressão arterial
PAS: Pressão arterial sistólica
PAD: Pressão arterial diastólica
Pi: Fosfato inorgânico
p-Nph-5'-TMP: Thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester sodium salt
S. brasiliensis Wernh: *Sabicea Brasiliensis* Wernh
SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SNC: Sistema nervoso central
TCA: Ácido tricloroacético
TNAP: Fosfatase alcalina específica tecidual
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
UDP: Difosfato de uracila
UMP: Monofosfato de uracila
UTP: Trifosfato de uracila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Sinalização Purinérgica	11
2.2 Sinalização Purinérgica na Vasculatura	16
2.3 Aspectos gerais sobre a Hipertensão	17
2.4 O Cerrado e a <i>Sabicea brasiliensis</i> Wernh.....	19
3 OBJETIVOS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Amostras de plantas e obtenção da fração hidro-metanólica	22
4.2 Cultivo celular e tratamento das células	23
4.3 Teste de viabilidade celular por MTT em resposta à fração HM de <i>S. brasiliensis</i> Wernh	24
4.4 Análise das atividades das ectonucleotidases em células A7r5.....	24
4.4.1 Medida da atividade da E-NTPDase	24
4.4.2 Medida da atividade da E-NPP.....	25
4.5 Determinação de proteínas	25
4.6 Análise estatística	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Diferentes eventos em muitos tecidos, incluindo o sistema vascular, são mediados por nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, e seus níveis são controlados pela ação das ectonucleotidases, as quais hidrolisam Trifosfato de adenosina (ATP) em Difosfato de adenosina (ADP), ADP em Monofosfato de adenosina (AMP) e AMP em adenosina (ADO) (THOMÉ, 2012) e, consequentemente, regulam a duração e a extensão da ativação dos receptores para essas purinas (CHEN; GUIDOTTI, 2001). Os receptores purinérgicos estão ancorados na membrana celular e são classificados conforme suas distintas sensibilidades ao ATP, ADP e à ADO (YEGUTKIN, 2008).

Uma vez que o ATP e o ADP são liberados na circulação sanguínea, influenciam o tônus vascular, promovendo a vasoconstrição e/ou vasodilatação conforme o receptor ativado, e a agregação plaquetária, além de intermediar diversas respostas inflamatórias por linfócitos, granulócitos e macrófagos (SCHULTE et al., 2000). Todavia, através da transdução de sinal, o ATP e o ADP circulantes são rapidamente hidrolisados a AMP pelas enzimas da família E-NTPDase e E-NPP (ZIMMERMANN, 2001; KUKULSKI et al., 2005); e à ADO, reconhecidamente vasodilatadora, via ação da ecto-5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 1992; HUNSUCKER et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte no mundo. A OMS estima que em 2030 quase 23.6 milhões de pessoas morrerão de DCV, e um dos fatores mais importantes associados ao desenvolvimento destas patologias é a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS). Ainda de acordo com a OMS, a hipertensão ocasionou 9,4 milhões de mortes prematuras em 2010, e em 2014 atingiu cerca de 22% da população maior de 18 anos. No Brasil, 30 milhões de pessoas são hipertensas, conforme a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2010), e estudos brasileiros (BRANDÃO et al., 2003) têm mostrado prevalência desta patologia entre 12% e 35% em diferentes regiões do país.

A HAS é uma patologia multifatorial e poligênica, envolvendo complexas interações entre mecanismos de controle homeostático determinados geneticamente e por fatores ambientais (TAKAHASHI; SMITHIES, 2004). Pode

ser caracterizada pela elevação da pressão sanguínea sistêmica, ou seja, pelo aumento do volume de débito cardíaco ou pelo aumento da resistência periférica (GANONG, 1995), além de frequentemente coexistir com outras anormalidades, como a arteriosclerose (DING, 1996) e suas consequências – infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e lesões renais (SILBERNARGL; DESPOPOULOS, 2003). Entretanto, 90% dos indivíduos hipertensos são considerados como portadores de hipertensão arterial essencial ou primária, em que a causa da patologia não é completamente conhecida (SILBERNARGL; DESPOPOULOS, 2003).

Portanto, devido a importância do sistema purinérgico na regulação de distintas funções do sistema cardiovascular, consideráveis estudos buscam compreender o envolvimento de moléculas na modulação da atividade das ectonucleotidases e, conseqüentemente, na concentração de nucleotídeos da adenina no meio extracelular.

O uso de plantas medicinais para a cura e o tratamento de doenças acompanha a história da humanidade desde os primórdios de sua existência. No Brasil, a utilização de ervas medicinais teve como base a cultura indígena, que foi influenciada pelas culturas portuguesa e africana, contribuindo para o aparecimento de costumes populares que vêm sendo utilizados e difundidos há muitas gerações.

A região do Cerrado brasileiro possui uma ampla biodiversidade, abrigando uma variada flora, cujos compostos bioativos são utilizados em diferentes pesquisas. Dentre as diversas plantas estudadas, destaca-se a *Sabicea brasiliensis* Wernh, que se trata de um arbusto com aproximadamente 80 cm de altura, popularmente conhecido como "sangue de Cristo" (DELPRETE et al., 2005).

A atividade antioxidante de algumas plantas é utilizada no combate ao estresse oxidativo, responsável pela gênese e consolidação de distintas patologias. As propriedades antioxidantes de *S. brasiliensis* Wernh, caracterizadas a partir do extrato metanólico por Batista et al (2014), apontam a escopoletina, o ácido ursólico, os ácidos cafeoilquínicos e os triterpenos como as moléculas bioativas capazes de desempenhar um papel preventivo em diferentes doenças, sugerem seu uso popular no controle da pressão arterial (PA), tratamento de infecção genital e

inflamação em mulheres (YAZBEK et al., 2016).

A *S. brasiliensis* Wernh é facilmente encontrada no Cerrado brasileiro e apresenta grande potencial terapêutico, considerando a presença de compostos já caracterizados. Deste modo, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da fração hidro-metanólica (HM) das raízes de *S. brasiliensis* Wernh, cujo potencial antioxidante já verificado em um estudo anterior realizado pelo grupo (OLIVEIRA, 2017, dados não publicados), sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em células musculares lisas vasculares (CMLVs) da linhagem A7r5.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sinalização Purinérgica

Os nucleotídeos estão presentes em todos os organismos e são responsáveis por vários processos metabólicos, cuja função varia de acordo com o seu local de atuação. Os nucleotídeos intracelulares participam de reações que demandam energia, como transporte e biossíntese; são componentes estruturais de cofatores enzimáticos; atuam como segundo mensageiro em respostas hormonais; e participam no armazenamento e na transmissão da informação genética (RODWELL et al., 2016). Já os nucleotídeos presentes no meio extracelular desempenham o papel de moléculas sinalizadoras em diferentes tecidos (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2009).

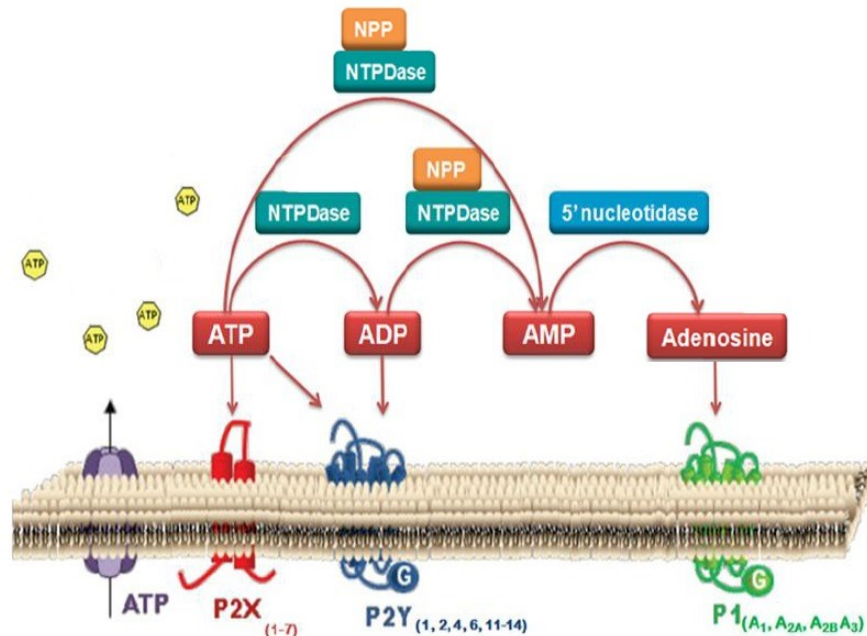
Pela primeira vez, Burnstock (1972) propôs o conceito de que o ATP é uma potente molécula sinalizadora na neurotransmissão. A partir deste estudo, muitas pesquisas vêm sendo publicadas mostrando o envolvimento em distintos processos fisiológicos e patológicos, tais como neurotransmissão e neuromodulação dos sistemas periférico e central (BOARDER et al., 1995); proliferação e diferenciação celular (BURNSTOCK, 2006); apoptose (BURNSTOCK, 2012); controle da secreção de glândulas endócrinas (THORN; JARVIS, 1996); nocicepção (BUCELL et al., 1996); transporte de Cl⁻ no epitélio

das vias aéreas (ZIMMERMANN, 1996); função renal (DZHANDZHUGAZYAN; BOCK, 1993) e doenças dos sistemas ósseo e cartilaginoso (DZHANDZHUGAZYAN; BOCK, 1997). Quanto ao sistema cardiovascular, a sinalização purinérgica está presente no crescimento celular (ERLINGE, 1998), na agregação plaquetária, na vasoconstrição e vasodilatação, e na transmissão simpática (RALEVIC; BURNSTOCK, 1991), através da ligação do ATP, ADP e AMP aos seus respectivos receptores de membrana.

Os receptores purinérgicos podem ser divididos conforme sua sensibilidade aos nucleotídeos e nucleosídeos ligantes. Os purinoreceptores P1 são responsáveis somente à ADO, enquanto que os receptores P2 são divididos em dois grupos distintos: P2X e P2Y. Os receptores P2X, com sete subtipos reconhecidos (P2X1 até P2X7) são canais iônicos que, em resposta ao ATP, bloqueiam os cátions extracelulares e estão presentes principalmente em células excitáveis (RALEVIC et al., 1998; NORTH, 2002). Os receptores P2Y podem ser ativados por ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-glucose, estão acoplados à proteínas G e são categorizados em subfamílias que se agrupam predominantemente a Gq (P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2Y11), ativando a fosfolipase C- β , e uma subfamília acoplada a Gi (P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) que inibem a adenil ciclase e regulam canais iônicos (ABBRACCHIO et al., 2006). A família de receptores P2 está distribuída em sistemas vasculares, nervosos e cardíacos (BURNSTOCK et al., 2014).

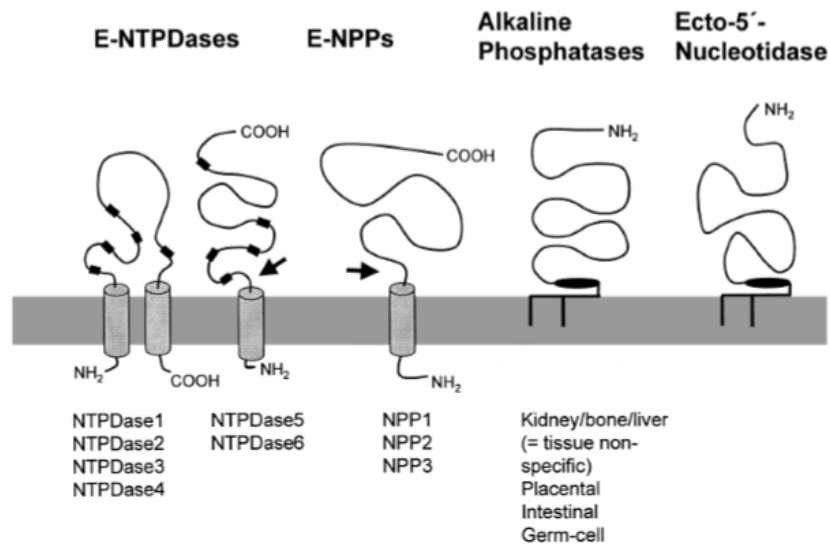
Após exercerem suas ações, os nucleotídeos possuem seus níveis controlados pelas enzimas denominadas ectonucleotidases, as quais hidrolisam ATP em ADP, ADP em AMP, e este em ADO e, conseqüentemente, regulam a duração e a extensão da ativação dos receptores (KNOWLES, 2001). Quatro famílias de ectonucleotidases são responsáveis pela remoção de grupamentos fosfato dos nucleotídeos, transformando-os em nucleosídeos: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), ectonucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterases (E-NPPs), fosfatases alcalinas e ecto-5' nucleotidase.

Figura 1: Esquema geral do sistema purinérgico. É possível visualizar a liberação do ATP intracelular para o meio extracelular e sua degradação até adenosina (ADO), de acordo com a ação das ectonucleotidases. Ainda, observa-se a ativação dos receptores purinérgicos P2X (exclusivos para o ATP), P2Y (receptores para o ATP/ADP) e P1 (receptores para a ADO).



Fonte: Adaptado de Ornelas (2013)

Figura 2: Topografia de membrana prevista para as ectonucleotidases.



Fonte: Zimmermann (2001)

Fosfatases alcalinas (APs) são fosfomonoesterases não específicas que catabolizam ATP, ADP e AMP, e liberam fosfato inorgânico. A fosfatase alcalina não específica tecidual (TNAP) está ancorada no grupo glicosilfosfatidil inositol

da membrana plasmática (FONTA et al., 2005) e já foi identificada no tálamo, bulbo olfatório, córtex cerebral, *caudoputamen*, hipotálamo, colículo e cerebelo (LANGER et al., 2008). Além disso, um estudo utilizando levamisole, um inibidor da TNAP, bloqueou a hidrólise de ATP à ADO na sinalização neuronal-glia através do receptor A2A (DOENGI et al., 2008), indicando que a TNAP é importante para a sinalização purinérgica.

As E-NPPs constituem um grupo de 7 enzimas (E-NPP1-7) estruturalmente relacionadas que estão localizadas na superfície da membrana plasmática com ampla especificidade por seus substratos e catalisam a hidrólise de ligações pirofosfato e fosfodiéster em ácidos nucleicos, açúcares nucleotídicos, (di)nucleotídeos, bem como em ésteres de fosfato de colina e em lisofosfolipídeos (VOLLMAYER et al., 2003). No entanto, apenas as E-NPPs 1-3 podem hidrolisar nucleotídeos (BUFFON et al., 2010; STEFAN et al., 2006).

As E-NPPs 1-3 foram localizadas em quase todos os tecidos (BOLLEN et al., 2000), embora suas isoformas estejam frequentemente em subestruturas específicas e/ou tipos de células (GODING; HARAHP, 1988; NARITA et al., 1994; BLASS-KAMPMAN et al., 1997; JHONSON et al., 2001) como por exemplo em capilares do cérebro (VOLLMAYER et al., 2003), células de glioma C6 de rato (GROBBEN et al., 1999), plaquetas (FÜRSTENAU et al., 2006), células epiteliais do plexo coróide (FUSS et al., 1997), tumores mamários sólidos (BUFFON et al., 2010) e em astrócitos imaturos (VOLLMAYER et al., 2003).

Estas enzimas estão envolvidas na reciclagem dos nucleotídeos, na sinalização purinérgica e no controle dos níveis de pirofosfato (STEFAN et al., 2006). Outros papéis sugeridos incluem envolvimento na sinalização do receptor de insulina (GIJSBERS et al., 2003), modulação da atividade da ecto-quinase (VOLLMAYER et al., 2003) e calcificação da célula muscular lisa (JHONSON et al., 2005; VILLA-BELLOSTA et al., 2011; PROSDOCIMO et al., 2010), como fator de motilidade autócrina (STRACKE et al., 1992) e também no crescimento celular e formação de vasos sanguíneos (KOIKE et al., 2006). Além disso, um estudo realizado por Langer e colaboradores (2008) correlaciona a elevada expressão de E-NPPs em vasos cerebrais com a tromborregulação.

No que se refere à inibição da atividade da E-NPP, um estudo publicado por Asensio e colaboradores (2007) demonstrou a capacidade de algumas

moléculas, como a heparina, em inibir a hidrólise de membros da família E-NPP e, posteriormente, a inibição por EDTA foi comprovada (ZIMMERMANN et al., 2012). No entanto, compostos bioativos capazes de alterar a hidrólise dessa enzima ainda não foram descritos

O principal papel do ecto 5'-nucleotidase é a hidrólise de uma variedade de nucleosídeos monofosfatos como AMP, CMP, UMP e GMP aos seus respectivos nucleosídeos extracelulares (COLGAN et al., 2006). O AMP é o hidrolisado mais eficientemente, formando ADO que desempenha um importante papel na ativação dos purinoreceptores do tipo P1. Esta enzima é responsável por diferentes efeitos dependendo da sua expressão celular e tecidual, atuando em células renais, do cérebro, fígado, cólon, pulmão e placenta humana (YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN et al., 2012); contudo, são predominantemente encontradas em endotélios vasculares, como a aorta, carótida e artéria coronária (KOSZALKA et al., 2004).

As E-NTPDases são uma ampla família com distribuições diferentes em tecidos e divergentes quanto à especificidade do substrato, podendo catabolizar ATP e/ou ADP de acordo, com a especificidade de cada enzima. Assim, a NTPDase1 hidrolisa igualmente bem o ADP e o ATP; enquanto que as NTPDases 3 e 8 possuem preferência intermediária pela hidrólise do ATP sobre o ADP, com razões de hidrólise ATP:ADP equivalentes a 3:1 e 2:1, respectivamente. A NTPDase2 e a NTPDase7 são caracterizadas pela maior capacidade de hidrolisar ATP. A ordem de especificidade de substrato para as NTPDases 4 e 5 é UDP > GDP > CDP; e para a NTPDase6 é GDP > IDP > UDP (ROBSON et al., 2006).

Quanto à localização, a E-NTPDase1 está localizada na superfície dos vasos sanguíneos, no sistema nervoso central (SNC) e na microglia (BRAUN et al., 2000). A E-NTPDase2 está associada a células progenitoras de cérebro de roedores adultos (BRAUN et al., 2003) e em vasos muscularizados (ROBSON et al., 2005), astrócitos cultivados (WINK et al., 2006), células de Schwann não mielinizantes e em outras células gliais do SNC e periférico (ROBSON et al., 2006). A E-NTPDase3 é expressa em várias regiões do cérebro (VORHOFF et al., 2005) e a E-NTPDase8 é expressa no fígado, rins e jejuno (BIGONESSE et al., 2004).

As NTPDases podem ser alteradas por várias condições fisiológicas e patológicas. Estudos mostram que um aumento na expressão de NTPDase1 em plaquetas de pacientes hipercolesterolêmicos tem sido associado a um aumento na hidrólise de ATP e ADP (MEDEIROS; GUTIERRES et al., 2014). Quanto a eficácia de moléculas bioativas, alguns estudos como o de Mendes e colaboradores (2003), vêm sugerindo que polifenóis podem modular o sistema purinérgico, atuando em conjunto na liberação de nucleotídeos vasodilatadores

Devido à criação dos camundongos deficientes em NTPDase1 (cd39 ^{-/-}, *Entdp1*^{-/-}) e à confirmação da presença das NTPDases ancoradas na membrana de CMLVs (PEARSON et al., 1980; GORDON et al., 1989), o papel da NTPDase1 como uma ectonucleotidase vascular foi reafirmado, além de confirmar sua importância no controle da hemostasia e da tromborregulação, pela sinalização purinérgica (ENJYOJI; IMAI; ZIMMERMANN, 1999).

2.2 Sinalização Purinérgica na Vasculatura

As células musculares lisas (CML) são mononucleares, fusiformes, apresentam morfologia alongada e um citoplasma saturado de filamentos de actina e miosina. As CML vasculares estão localizadas entre a camada de células endoteliais (íntima) e a camada adventícia, com a finalidade de participar de processos fisiológicos como a contração e o relaxamento dos músculos dos vasos sanguíneos (ALBERTS et al., 2002). Além disso, tanto as CML, quanto as células endoteliais, são fontes de nucleotídeos extracelulares, transportando-os do citosol através das membranas (YEGUTKIN, 2008) até o meio extracelular, onde atuarão como mensageiros celulares.

A hipótese de que os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina tinham ação em vasos sanguíneos surgiu pela primeira vez em 1929, proposta por DRURY e SZENT-GYORGYI. Desde então, diferentes autores vêm demonstrando o importante papel da sinalização purinérgica na regulação cardiovascular (MARCUS et al., 2003; FÜRSTENAU et al., 2006; POCHMANN et al., 2008) e seu envolvimento em distintas condições clínicas cardiovasculares (ROSSATO et al., 2003; FÜRSTENAU et al., 2008) a partir de estudos correlacionando a

presença das ectonucleotidases, seu potencial enzimático e a ativação dos receptores purinérgicos.

No Brasil, um estudo demonstrou através de imunocitoquímica e RT-PCR, que a maioria das enzimas da família NTPDase (NTPDases 1, 2, 3, 5 e 6) e ecto-5'-nucleotidase estão presentes nas CMLVs. Essa descoberta sugere que o sistema purinérgico nestas células esteja organizado de modo que os nucleotídeos exerçam seus efeitos mais nas próprias CMLVs do que em células vizinhas (TAMAJUSUKU, 2005).

A ligação do ATP e/ou ADP a diferentes tipos de receptores P2 nos vasos sanguíneos conferem uma ação vasodilatadora ou vasoconstritora, as quais, se desreguladas, podem trazer desequilíbrio ao sistema e ao organismo, tornando-o mais suscetível ao desenvolvimento de patologias. Além da importância da ativação de cada subtipo de receptor purinérgico nas células da vasculatura, os distintos níveis de expressão das enzimas acarretam em níveis desiguais de nucleotídeos circulantes, fazendo com que a mesma molécula acarrete efeitos opostos, mesmo que os tecidos estejam próximos. Por exemplo, o ATP possui efeitos contráteis mediado por sua ligação a receptores P2X em CMLVs (RALEVICK; BURNSTOCK, 1991) e efeitos mitogênicos quando da sua ligação a receptores P2Y (ERLINGE, 1998; DI VIRGILIO; SOLINI, 2002), além de, assim como a ADO, ser considerado um importante vasodilatador (RONGEN et al., 1997).

2.3 Aspectos gerais sobre a Hipertensão

A HAS é definida pelas Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010) como uma condição clínica multifatorial, caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg, que associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e à alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais. Além do mais, pode ser considerada como o maior fator de risco relacionado às DCV e manifesta características próprias (KANNEL, 1993).

Atualmente, a HAS é um dos problemas de saúde pública mais importantes no mundo, e os dados a respeito da prevalência desta síndrome no Brasil são escassos. No entanto, de acordo com um estudo publicado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2015), em torno de 36 milhões de indivíduos adultos (32,5%) apresentam hipertensão arterial sistêmica e mais de 60% dos idosos manifestam tal condição, contribuindo para 50% das mortes por DCV. Apesar desses dados, é importante considerar que há uma grande porcentagem de indivíduos que desconhecem serem portadores da HAS. Para o diagnóstico da HAS, a medida da PA é realizada e avaliada conforme as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010) e classificada conforme tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação da Pressão Arterial, em mm Hg, de acordo com medição a partir de 18 anos de idade. Pressão arterial sistólica (PAS); Pressão arterial diastólica (PAD).

Classificação	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)
Normal	≤ 120	≤ 80
Pré-hipertensão	121-139	81-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110

Considera-se hipertensão sistólica isolada se PAS ≥ 140 mm Hg e PAD < 90 mm Hg, devendo a mesma ser classificada em estágios 1,2 e 3.

Fonte: DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL (2010)

Além da classificação da PA, a síndrome pode ser categorizada de duas maneiras: primária ou secundária. Quando a causa não pode ser atribuída a outra doença subjacente, ela é dita primária ou essencial; e, é conhecida como secundária quando se manifesta associada a outras enfermidades (THIBONNIER; SCHORK, 1995). A menor porcentagem de indivíduos hipertensos (5% a 10%) apresenta a hipertensão dita secundária, em que se associa os sintomas hipertensivos a outras patologias como doenças renais, doenças adrenocorticais, entre outras. Desta forma, cerca de 90% dos indivíduos hipertensos são considerados como portadores de hipertensão arterial primária, cuja causa não é completamente conhecida (SILBERNARGL; DESPOPOULOS, 2003).

2.4 O Cerrado e a *Sabicea brasiliensis* Wernh

Segundo o Ministério da Saúde (2001), quando um vegetal possui uma história de uso tradicional como agente terapêutico, este pode ser considerado uma planta medicinal. Nos últimos tempos, o número de pesquisas associando os efeitos dos metabólitos secundários em organismos vem crescendo e provando eficácia para a produção de inúmeros medicamentos inovadores. Nesse sentido, a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química desenvolvida a partir de produtos naturais (BAKER et al., 2007).

O Brasil é composto por cinco áreas com ampla diversidade biológica, abrigando cerca de 20% de toda a biodiversidade mundial de acordo com a Convenção de Diversidade Biológica (2012). O Cerrado é o segundo maior bioma do país, ocupando 23% do território nacional. Diante desta realidade, a bioprospecção de moléculas biologicamente ativas, presentes em nossos biomas, vem despertando interesse de muitos pesquisadores que buscam bioprodutos de valor como fonte de novos fármacos. Dentre as diversas plantas estudadas destaca-se nas regiões do Cerrado brasileiro a *S. brasiliensis* Wernh, um arbusto com aproximadamente 80 cm de altura, popularmente conhecido como “sangue-de-Cristo” (DELPRETE et al., 2005).

O gênero *Sabicea* pertence à família Rubiaceae, é composto por aproximadamente 100 espécies distribuídas pela América Tropical e África, sendo que cerca de 45 a 50 espécies estão presentes na região neotropical (DELPRETE et al., 2005). Recentemente, um estudo realizado por Yazbek e colaboradores (2016) apontou que a espécie *S. brasiliensis* Wernh é empregada popularmente para o controle da PA, tratamento de infecção genital e inflamação em mulheres

Figura 2: *S.brasiliensis* Wernh.



Fonte: Plantas que curam – Autor: Daniel Carvalho Gonçalves (2017)

Os metabólitos secundários presentes nas raízes de *S. brasiliensis* Wernh foram caracterizados a partir do estudo fitoquímico realizado por Batista e colaboradores (2014), exibindo a presença das seguintes moléculas: ácido 5-*O*-cafeoilquínico, uma mistura dos ácidos 4,5 e 3,5-*O*-dicafeoilquínicos, cumarina escopoletina, triterpeno ácido ursólico, esteroides β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, esteroide glicosilado daucosterol e dissacarídeo α -D-glicopiranosil- β -D-frutofuranosídeo conhecido como sacarose. Além disso, o mesmo estudo concluiu que as frações AE e butanólica apresentavam atividade anti-inflamatória significativa no modelo de migração celular.

Em virtude das relevantes pesquisas demonstrando a importância do sistema purinérgico no sistema cardiovascular, notáveis estudos buscam compreender o envolvimento de moléculas bioativas na modulação das ectonucleotidases e, conseqüentemente, na concentração de nucleotídeos da adenina no meio extracelular. Inicialmente, estudos realizados por Schmatz (2009) e Jaques (2011) comprovaram que as ectonucleotidases são sensíveis a compostos fenólicos como resveratrol e curcumina. Em seguida, Anwar e colaboradores (2013) mostraram que o ácido cafeico pode alterar a hidrólise de nucleotídeos da adenina em plaquetas e Akomolafé (2017) encontrou diferentes níveis de nucleotídeos extracelulares no sistema nervoso central de ratos quando tratados com cafeína e ácido cafeico. Esses trabalhos sugerem que moléculas bioativas são capazes de alterar o perfil enzimático das ectonucleotidases e,

consequentemente, influenciar a extensão de receptores purinérgicos ativos e suas respectivas funções.

Com base nesses estudos, hipotetizamos que a fração HM de *S. brasiliensis* Wernh não afeta a viabilidade das células CMLVs da linhagem A7r5, sendo capaz de modular o sistema purinérgico através das ectonucleotidases, contribuindo para a regulação do tônus vascular e da pressão arterial.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da fração hidro-metanólica das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh sobre a atividade das ectonucleotidases em células musculares lisas vasculares da linhagem A7r5.

Objetivos específicos

- Obter a fração hidro-metanólica (HM) das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh;
- Tratar as células musculares lisas vasculares da linhagem A7r5 com a fração HM obtida das raízes de *S. brasiliensis* Wernh nas concentrações 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;
- Avaliar a viabilidade celular em resposta ao tratamento com a fração HM de *S. brasiliensis* Wernh nas concentrações 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;
- Avaliar o efeito concentração-resposta da fração HM das raízes de *S. brasiliensis* Wernh na hidrólise de ATP, ADP e p-Nph-5'-TMP na linhagem celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de plantas e obtenção da fração hidro-metanólica

As raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh foram coletadas em Lagoa Formosa - MG, Brasil (18°41'41.8"S 46°27'51.9"W). O espécime voucher de *S. brasiliensis* Wernh foi cadastrado no sistema SisGen sob o número AF3A83D e identificado sob o número 74.313 para o armazenamento no Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. As amostras das raízes foram limpas com água para remover o solo e depois secas a

40°C durante 30 horas. As amostras secas passaram pelo processo de moagem em moinho de facas até pulverização. Em seguida, 190 g do pó obtido das raízes de *S. brasiliensis* Wernh foram maceradas exaustivamente à temperatura ambiente com 500 mL de solução de metanol e água (1:1, v/v) durante 15 dias, com a substituição da solução de extração a cada três dias. No final da maceração, toda a solução extraída foi filtrada em papel filtro Whatman No. 2 (Whatman International Ltd., Kent, Inglaterra, Reino Unido) duas vezes; concentrada usando um evaporador rotatório (801 Fisatom® Ltda) e; finalmente, liofilizada (Liotop® Liofilizador L101) para a obtenção do extrato bruto. Em seguida, 12 g de extrato bruto foram dissolvidas em solução de água:metanol (9:1, v/v) e particionadas exaustivamente com solvente n-hexano e acetato de etila (AE) em um funil de separação. Cada amostra foi concentrada em evaporador rotatório para obter a fração hexânica, a fração AE e o resíduo de partição foi considerado como a fração HM. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até seu uso.

4.2 Cultivo celular e tratamento das células

A linhagem celular de células musculares lisas de aorta de ratos, A7r5, foi obtida da American Type Culture Collection, ATCC® e as células foram cultivadas em placas de 24 ou 96 poços, em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Invitrogen), suplementado com FBS (Soro Fetal Bovino) a 10% (Invitrogen), 100 U/mL penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina a 37°C, e atmosfera de 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada. Todos os ensaios foram realizados com células entre a 3^a e a 5^a passagens. Depois de atingir 80-90% de confluência, as células A7r5 foram privadas de soro por 3 horas e, em seguida, tratadas com a fração HM a 62,5; 125; 250 e 500 µg·mL⁻¹ em meio DMEM suplementado com FBS a 5% por 48 horas para as medidas de atividade específica das ectonucleotidases ou 24, 48 e 72 horas para os ensaios de MTT.

4.3 Teste de viabilidade celular por MTT em resposta à fração HM de *S. brasiliensis* Wernh

Uma solução de 5mg/mL de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) foi preparada e diluída em meio na seguinte proporção: 1 mL MTT/ 10 mL de meio de cultura. Foram plaqueadas um total de 10^4 células A7r5 em placas de 96 poços e, após o tratamento com a fração HM de *S. brasiliensis* Wernh nas concentrações: 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e nos períodos: 24, 48 e 72h, o MTT foi adicionado às células em triplicata por 4 horas na estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período, foram adicionados 200 uL de dimetilsufóxido (DMSO) a cada poço, e a leitura da placa foi realizada no leitor de placas a 560 nm (Robonik®). Os resultados de viabilidade celular foram calculados conforme a equação a seguir:

$$\text{VIABILIDADE (\%)} = \frac{(\text{Abs tratamento} - \text{Abs controle})}{\text{Abs DMSO} - \text{Abs controle}} \times 100$$

Sendo que:

Abs tratamento = Absorbância das células tratadas com a fração HM

Abs controle = Absorbância das células não tratadas

Abs DMSO = Absorbância do DMSO (sem células)

4.4 Análise das atividades das ectonucleotidases em células A7r5

4.4.1 Medida da atividade da E-NTPDase

Após o tratamento com a fração HM de *S. brasiliensis* Wernh nas concentrações 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 48 horas, células A7r5 aderidas em placas de 24 poços foram incubadas em triplicata com nucleotídeos (ATP e ADP 500 μM) em 0,5 mL de um meio de reação contendo [em mM, concentração final]: 20 Hepes, 2,0 CaCl₂, 120 NaCl, 5 KCl, 10 Glucose, pH 7,4, a 37°C. Após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida transferindo-se uma alíquota de 0,2 mL para um tubo contendo 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA, 5%) em gelo. Em seguida, 1 mL de reagente verde de malaquita foi adicionado aos tubos. Alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para uma microplaca de 96 poços e o

fosfato inorgânico (Pi) liberado foi medido em leitor de placas a 630 nm (Robonik®), de acordo com Baykov et al (1988). Os controles usados para corrigir a hidrólise não enzimática dos substratos foram realizados pela incubação com meio de reação sem o substrato. As atividades enzimáticas foram expressas como nmol de Pi por minuto por miligrama de proteína.

4.4.2 Medida da atividade da E-NPP

Para a medida da atividade E-NPP, após o tratamento com a fração HM de *S. brasiliensis* nas concentrações de 0, 62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 48 horas, células A7r5 aderidas em placas de 24 poços foram incubadas com o substrato artificial marcador para a enzima p-Nph-5'-TMP (5'TMP, 500 μM) em 0,2 mL de um meio de reação contendo [em mM, concentração final]: 50 Tris, 2,0 CaCl_2 , 120 NaCl, 5,0 KCl, 10 Glucose pH 8,9, a 37°C. Após 40 minutos de incubação, a reação foi interrompida transferindo-se os 0,1 mL da mistura de reação para uma microplaca de 96 poços contendo 0,1 mL de NaOH a 0,2 N em gelo. Em seguida, a quantidade de p-nitrofenol formado foi medida a 405 nm em leitor de placas (Robonik®), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $18,8 \times 10^{-3}/\text{M}/\text{cm}$. Os controles usados para corrigir a hidrólise não enzimática dos substratos foram realizados pela incubação com meio de reação sem o substrato artificial. As atividades enzimáticas foram expressas como nmol p-nitrofenol por minuto por miligrama de proteína.

4.5 Determinação de proteínas

Após o ensaio de hidrólise, as células foram solubilizadas com 100 μL de NaOH 1,0 N e congeladas. No dia seguinte, 50 μL de solução de células foram transferidas para tubos de ensaio e a concentração de proteína total das amostras foi determinada pelo método de Coomassie Blue, de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

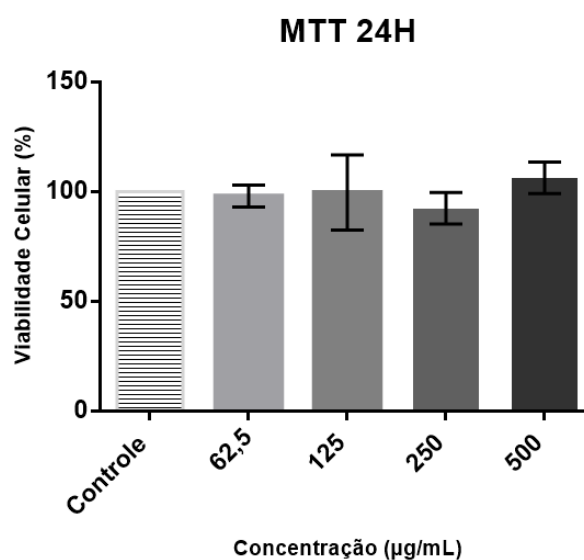
4.6 Análise estatística

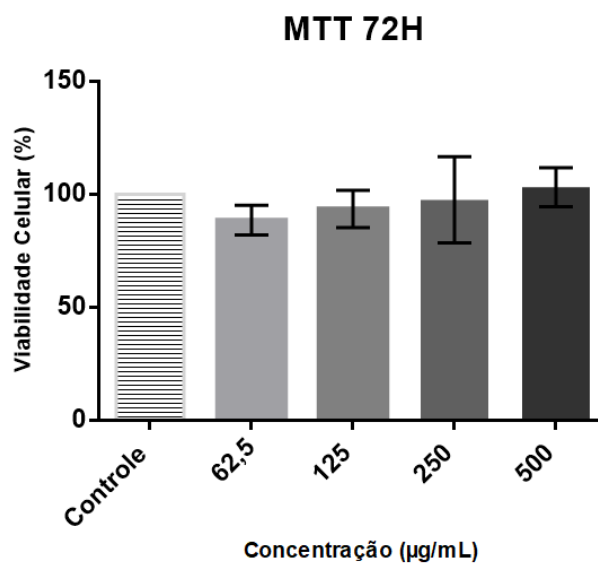
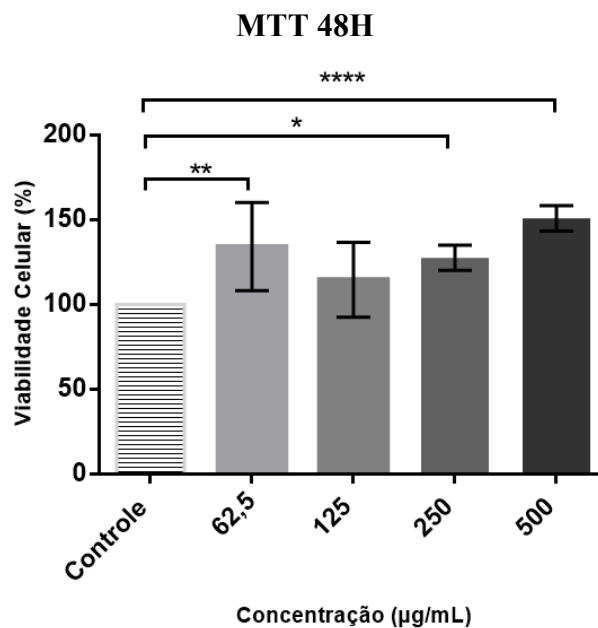
Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (S.D.) e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) e consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o efeito citotóxico da fração HM de *S. brasiliensis* Wernh na linhagem A7r5, as células foram tratadas em diferentes concentrações da fração por períodos de 24, 48 e 72 horas, e a viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT. De acordo com os resultados obtidos, as concentrações 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não foram citotóxicas para as células A7r5, em 24, 48 e 72 horas, conforme mostram os gráficos abaixo.

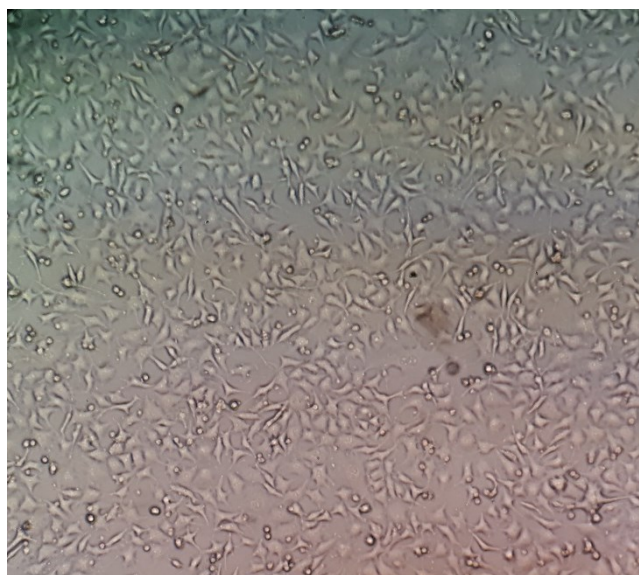
Figura 3: Efeito da fração HM de *S. brasiliensis* Wernh sobre a viabilidade celular da linhagem A7r5 após 24, 48 e 72 horas de tratamento, medida através do ensaio colorimétrico utilizando MTT (n=3) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).





Pode-se observar, no segundo gráfico da Figura 4, que a fração HM se mostrou como potencial agente proliferativo no período de 48 horas, ou seja, houve um aumento da viabilidade celular da linhagem A7r5 significativa em relação aos controles (células não tratadas), considerando $p < 0.05$.

Figura 4: Células musculares lisas vasculares da linhagem A7r5 em cultura (Passagem: P3, aumento de 10x).



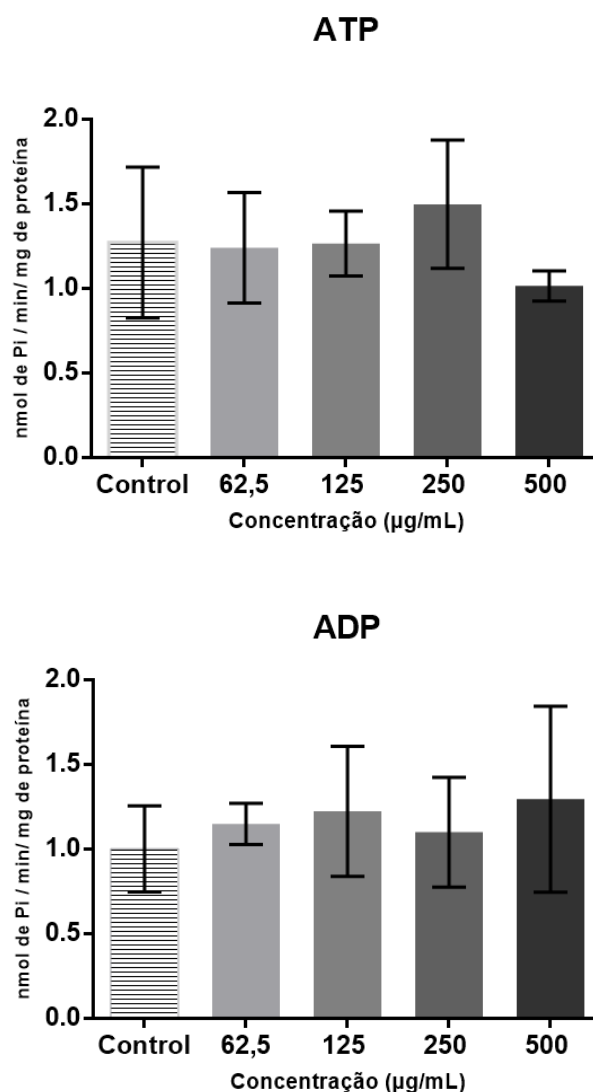
Fonte: Própria autora (2018)

Apesar do crescente número de estudos em busca de moléculas antiproliferativas, principalmente para a prevenção de DCV como aterosclerose, hipertensão pulmonar e em casos de reestenose (SINGH et al., 2002; RUDIJANTO, 2007; TAJASIC; MORRELL, 2011), resultados evidenciando agentes proliferativos também vêm se tornando relevantes em pesquisas que buscam substâncias capazes de acelerar o remodelamento vascular em resposta a angioplastia; ampliar o espessamento da camada íntima durante doenças arteriais e no crescimento de novos vasos no decorrer da cicatrização de feridas e em tumores (SCHACHTER, 1990; GIBBONS; ROSS, 1993). Ainda, estudos como o de Viegas (2012), justificam a propriedade proliferativa de algumas moléculas a um possível efeito protetor a espécies reativas, de oxigênio ou de azoto, em que podem diminuir os níveis dos oxidantes ou impedir a formação destes por preservarem os próprios sistemas antioxidantes das células.

O presente estudo teve como objetivo avaliar se a fração hidro-metanólica de *Sabicea brasiliensis* Wernh contém moléculas capazes de influenciar a atividade enzimática das ectonucleotidases, alterando a hidrólise de seus substratos na superfície de musculares lisas vasculares. O ensaio colorimétrico pelo reagente verde de malaquita foi utilizado para quantificar o Pi (fosfato inorgânico) formado. De acordo com os gráficos abaixo, não houve diferença

estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas hidrólises de ATP e ADP entre o controle (células sem tratamento) e os grupos experimentais (células tratadas com a fração HM) em qualquer concentração testada 62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 5).

Figura 5: Efeito do tratamento com a fração HM de *Sabicea brasiliensis* Wernh na hidrólise de ATP e ADP em células A7r5. Os resultados são expressos como médias \pm DP, $n = 3$. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

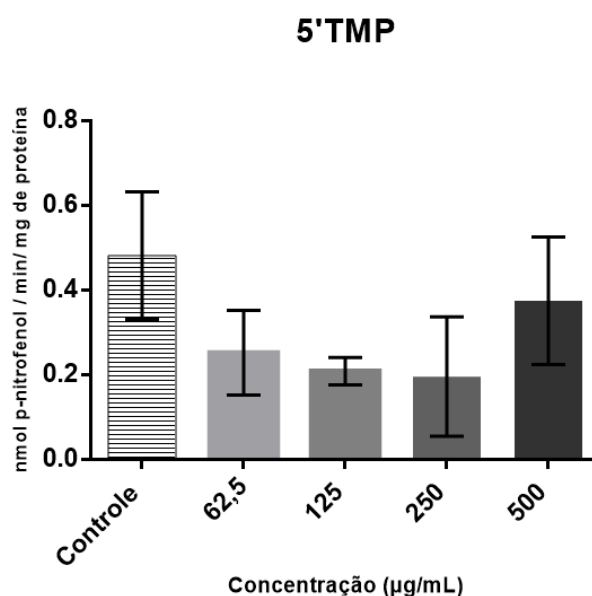


Conforme os resultados obtidos, a atividade da E-NTPDase não foi alterada na presença da fração HM (Figura 5). Quanto a medida da atividade da E-NPP, o substrato artificial permite que se avalie a hidrólise realizada especificamente por esta enzima, sem que haja interferência da E-NTPDase, já que seus substratos podem se sobrepôr. Neste

caso, o produto formado é o p-nitrofenol que apresenta uma coloração amarelada, a qual pode ser diretamente detectada em espectrofotômetro.

Os resultados da hidrólise enzimática do p-Nph-5'-TMP em células A7r5 mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e as concentrações testadas ($p < 0,05$) (Figura 6). No entanto, podemos observar uma tendência a inibição da atividade da E-NPP desde a menor concentração, apontando a necessidade em ampliar o número de repetições do experimento.

Figura 6: Efeito do tratamento com a fração HM de *Sabicea brasiliensis* Wernh na hidrólise do p-Nph-5'-TMP em células A7r5. Os resultados são expressos como médias \pm DP, $n = 3$. Não houve diferenças significativas entre os grupos.



É preciso considerar, no entanto, que o número amostral é pequeno. Dessa maneira, experimentos adicionais são necessários para confirmar os resultados obtidos. Ainda, não descartamos que a fração hidro-metanólica de *S. brasiliensis* Wernh possa modular as ectonucleotidasas em outros níveis, transcricionais e traducionais, por exemplo, os quais não puderam ser verificados no nível funcional, ou pelo pequeno número de repetições realizadas como dito anteriormente, ou por uma rudimentaridade do sistema de detecção.

Embora esta fração não tenha efeito significativo sobre a hidrólise de nucleotídeos e do p-Nph-5'-TMP, ainda não se pode descartar que a *S. brasiliensis* Wernh possua compostos capazes de modificar o perfil de hidrólise destas enzimas. Outras frações obtidas a partir do extrato bruto (acetato de etila e hexânica) podem apresentar melhor

solubilidade aos metabólitos secundários de interesse, fazendo com que retenham o potencial antioxidante da planta. Além disso, a fração HM é considerada um resíduo de partição, ou seja, pode conter remanescentes indesejáveis, sem ação farmacológica, que podem impedir a ação de potenciais agentes moduladores. Outro ponto a ser considerado é que as células A7r5 receberam o tratamento com a fração HM em seu estado basal, ou seja, sem qualquer estímulo. Com a finalidade de se observar um potencial efeito vasodilatador e hipotensivo das moléculas presentes na fração HM, seria interessante realizar um estímulo prévio com algum agente vasoconstritor, simulando uma condição hipertensiva, por exemplo.

Finalmente, também não se pode ignorar que a fração hidro-metanólica possa exercer seus efeitos sobre outros sistemas pressores, como o sistema adrenérgico e o angiotensinérgico, por exemplo, que não foram avaliados nesse estudo. Assim, novos estudos se fazem necessários, como diferentes metodologias de extração, novas condições experimentais e a utilização de outras frações, uma vez que o potencial antioxidante da fração acetato de etila da planta e sua modulação sobre a atividade E-NTPDase já foi confirmada pelo grupo em resultados anteriores (OLIVEIRA, 2017, dados não publicados).

Sabemos que os metabólitos secundários possuem inúmeras atribuições nos vegetais, e muitas dessas funções podem ser empregadas pela indústria farmacêutica. Os compostos fenólicos, alguns já descritos no extrato de *S. brasiliensis* Wernh (Batista et al., 2014), além de serem capazes de neutralizar os radicais livres (AHERNE, 2002; DECKER, 2009), podem alterar o catabolismo de nucleotídeos extracelulares em diferentes frações biológicas (BALDISSARELLI; STEFANELLO et al., 2016). No entanto, sua eficácia é evidente somente quando se utiliza essas moléculas isoladas, como nos estudos citados anteriormente.

É válido ressaltar também que, apesar de não encontrarmos modulação significativa na hidrólise dos substratos, a presença da E-NPP está sendo descrita pela primeira vez em células A7r5. Portanto, os resultados apresentados relativos à atividade E-NPP abrem novas possibilidades de estudo com esta enzima, como a verificação de sua existência nas CMLVs de diferentes organismos e a busca pela sua importância vascular.

6 CONCLUSÃO

A fração hidro-metanólica da *Sabicea Brasiliensis* Wernh não apresentou efeito citotóxico à linhagem A7r5 em nenhuma das concentrações testadas, e se mostrou como um potencial agente proliferativo em 48 horas de tratamento, abrindo possibilidades de estudo em outros contextos fisio(pato)lógicos com a fração HM desta planta. No entanto, a fração não apresentou efeito significativo sobre as atividades ectonucleotidases E-NTPDase e E-NPP. Não se pode desconsiderar que essa fração da planta possua moléculas capazes de modificar a atividade dessas enzimas, se faz necessário condições experimentais e o emprego de novas metodologias, como o isolamento dos compostos bioativos e a avaliação da expressão gênica e proteica das células tratadas.

Por fim, o presente estudo descreve pela primeira vez a atividade E-NPP nas células A7r5, indicando que essa enzima pode possuir um papel importante na vasculatura.

REFERÊNCIAS

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol.** v. 1, p. 1-40, 2010. SCALA, L.C.; MAGALHÃES, L. B.; MACHADO, A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. **Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** 2^a. ed. 2015.

ABBRACCHIO et al. Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacol**, v. 58, p. 281 – 341, 2006.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, v. 18, n. 1, p. 75–81, jan. 2002. Doi: 10.1016/S0899-9007(01)006955

AKOMOLAFE, S. F. et al. Effect of caffeine, caffeic acid and their various combinations on enzymes of cholinergic, monoaminergic and purinergic systems critical to neurodegeneration in rat brain-In vitro. **Neurotoxicology**, v. 62, p. 6–13, set. 2017.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell.** 4th. ed. [s.l.] Garland Science, 2002.

ANWAR, J. 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**, v. 56, 26 fev. 2013.

ASENSIO, A. C. et al. Biochemical analysis of ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase activity in brain membranes indicates involvement of NPP1 isoenzyme in extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates in central nervous system. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 4, p. 581–590, 1 mar. 2007.

AUGUSTO DOS SANTOS JAQUES, J. et al. Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. **Cancer Letters - CANCER LETT**, v. 1, p. 109–115, 1 abr. 2011.

BALDISSARELLI, J. et al. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1849–1857, 1 dez. 2016.

BARNA, B. F. O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico em ratos. p. 36, [s.d.].

BATISTA, J. C. et al. CHEMICAL CONSTITUENTS AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF ROOTS OF *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 4, 2014.

BAYKOV, A. A.; EVTUSHENKO, O. A.; AVAEVA, S. M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. **Analytical Biochemistry**, v. 171, n. 2, p. 266–270, jun. 1988.

Bioquímica Ilustrada de Harper - Victor W. Rodwell, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, P. Anthony Weil. ed. 30, p. 339-346, out. 2016. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=J1N4DQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA339&dq=nucleotideos&ots=09L0E_4tu9&sig=RNcrAnGr3hm_NOXYwGxMyC21VKA#v=onepage&q=nucleotideos&f=false>. Acesso em: 28 out. 2018.

BLASS-KAMPMAN, S. et al. In vitro differentiation of neural progenitor cells from prenatal rat brain: common cell surface glycoprotein on three glial cell subsets. **J Neurosci**, v. 48, p. 95–111, 1997.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8,. **Biochemistry**, v. 43, n. 18, p. 5511–5519, 1 maio 2004.

BOARDER, M. R. et al. G protein-coupled P2 purinoceptors: from molecular biology to functional responses. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 4, p. 133–139, 1 abr. 1995.

BOLLEN, M. et al. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 6, p. 393–432, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRAUN, N. et al. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 1355–1364, 1 abr. 2003.

BRIDI, H.; ALEGRE, P. Isolamento de derivados diméricos de floroglucinol e avaliação da capacidade proliferativa da fração lipofílica de espécies de Hypericum do sul do Brasil. p. 160, 2015.

BUELL, G.; COLLO, G.; RASSENDREN, F. P2X receptors: an emerging channel family. **The European Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 2221–2228, out. 1996.

BUFFON, A. et al. Differential expression of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases by Walker 256 mammary cancer cells in solid tumors and malignant ascites. **Life Sciences**, v. 86, n. 11, p. 435–440, 13 mar. 2010.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24, n. 3, p. 509–581, set. 1972.

COLGAN, S. P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 351, 1 jun. 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **BioEssays**, v. 34, n. 3, p. 218–225, [s.d.].

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 195, n. 4, p. 415–447, abr. 2009.

DANIEL CARVALHO GONÇALVES. **Sangue de Cristo**. 2017. Disponível em: <<http://www.plantasquecuram.blogspot.com/2017/08/sangue-de-cristo.html>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

DECKER, A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396–398, 27 abr. 2009. Doi: 10.1111/j.1753-4887.1997.tb01580.x

DELPRETE, P.G., SMITH, L.B., KLEIN, R.M. **Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 2. 2005.

DING, Y. A. Thrombogenic and lipid risk factors in hypertension and coronary artery disease. **Japanese Circulation Journal**, v. 60, n. 2, p. 75–84, fev. 1996.

DOENGI, M.; DEITMER, J. W.; LOHR, C. New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 7, p. 2368–2378, 29 fev. 2008.

DZHANDZHUGAZYAN, K.; BOCK, E. Demonstration of (Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. **FEBS Letters**, v. 336, n. 2, p. 279–283, 27 dez. 1993.

DZHANDZHUGAZYAN, K.; BOCK, E. Demonstration of an Extracellular ATP-Binding Site in NCAM: Functional Implications of Nucleotide Binding. **Biochemistry**, v. 36, n. 49, p. 15381–15395, 1 dez. 1997.

ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nature Medicine**, v. 5, n. 9, p. 1010–1017, set. 1999.

ERLINGE, D. Extracellular ATP: A Growth Factor for Vascular Smooth Muscle Cells. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 31, n. 1, p. 1–8, 1 jul. 1998.

FONTA, C. et al. Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 486, n. 2, p. 179–196, 30 maio 2005.

FÜRSTENAU, C. R. et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: Kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v. 17, n. 2, p. 84–91, 1 jan. 2006.

FURSTENAU, C. R.; TRENTIN, D. S.; GOSSENHEIMER, A.N.; RAMOS, D.B.; CASALI, E.A.; BARRETO-CHAVES, M.L.; SARKIS, J.J.F. Ectonucleotidase activities are altered in serum and platelets of L-NAME-treated rats. **Blood cells mol**, v. 41, p. 223-229, 2008.

GIBBONS, G. H. Autocrine-paracrine factors and vascular remodeling in hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.2, p. 291–298, 1993.

GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; BOLLEN, M. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1. **Biochemical Journal**, v. 371, n. 2, p. 321–330, 15 abr. 2003.

GROBEN, B. 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**, v. 72, n. 2, p. 826–834, 1 fev. 1999.

GUTIERRES, J. M. et al. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides and platelet aggregation induced by high-fat diet in rats: effects of α -tocopherol. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 487–496, 1 jun. 2014
HARAHP, A. R. GODING, J. W. Distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues. **J Immunol**, v. 141, p. 2317–2320, 1988.

HUNSUCKER, S. A.; MITCHELL, B. S.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 1, p. 1–30, 1 jul. 2005.

IMAI, M. et al. Modulation of nucleoside [correction of nucleotide] triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase-1)cd39 in xenograft rejection. **Molecular Medicine**, v. 5, n. 11, p. 743–752, nov. 1999.

JOHNSON, K. et al. Up-regulated expression of the phosphodiesterase nucleotide pyrophosphatase family member PC-1 is a marker and pathogenic factor for knee meniscal cartilage matrix calcification. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 5, p. 1071–1081, 1 maio 2001.

JOHNSON et al. Chondrogenesis Mediated by PPI Depletion Promotes Spontaneous Aortic Calcification in NPP1^{-/-} Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 4, p. 686–691, 1 abr. 2005.

KANNEL, W. B. Hypertension as a risk factor for cardiac events epidemiologic results of long-term studies. **J Cardiovasc Pharmacol**. V. 21, p. 27-37, 1993.

KLATSKY, A. L. Alcohol-Associated Hypertension: When One Drinks Makes a Difference. **Hypertension**, v. 44, n. 6, p. 805–806, 1 dez. 2004.

KNOWLES, A. F. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 1, p. 21–45, 1 mar. 2011.

KOIKE, S. et al. The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. **Genes to Cells**, v. 11, n. 2, p. 133–142, 1 fev. 2006.

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

LANGER, D. et al. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. **Cell and Tissue Research**, v. 334, n. 2, p. 199, 9 out. 2008.

LESSA, Í. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. v. 8, p. 10, 2001.

L GORDON, E. et al. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, p. 18986–95, 1 dez. 1989.

MANSUR, A. DE P. et al. Trends in Mortality Rate from Cardiovascular Disease in Brazil, 1980-2012. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 1, p. 20–25, jul. 2016.

MARCUS, A.J.; BROEKMAN, M.J.; DROSOPOULOS, J.H.; ISLAM N.; PINSKY, D.J.; SESTI C.; LEVI R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection bt CD39(NTPDase 1). **J. Thromn. Haemost**, v. 1, p. 2497-2509, 2003.

MENDES, A. et al. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 17, n. 6, p. 673–681, dez. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hipertensão atinge mais de 30 milhões de pessoas no País.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2015/04/hipertensao-atinge-mais-de-30-milhoes-de-pessoas-no-pais>>. Acesso em: 16 de junho. 2018

NARITA, M.; GOJI, J.; NAKAMURA, H. et al. Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-1a) from rat brain. **J Biol Chem**, v. 269, p. 28235–28242, 1994.

OLIVEIRA, Douglas Souza. **Antioxidant activity of Sabicea brasiliensis Wernh. roots and its effect on adenine nucleotides metabolism in vascular smooth muscular cells.** 2017. 26 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.

ORNELAS, Flávia Gomes Illa. **Caracterização de ecto-nucleotidasas na glândula pineal de ratos.** 2013. 26 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Usp, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rect=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwi90e_M5jfAhXFhZAKHRVrDNAQFjAAegQIAxAC&url=http%3A%2F%2Fwww.teses.usp.br%2Fteses%2Fdisponiveis%2F42%2F42136%2Ftde-16062014105416%2Fpublico%2FFlaviaGomesIllaOrnelas_Mestrado_P_Corr.pdf&usg=AOvVaw05qqOAaj-x7GygyWKTbArh>. Acesso em: 01 dez. 2018.

PEARSON, J. D.; CARLETON, J. S.; GORDON, J. L. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. **Biochemical Journal**, v. 190, n. 2, p. 421–429, 15 ago. 1980.

PIJACKA, W. et al. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. **Nature Medicine**, v. 22, n. 10, p. 1151–1159, 2016.

POCHMANN et al. AMP hydrolysis in soluble and microsomal rat cardiac cell fractions: kinetic characterization and molecular identification of 5'NT. **Biosci. Report**, v. 28, p.267-273, 2008

PROSDOCIMO, D. A. et al. Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by extracellular pyrophosphate homeostasis: synergistic modulation by cyclic AMP and hyperphosphatemia. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 298, n. 3, p. C702–C713, 16 dez. 2009.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. **Circulation**, v. 84, n. 1, p. 1–14, jul. 1991.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol**, v. 50, p. 413 – 492, 1998.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol**, v. 82, p. 1013 – 1067,

ROBSON, S.C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, p. 409 – 430, 2006.

RONGEN, G. A. et al. Cardiovascular Pharmacology of Purines. **Clinical Science**, v. 92, n. 1, p. 13–24, 1 jan. 1997.

ROSS, R.; The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v.362, p.801–809, 1993.

ROSSATO, E. R. et al. ATP diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries heart disease. **Platelets**, v.14, p. 47-52, 2003.

RUDIJANTO, A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. **Acta Medica Indonesiana**, v. 39, n. 2, p. 86–93, jun. 2007

DRURY, A.N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol**, v. 68, p. 213-237, 1929.

SCHACHTER, M.; Endothelium and smooth muscle: trophic interactions and potential for therapeutic intervention. **J Hum Hypertens**, v. 4, p. 17-21, 1990.

SCHMATZ, R. et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1–3, p. 42–48, 21 maio 2009.

SILBERNARGL, S.; DESPOPOULOS, A. Sistema Cardiovascular. In: (ed). **Fisiologia Texto e Atlas**. Artmed, p. 186-221, 2003.

SINGH, G. et al. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with self-reported osteoarthritis: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **The American Journal of Managed Care**, v. 8, n. 15 Suppl, p. S383-391, out. 2002

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 361–370, jun. 2006.

STEFANELLO, N. et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on components of the purinergic system of streptozotocin-induced diabetic rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 38, p. 145–153, 1 dez. 2016.

STRACKE, M. et al. Identification, purification, purification, and partial sequence analysis of autotoxin, a novel motility-stimulation protein. **J Biol Chem**, v. 267, p. 2524–252, 1992.

TAJSIC, T.; MORRELL, N. W. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 1, p. 295–317, jan. 2011.

TAKAHASHI, N.; SMITHIES, O. Human genetics, animal models and computer simulations for studying hypertension. **Trends in genetics: TIG**, v. 20, n. 3, p. 136–145, mar. 2004.

TAMAJUSUKU, A. S. K. Investigação das Ectonucleotidasas de Células Musculares Lisas Vasculares: Efeito dos Hormônios Tiroideanos e Estradiol. p. 81, [s.d.].

THIBONNIERS, M.; SCHOK, N. J. The genetics of hypertension. **Curr Opin Genet Dev**. v.5, p. 362-70, 1995.

THORN, J. A.; JARVIS, S. M. Adenosine transporters. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 4, p. 613–620, 1 jun. 1996.

VIEGAS, J. C. J. **Potencial Antioxidante e Actividade Biológica In Vitro de um Extracto Enriquecido em Antocianinas de Vaccinium corymbosum L.** 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

VILLA-BELLOSTA, R. et al. Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 1, p. H61–H68, jul. 2011.

VIRGILIO, F. D.; SOLINI, A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 4, p. 831–842, fev. 2002.

VOLLMAYER, P. et al. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 14, p. 2971–2978, jul. 2003.

WINK, M. R. et al. Identification of brain ecto-apyrase as a phosphoprotein. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 213, n. 1–2, p. 11–16, 1 out. 2000.

YAZBEK, P. B. et al. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **Journal of ethnopharmacology**, v. 179, p. 310–331, fev. 2016.

YANG, et al. Baicalein reduces inflammatory process in a rodent model of diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 50, p. 2319–2327, 2009. doi: 10.1167/iovs.08-2642.

YEGUTKIN, G.G. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. **Biochem**, v. 62, p. 724-728, 2008.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, maio 2008.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **The Biochemical Journal**, v. 285 (Pt 2), p. 345–365, 15 jul. 1992.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1–2, p. 44–56, 1996.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, nov. 2001.

ZIMMERMANN, H. Extracellular purine metabolism. **Drug Development Research**, v. 39, n. 3–4, p. 337–352, 1999.

ZIMMERMAN, H.; JINNAH, H. A.; LOCKHART, P. J. Behavioral neuropharmacology. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 4, n. 1, p. 26–35, 2012.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 1 set. 2012.