

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

**EFEITO DO RESVERATROL NOS SISTEMAS
COLINÉRGICO E PURINÉRGICO EM ENCÉFALO DE
RATOS DIABÉTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberta Schmatz

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**EFEITO DO RESVERATROL NOS SISTEMAS
COLINÉRGICO E PURINÉRGICO EM ENCÉFALO DE
RATOS DIABÉTICOS**

por

Roberta Schmatz

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

Orientadora: Vera Maria Morsch
Co - orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

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

**EFEITO DO RESVERATROL NOS SISTEMAS COLINÉRGICO E
PURINÉRGICO EM ENCEFALO DE RATOS DIABÉTICOS**

elaborada por
Roberta Schmatz

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Vera Maria Morsch
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dra. Cristina Wayne Nogueira (UFSM)

Prof. Dr. Rafael Moresco (UFSM)

Santa Maria, 13 março de 2009

***"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se
atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante."***

Charles Chaplin

*Aos meus pais Irineu e Jacinta
Ao meu noivo Eduardo
As minhas irmãs Gabriela e Raquel*

*À vocês, amores da minha vida, que em muitos momentos
acreditaram mais em mim do que eu mesma, que
sustentaram comigo cada minuto de dificuldade e alegria,
dedico este trabalho e todo o meu amor!*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre junto de mim, iluminando meu caminho, fazendo com que eu tomasse as decisões certas e não desistisse diante dos desafios e insucessos.

À minha orientadora professora Vera Morsch, pela oportunidade, pela paciência, dedicação e orientação deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e por ser assim tão especial.

A minha co-orientadora, Prof.^a Maria Rosa Schetinger, pela disponibilidade de me ensinar e pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos meus queridos pais, Irineu e Jacinta pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos. A força e incentivo de vocês foram fundamentais para que eu conseguisse vencer mais esta etapa.

Ao meu noivo, Eduardo, pela compreensão e incentivo durante todo o tempo de elaboração desta dissertação, por estar sempre ao meu lado me apoiando nas horas mais difíceis, pelo seu amor que me dá forças para continuar sempre em frente com meus objetivos. Te amo muito!

As minhas irmãs queridas Gabriela e Raquel, por estarem sempre torcendo por mim e me incentivando a seguir minhas metas.

Aos meus sogros, Fernando e Venilde, pelo carinho, e incentivo durante todos estes anos.

Em especial, a Cinthia e a Roselia. Não tenho palavras para expressar minha gratidão por vocês. Obrigada por compartilhar comigo todos os desafios deste trabalho, pelo companheirismo, amizade, carinho, ensinamentos e colaboração. Tenho em vocês um exemplo de dedicação e competência.

Ao Gilberto e a Dani, muito obrigada pela orientação e pelos ensinamentos quando comecei a trabalhar na bioquímica. Vocês são exemplos de profissionais e de dedicação.

A minha querida "IC" Naiara. Obrigada não somente pela contribuição no trabalho, mas também pelo carinho e dedicação. Com certeza valeu a pena. Ao Jessié muito obrigado pela amizade e pela ajuda nos experimentos e principalmente pelo bom humor.

A todos os colegas do laboratório 2208, pela amizade, pelo apoio, pela ajuda, por tudo! Margarete, Cintia, Rosilene, Maísa, Lara, Paula, Vanessa, Karen, Jamile e a todos os outros, muito obrigada!

Aos professores Rafael Moresco e Cristina Nogueira por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

A professora Maribel Rubin, muito obrigada pela colaboração e atenção na realização deste trabalho.

A UFSM e ao curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos os amigos e pessoas que de alguma forma me ajudaram, meu sincero agradecimento a todos.

RESUMO

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

EFEITO DO RESVERATROL NOS SISTEMAS COLINÉRGICO E PURINÉRGICO EM ENCÉFALO DE RATOS DIABÉTICOS

AUTORA: ROBERTA SCHMATZ

ORIENTADORA: VERA MARIA MORSCH

CO-ORIENTADORA: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Data e local de Defesa: Santa Maria, 13 de março de 2009.

O diabetes mellitus é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Além das principais complicações no sistema nervoso periférico o diabetes pode também causar uma série de alterações cognitivas, funcionais e estruturais no sistema nervoso central (SNC). A acetilcolinesterase (AChE), NTPDase e 5'-nucleotidase são importantes enzimas envolvidas na neurotransmissão e alterações na sua atividade tem sido encontradas em várias doenças incluindo o diabetes. O resveratrol é um polifenol abundante em uvas e no vinho tinto, e possui muitas atividades biológicas como antioxidante, antiinflamatória e neuroprotetora. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do resveratrol na atividade das enzimas AChE, NTPDase e 5'-nucleotidase em encéfalo de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. Além disso, foi investigado o efeito do diabetes e do resveratrol na memória através do teste de esQUIVA inibitória. Os seguintes grupos foram estudados (n=8-13): Controle/salina; Controle/RV 10mg/kg; Controle/RV 20 mg/kg; Diabético/salina; Diabético/RV 10 mg/kg; Diabético/RV 20 mg/kg. O tratamento foi realizado por 30 dias e após este período os animais foram sacrificados e as amostras coletadas para os ensaios enzimáticos. Os resultados demonstraram que a atividade da AChE em sobrenadante de córtex, estriado, hipocampo, cerebelo, hipotálamo e em sinaptossomas de córtex cerebral está aumentada no grupo diabético/salina comparado para o grupo controle/salina. O tratamento com resveratrol foi capaz de prevenir o aumento da atividade da AChE nos grupos diabético/RV 10 e diabético/RV 20. Quando o resveratrol foi administrado *per se* um decréscimo na atividade da AChE no córtex estriado e hipocampo nos grupos controle/RV 10; controle/RV 20 foi observado comparado com o grupo controle /salina. Na tarefa de esQUIVA inibitória um decréscimo no tempo de latência foi observado no grupo diabético/salina e o tratamento com resveratrol preveniu este decréscimo nos grupos diabético/RV 10 e diabético/RV 20. Em relação a NTPDase e 5'-nucleotidase um aumento na atividade foi observado no grupo diabético/salina comparado para o grupo controle/salina. O tratamento com resveratrol potencializou o aumento na atividade destas enzimas nos grupos diabético/RV 10 e diabético/RV 20. Quando administrado *per se*, o resveratrol também provocou um aumento na atividade da NTPDase e da 5'-nucleotidase. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a atividade da AChE, NTPDase e 5'-nucleotidase está alterada em ratos diabéticos e o tratamento com resveratrol foi capaz de modular a atividade destas enzimas indicando que este composto pode ser promissor no tratamento de desordens na neurotransmissão colinérgica e purinérgica causadas no estado diabético.

Palavras chaves: diabetes; resveratrol; acetilcolinesterase; NTPDase; 5'-nucleotidase; encéfalo;

ABSTRACT

Master Dissertation

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

EFFECT OF RESVERATROL ON THE CHOLINERGIC AND PURINERGIC SYSTEM IN BRAIN OF DIABETIC RATS

AUTHOR: ROBERTA SCHMATZ

ADVISOR: VERA MARIA MORSCH

CO-ADVISOR: MARIA ROSA CHITOLINA SCHETINGER

Date and place of the defense: Santa Maria, March, 13th, 2009.

Diabetes mellitus is a major public health problem throughout the world. Besides the most common complications in the peripheral nervous system, diabetes may also cause a series of cognitive, structural and functional alterations in the central nervous system (CNS). Acetylcholinesterase (AChE), NTPDase and 5'-nucleotidase are important enzymes involved in neurotransmission and alterations in their activities have been observed in various diseases including diabetes. Resveratrol is a polyphenol abundant in grapes and red wine that possesses many biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective. In this context, the objective of the present study was to investigate the effect of resveratrol on the activity of the enzymes AChE, NTPDase and 5'-nucleotidase in the brain from streptozotocin (STZ) -induced diabetic rats. Furthermore, the effects of diabetes and resveratrol on memory were investigated through the inhibitory avoidance test. The following groups were studied: Control/saline; Control/RV 10 mg/kg; Control/RV 20 mg/kg; Diabetic/saline; Diabetic/RV 10 mg/kg; Diabetic/RV 20 mg/kg. The animals were treated during 30 days after which time they were sacrificed and samples were collected for enzymatic assays. The results demonstrated that AChE activity in the supernatant of cortex, striatum, hippocampus, cerebellum, hypothalamus and cerebral cortex synaptosomes were increased in the diabetic/saline group compared to the control/saline group. Treatment with resveratrol prevented the increase of AChE activity in the diabetic/RV 10 and diabetic/RV 20 groups. When resveratrol was administered *per se*, a decrease in AChE activities was observed in the cortex, striatum and hippocampus in the control/RV 10mg/kg and control/RV 20 groups. In the inhibitory avoidance test, a decrease in step down latency was observed in the diabetic/saline group and the treatment with resveratrol prevented this increase in the diabetic /RV 10 and diabetic/RV 20 groups. In relation to NTPDase and 5'-nucleotidase, an increase in the activities was observed in the diabetic/saline group. Treatment with resveratrol produced a more pronounced increase in the activities of these enzymes in the diabetic /RV 10 and diabetic/RV 20 groups. When administered *per se*, resveratrol also triggered an increase in NTPDase and 5'-nucleotidase. The results obtained in the present study demonstrate that AChE, NTPDase and 5'-nucleotidase activities are altered in diabetic rats and treatment with resveratrol was able to modulate the activity of these enzymes, indicating that this compound may be promising in the treatment of disorders in the cholinergic and purinergic neurotransmission in the diabetic state.

Key words: diabetes; resveratrol; acetylcholinesterase; NTPDase; 5'-nucleotidase; brain;

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina..... | 28 |
| FIGURA 2. Estrutura molecular (G1, G2, G4) e assimétrica (A 12) da AChE | 30 |
| FIGURA 3. A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico (PAS). Adaptado de Soreq & Seidman (2001). B) Interação do substrato com o sítio esterásico da AChE. Adaptado de Patric (2001). | 31 |
| FIGURA 4. Aparato de esquia inibitória..... | 33 |
| FIGURA 5. Membros da Família das NTPDases. Adaptado de Robson et al. (2006) | 36 |
| FIGURA 6. Estrutura das enzimas da família NTPDase. Adaptado de Zimmermann (2001)..... | 36 |
| FIGURA 7. Estrutura da 5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI. Adaptado de Zimmermann (2001). | 37 |
| FIGURA 8. A) Síntese do resveratrol. B) Isômeros cis- e trans-resveratrol. Adaptado de King et al., 2006 | 41 |

ARTIGO

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Rats were made diabetic by streptozotocin. Control and diabetic rats were treated with resveratrol once daily i.p. for 30 consecutive days. After one treatment-free day animals were tested in a step-down latency test. Data are median ± interquartile of training and test. * P<0.05 compared with the others groups at testing by the Dunn's nonparametric multiple comparisons task. n= 6–13. | 48 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| FIGURA 2. AChE activity in cerebral cortex (A), hippocampus (B) and striatum (C) of streptozotocin-induced diabetic rats and those treated with resveratrol. Bars represent means \pm S.E.M. (* $P < 0.05$; * $P < 0.01$ n=6-8). ANOVA-Duncan's Test. | 49 |
| FIGURA 3. AChE activity in cerebellum (A) and hypothalamus (B) of streptozotocin-induced diabetic rats and those treated with resveratrol. Bars represent means \pm S.E.M. (* $P < 0.05$; * $P < 0.01$ n=6-8). ANOVA-Duncan's Test..... | 49 |
| FIGURA 4. AChE activity in whole blood of -induced diabetic rats and those treated with resveratrol. Bars represent means \pm S.E.M. (* $P < 0.05$; * $P < 0.01$ n=6-8). ANOVA-Duncan's Test. | 49 |
| FIGURA 5. Correlation between AChE activities obtained in cerebral cortex and whole blood ($r = 0.94198$, $P < 0.05$). Pearson's correlation..... | 50 |

MANUSCRITO

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. NTPDase activity in cerebral cortex synaptosomes from STZ-induced diabetic rats treated with resveratrol using ATP (1A) and ADP (1B) as substrate (nmol Pi/ min/mg of protein). Bars represent means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$; n=8). | 79 |
| FIGURA 2. 5'-nucleotidase activity in cortex cerebral synaptosomes from STZ-induced diabetic rats treated with resveratrol using AMP as substrate (nmol Pi/ min/mg of protein). Bars represent means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$, n=8). | 80 |
| FIGURA 3. AChE activity in cerebral cortex synaptosomes from STZ-induced diabetic rats treated with resveratrol (μ mol AcSCh/h/mg protein). Bars represent means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$; n=6-8)..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABLE 1- The effect of different doses of resveratrol (RV) on body weight and fasting blood glucose levels in control and diabetic rats at the onset and the end of the experiment (30 days after resveratrol treatment). 48

MANUSCRITO

TABLE 1- Body weight and blood glucose levels of STZ-induced diabetic rats and those treated with resveratrol at the end of the experiment..... 78

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

BuChE - Butirilcolinesterase

ChAT - Colina- acetiltransferase

CHT - Transportador de colina

DM - Diabetes mellitus

Eros - Espécies reativas de oxigênio

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

RV - Resveratrol

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

STZ - Streptozotocina

VACHT - Transportador de acetilcolina vesicular

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE TABELAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIações | 13 |
| APRESENTAÇÃO | 16 |
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 OBJETIVOS | 20 |
| 1.1.1 Objetivo geral | 20 |
| 1.1.2 Objetivos específicos | 20 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 21 |
| 2.1 DIABETES MELLITUS | 21 |
| 2.1.1 Histórico | 21 |
| 2.1.2 Fisiopatologia | 21 |
| 2.1.3 Classificação e etiologia | 22 |
| 2.1.5 Epidemiologia | 24 |
| 2.1.6 Diabetes mellitus experimental | 25 |
| 2.1.7 Diabetes Mellitus e Sistema Nervoso Central | 26 |
| 2. 2 SISTEMA COLINÉRGICO | 27 |
| 2.2.1 Colinesterases | 28 |
| 2.2.2 Acetilcolinesterase | 29 |
| 2.2.2.1 Estrutura da acetilcolinesterase | 30 |
| 2.2.2.2 Mecanismo de ação da acetilcolinesterase | 30 |
| 2.3 TESTES DE APRENDIZADO E MEMÓRIA | 32 |
| 2.4 COEXISTÊNCIA E CO-LIBERAÇÃO DO ATP E ACh | 33 |

| | |
|--|----|
| 2.5 SISTEMAS PURINÉRGICO | 34 |
| 2.5.1 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina | 35 |
| 2.5.1.1 NTPDase | 35 |
| 2.5.1.2 Ecto- 5'- Nucleotidase | 37 |
| 2. 6 RESVERATROL | 39 |
| 2.6.1 Propriedades biológicas do resveratrol | 41 |
| 3. MANUSCRITOS | 44 |
| 3.1 Artigo | 45 |
| Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats..... | 45 |
| 3.2 Manuscrito | 53 |
| Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol | 53 |
| 4. DISCUSSÃO | 82 |
| 5. CONCLUSÕES | 87 |
| 6. REFERÊNCIAS | 88 |

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram no item Manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos contidos neste trabalho.

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura, Discussão e Conclusões desta dissertação.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Artigo - European Journal of Pharmacology

Manuscrito – Neuroscience Letters

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é considerado uma das doenças mais importantes que afetam a humanidade, situando-se entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais e, apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas conseqüências letais (NORTHAM et al., 2006; KING et al., 2008).

O DM é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, decorrente da diminuição da secreção de insulina e/ou da perda da capacidade deste hormônio exercer adequadamente seus efeitos. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a um lento e progressivo, dano a vários órgãos e tecidos especialmente: olhos, rins, coração, vasos sangüíneos, nervos periféricos e cérebro (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

Além das mais comuns complicações no sistema nervoso periférico (SNP), estudos demonstram que o DM também causa uma série de complicações no sistema nervoso central (SNC), condição esta denominada encefalopatia diabética. Os pacientes diabéticos podem apresentar alterações neuroquímicas, neurofisiológicas e distúrbios vasculares que comprometem a integridade funcional e estrutural do SNC (BIESSELS et al., 2002; SIMA et al., 2004). Além dessas alterações, prejuízos nas funções cognitivas afetando principalmente a aprendizagem e memória e o processamento de informações complexas, têm sido relatados, tanto em modelos animais, quanto em pacientes diabéticos (STRACHAN et al., 1997; BRANDS et al., 2007). Em adição, recentes evidências demonstram que o estado diabético pode alterar a plasticidade sináptica modificando o mecanismo de regulação da homeostase celular, com conseqüente disfunção na atividade dos neurotransmissores na fenda sináptica (BIESSELS et al., 2008)

A acetilcolina (ACh) foi a primeira molécula a ser identificada como neurotransmissor e passou a ser amplamente estudada nas sinapses do SNC e SNP (DESCARRIES et al., 1997). A acetilcolinesterase (AChE) é uma serina hidrolase que catalisa a hidrólise da ACh nas sinapses do SNC e na junções neuromusculares, sendo considerada uma importante enzima regulatória e um bom indicador da atividade colinérgica (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Esta enzima desempenha um papel essencial na regulação de muitas funções vitais como

aprendizagem e memória, processamento da informação sensorial, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM, 2002). Além disso, estudos em humanos e em modelos experimentais de diabetes tem encontrado alterações na atividade da AChE, o que pode indicar alterações na neurotransmissão colinérgica e conseqüentemente estar associado com as disfunções cognitivas observadas nesta endocrinopatia (SANCHES-CHAVES & SALCEDA, 2000; CHOPRA & KUKAD, 2007).

Outro importante neurotransmissor no SNC é o ATP que atua como um neuromodulador pré-sináptico e também possui um papel no desenvolvimento e na plasticidade neuronal (RATHBONE et al., 2006). Além disso, seu produto de hidrólise, a adenosina, tem um importante papel modulatório na atividade neuronal e ação neuroprotetora no SNC principalmente em condições patológicas (LATINI & PEDATA, 2001).

A sinalização induzida pelo ATP e adenosina correlaciona-se diretamente à atividade das enzimas NTPDase (ATP difosfohidrolase, apirase, Ecto/CD 39, E.C. 3.6.1.5) e ecto-5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5) (ZIMMERMANN, 1999; 2001). Estas enzimas estão envolvidas no controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos na fenda sináptica e atuam no controle da neuromodulação e da neurotransmissão purinérgica. A enzima NTPDase hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP produzindo AMP, sendo este posteriormente hidrolisado pela ecto-5'-nucleotidase gerando adenosina (ZIGANSHIN et al., 1994; ZIMMERMANN, 1996). Já que estas enzimas contribuem para a manutenção de níveis fisiológicos de ATP e adenosina, um considerável ponto de regulação de várias condições patológicas tem sido proposto para esta cascata enzimática (AGTERESCH et al., 1999). Dados recentes do nosso laboratório tem demonstrado alterações na atividade da NTPDase e da 5'-nucleotidase em pacientes e em ratos diabéticos indicando que a sinalização purinérgica pode estar alterada no estado diabético (LUNKES et al., 2003; 2004; 2008; SCHMATZ et al., 2009).

O composto resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) é um polifenol presente em diversas espécies de plantas utilizadas para consumo humano como, amora e amendoim, e em concentrações particularmente elevadas em uvas e no vinho tinto (FRÉMONT et al., 2000). Nos últimos anos o resveratrol tem se tornado um importante alvo de pesquisa e seus efeitos têm sido investigados em várias patologias incluindo o DM (ATES et al., 2005). Tal interesse deve-se às inúmeras

atividades biológicas deste polifenol, incluindo potente atividade antioxidante, proteção e redução da incidência de doenças coronárias, bem como atividade anticarcinogênica e antiinflamatória (WOLTER et al., 2004; DONELLY et al., 2004). Recentemente, vários estudos têm focado os efeitos neuroprotetores do resveratrol demonstrando que este composto protege contra a injúria da isquemia cerebral (WANG et al., 2007), atenua a toxicidade β -amilóide (HAN et al., 2004), protege contra a excitotoxicidade glutamatérgica (MILOSO et al., 2005) e contra danos oxidativos causados pelo diabetes (ATES et al., 2005). No entanto, os mecanismos através dos quais o resveratrol exerce seu efeito neuroprotetor ainda não estão claros, mas acredita-se que as propriedades antioxidantes deste composto possam contribuir para seus efeitos benéficos no SNC (HAN et al., 2004; CHEN et al., 2005).

Neste contexto, considerando as complicações neurológicas do diabetes mellitus, é de grande interesse clínico e científico verificar o efeito do resveratrol na memória, na atividade da enzima acetilcolinesterase e das ectonucleotidasas em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina, com o intuito de investigar o potencial uso terapêutico deste composto na disfunção cerebral associada ao estado diabético.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito do resveratrol na atividade das enzimas AChE, NTPDase, e ecto-5'-nucleotidase e na memória de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito do resveratrol na atividade da enzima AChE em sinaptossomas de córtex cerebral e em sobrenadante de córtex cerebral, de hipocampo, estriado, cerebelo e hipotálamo de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina.
- Investigar o efeito do resveratrol na atividade da enzima AChE em sangue total de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina.
- Verificar o efeito do resveratrol na tarefa de esquiva inibitória e no campo aberto em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina.
- Avaliar o efeito do resveratrol na atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Histórico

O conhecimento do diabetes mellitus (DM) já data de vários séculos. Ainda no ano 70 (D.C) a denominação “DIABETES” para a doença e seus sintomas mais evidentes como a polidipsia, poliúria e polifagia foram descritos pelo médico Areteu da Capadócia. Entretanto, devido ao pequeno avanço da ciência na época, somente em 1670 foi descoberto que a urina dos pacientes diabéticos apresentava sabor adocicado (DINSMOOR, 1996). Quinze anos após, o médico M. Chevreul confirmou que o açúcar presente na urina de pacientes com DM tratava-se da glicose. A partir daí a doença passou a chamar-se de “Diabetes Açucarada” ou “Diabetes Mellitus”. Em 1869, Paul Langerhans observou que o pâncreas continha um tipo diferenciado de células, agrupadas em ilhotas, cuja função poderia ser endócrina. O papel endócrino destas células foi confirmado no final do século XIX, em experimentos com cães pancreatômizados, pelos pesquisadores Oskar Minkowski e Joseph Von Mering. Entre 1916 e 1920 foi demonstrado que extratos pancreáticos tinham a capacidade de diminuir a glicemia. Um ano após, o cirurgião Frederic G. Banting descobriu e isolou a insulina (MINKOWSKI, 1989). Este achado rendeu ao mesmo o Prêmio Nobel de Medicina e acima de tudo promoveu uma melhor qualidade de vida aos pacientes com DM.

2.1.2 Fisiopatologia

O DM é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla, decorrente de defeitos na produção de insulina e/ou da incapacidade deste hormônio exercer adequadamente seus efeitos. Esta síndrome caracteriza-se por hiperglicemia

crônica acompanhada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

Como consequência destes distúrbios a maioria dos pacientes com DM manifesta a curto-prazo um quadro de glicosúria, polifagia, polidipsia, poliúria e perda de peso. Estes sintomas freqüentes na população diabética são conhecidos como clássicos na história da doença. No entanto, a ausência dos mesmos é comum em muitos pacientes e não descarta a possibilidade de que exista um grau de hiperglicemia suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas antes que o diagnóstico seja estabelecido (ATKINSON & EISENBARTH, 2001).

As consequências do DM em longo prazo acontecem devido a alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas compreendem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com possibilidade de cegueira, neuropatia periférica, com risco de úlceras nos pés e amputações. Além disso, pacientes diabéticos apresentam elevado risco de doença vascular aterosclerótica, como as doenças coronariana, arterial periférica e vascular cerebral, sendo estas consideradas a principal causa da redução da sobrevida e da mortalidade dos pacientes diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

2.1.3 Classificação e etiologia

De acordo com o Comitê Executivo para Diagnóstico e Classificação do DM da “American Diabetes Association” (2006) a classificação atual do DM toma como referência a etiologia dos distúrbios glicêmicos. A grande maioria dos pacientes diabéticos pertence a uma das duas classes etiopatogênicas: diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo2) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O DM tipo 1 que antigamente fora denominado de diabetes mellitus insulino dependente (IDDM) ou diabetes juvenil compreende aproximadamente 10 % de todos os casos de diabetes. Manifesta-se geralmente em crianças, adolescentes e adultos jovens e caracteriza-se pela ausência da secreção de insulina devido a uma severa ou total destruição das células β pancreáticas (CNOP et al., 2005). Fatores

genéticos, ambientais e imunológicos são considerados os principais responsáveis pela gênese do processo de destruição das células β do pâncreas e conseqüentemente pela manifestação da doença. Estudos epidemiológicos sugerem que infecções virais também podem desencadear o processo auto-imune característico do DM tipo 1 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007; CNOP et al., 2005).

O DM tipo 2 que antigamente fora denominado de DM não-insulino-dependente (NIDDM) ou diabetes senil é considerado a forma mais comum da doença a qual afeta aproximadamente 90% da população diabética. Manifesta-se geralmente em pacientes com idade superior a 40 anos e tem elevado componente hereditário. Além disso, fatores genéticos, ambientais e quadros de obesidade contribuem de forma significativa para o surgimento do DM tipo 2. Esta forma de diabetes geralmente resulta de graus variáveis de resistência tecidual à insulina e/ou de uma deficiência relativa na secreção do hormônio pelas células β pancreáticas. Como conseqüência os pacientes desenvolvem complicações no sistema micro e macrovascular (VÉRICEL, 2004).

Outro tipo de diabetes encontrado com maior freqüência é o diabetes gestacional, caracterizado por uma diminuição da tolerância a glicose, diagnosticado durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (GANNON, 2001). Também existem outros tipos específicos de diabetes, menos freqüentes, que podem surgir de forma secundária a algum fator que cause destruição das ilhotas pancreáticas como defeitos genéticos da função das células β e na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções e efeito colateral de medicamentos e produtos químicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico do DM, modificado inicialmente pela ADA em 1997 e revisto anualmente pela mesma associação baseia-se fundamentalmente nas alterações da glicose plasmática de jejum de 8 a 10 horas e teste oral de tolerância à glicose

(TOTG), 2 horas após sobrecarga de 75 g de glicose (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

Pacientes com glicemia de jejum inferior a 100 mg/dL e TOTG inferior a 140mg/dL, são considerados com glicemia normal. Porém pacientes com glicemia de jejum entre 100 e 126 mg/dL e TOTG entre 140 e 199 mg/dL, são caracterizados com tolerância diminuída à glicose. É considerado diabético todo o indivíduo que apresenta glicemia de jejum superior a 126 mg/dL e TOTG superior a 200 mg/DI (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

2.1.5 Epidemiologia

O DM tem sido considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e um problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento. A crescente incidência e prevalência são atribuídas ao envelhecimento populacional e ao estilo de vida atual, caracterizado por inatividade física e a hábitos alimentares que predisõem ao acúmulo de gordura corporal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, o número de portadores da doença em todo o mundo é de cerca de 177 milhões, com expectativa de alcançar 366 milhões de pessoas em 2030 (WILD et al., 2004). No Brasil existem aproximadamente 11 milhões de diabéticos correspondendo a cerca de 7,6 % da população adulta entre 30 e 69 anos e 0,3 % das gestantes, sendo que aproximadamente 50 % destes pacientes desconhecem o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) .

As conseqüências humanas, sociais e econômicas são devastadoras: são 4 milhões de mortes por ano relativas ao diabetes e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial. No Brasil, o DM aparece como a sexta causa mais freqüente de internação hospitalar e representa cerca de 40 % dos pacientes que internam em Unidades Coronarianas Intensivas e 46 % dos pacientes que ingressam em tratamento de diálise. Esta síndrome além de contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral e de hipertensão

arterial, também constitui a principal causa de amputações de membros inferiores e de cegueira adquirida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.1. 6 Diabetes mellitus experimental

Agentes diabetogênicos como a estreptozotocina (STZ) e o aloxano, tem sido muito utilizados em estudos experimentais, por reproduzirem nos animais o quadro de alterações metabólicas e sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem na enfermidade naturalmente adquirida (MENDES & RAMOS, 1994). Tais drogas caracterizam-se por seu efeito tóxico seletivo às células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas (MORDES & ROSSINI, 1981).

A STZ (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureído)-D-glicopirranose) é um antibiótico de amplo espectro de ação, produzida a partir de microorganismos *streptomyces achromogenes* (HERR, 1960). Quando utilizada em animais, determina uma severa deficiência de insulina, verificando-se uma instalação imediata do quadro de hiperglicemia. Experiências demonstram que doses de STZ na faixa de 50 a 100mg/kg de peso corporal causam necrose das células β com desenvolvimento do DM tipo I, um ou dois dias após a aplicação da droga (HOUNSOM, 1998). Este achado foi confirmado em estudo experimental realizado por MELO (2001), que utilizou a STZ na indução do DM e demonstrou que 24 horas após a aplicação da droga, o conteúdo de insulina das células β foi reduzido em 95 % ou mais. SCHNEDL et al., (1994) demonstraram que a toxicidade dirigida para as células β é devida à similaridade da molécula da STZ com a glicose, o que permite que a mesma seja internalizada via transportadores GLUT-2. De fato, a estrutura química da STZ compreende uma molécula de glicose com uma cadeia lateral altamente reativa, nitrosurea, que inicia a ação citotóxica deste composto (ISLAS-ANDRADE et al., 2000).

O mecanismo de ação da STZ está relacionado à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (JORNS et al., 1999). Após sua administração ocorre a destruição das membranas celulares e indução de quebra no DNA pelas EROs, levando à ativação da enzima poli (ADP-ribose) sintase e à depleção da

nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Esta enzima está localizada no núcleo das células beta do pâncreas e necessita de NAD para realizar o reparo do DNA nuclear. Um aumento na sua atividade pode levar à depleção do NAD intracelular, sendo impossível produzir insulina nas células β do pâncreas (TAKAMA et al., 1995).

Os ratos diabéticos induzidos com STZ similarmente à pacientes diabéticos desenvolvem danos nos olhos, rins, coração, vasos sanguíneos e no sistema nervoso, constituindo dessa forma um importante modelo para o estudo de complicações agudas e crônicas do DM (BIESSELS, 2005).

2.1.7 Diabetes Mellitus e Sistema Nervoso Central

Além das complicações mais comuns no sistema nervoso periférico como a neuropatia diabética, recentes evidências têm demonstrado que o DM causa uma série de danos no SNC. Os pacientes diabéticos podem apresentar alterações cognitivas, estruturais e fisiológicas cerebrais, condição esta denominada encefalopatia diabética (BIESSELS et al., 2002a; SIMA et al., 2004).

A patogênese das disfunções cerebrais no DM ainda não está completamente elucidada, mas parece ser um processo multifatorial, que envolve distúrbios metabólicos e vasculares, incluindo alterações na homeostase do cálcio celular (CAMERON et al., 2001; BIESSELS, 2002b) e redução do fluxo sanguíneo cerebral (MANSCHOT et al., 2003). Em adição, a exposição a dois extremos no nível de glicose sanguínea, hipoglicemia severa e por outro lado hiperglicemia crônica possui efeitos adversos na integridade estrutural e funcional do SNC. Em pacientes diabéticos estas situações extremas são geralmente acompanhadas de perda de consciência, convulsão e coma (WILSON et al., 1998). Dessa forma, o controle glicêmico inadequado bem como a administração de doses elevadas de hipoglicemiantes pode produzir dano permanente à função cerebral (CRYER et al., 1994).

Por outro lado, a toxicidade direta da glicose nos neurônios ocorre especialmente devido a um aumento da auto-oxidação intracelular da glicose (NISHIKAWA et al., 2000) levando a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (EVANS et al., 2002). O excesso de EROs contribui para o

aumento da morte neuronal através da oxidação de proteínas, danos ao DNA, e peroxidação lipídica da membrana. Em longo prazo estes danos oxidativos nas várias regiões cerebrais estão associados com anormalidades morfológicas e com o desenvolvimento de prejuízos na memória no estado diabético (TUZCU & BAYDAS, 2006).

Além de déficits na memória, vários autores têm sugerido que o diabetes está associado com importantes alterações colinérgicas no qual o nível do neurotransmissor ACh e a atividade da AChE estão alteradas em vários tecidos (SANCHES-CHAVEZ & SALCEDA, 2000; GAREEB & HUSSEN, 2008). Foi demonstrado por KHANDKAR et al. (1995) uma diminuição de 40 % no transporte da colina através da barreira hemato-encefálica e um decréscimo na síntese de ACh em regiões específicas do cérebro no estado diabético, com conseqüente redução no transporte axonal da AChE em neurônios colinérgicos. Adicionalmente, estas alterações na neurotransmissão colinérgica podem ser uma das bases para explicar os déficits na aprendizagem e memória observados no diabetes já que a AChE desempenha um importante papel no controle das funções colinérgicas (KUHAD & CHOPRA, 2007; GAREEB & HUSSEN, 2008).

2. 2 Sistema colinérgico

O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias de modulação do sistema nervoso central (SNC) desempenhando um papel fundamental em várias funções vitais, como aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral, o que faz deste sistema, alvo de inúmeras pesquisas (MESULAM et al., 2002).

Neste contexto é relevante destacar os principais componentes que constituem o sistema colinérgico: a acetilcolina (ACh); a colina- acetiltransferase (ChAT); o transportador de colina (CHT); o transportador de acetilcolina vesicular (VACHT); os receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) e os nicotínicos (nAChR) e a acetilcolinesterase (AChE), os quais juntos são responsáveis por

modular a neurotransmissão colinérgica (KAWASHIMA & FUJII, 2003; SARTER & PARIKH, 2005).

A ACh (Figura 1) foi a primeira molécula a ser identificado como um neurotransmissor e passou a ser amplamente estudado nas sinapses do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Sua síntese ocorre na junção neuroefetora e ganglionar a partir do acetil CoA, um produto do metabolismo celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta, pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) (SOREQ & SEIDMAN, 2001; PRADO et al., 2002). Posteriormente, a ACh é transportada até as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular da acetilcolina (VAcHT) onde fica armazenada até a sua liberação (RAND, 2007). Com a chegada do potencial de ação a ACh é liberada na fenda sináptica onde exerce seus efeitos mediados pela ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos (RANG et al., 2004).

A ACh que permanece na fenda sináptica é hidrolisada por uma colinesterase específica produzindo ácido acético e colina. A colina resultante é em parte recaptada para o terminal pré-sináptico, através de um mecanismo de recaptação de alta afinidade (SOREQ & SEIDMAN, 2001) onde poderá ser reutilizada na síntese de nova moléculas de ACh (MESULAM et al., 2002).

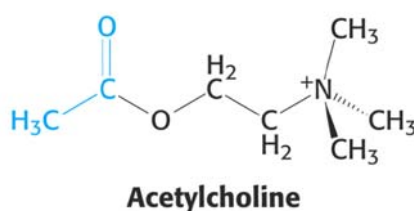


Figura 1 - Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina ([http:// www.facultystaff.vwc.edu/acetylcholine.gif](http://www.facultystaff.vwc.edu/acetylcholine.gif))

2.2.1 Colinesterases

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (KLASSEN et al., 1996). Estas enzimas são classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas e especificidade a

substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ et al., 1993).

Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). A AChE (E.C. 3.1.1.7) também chamada de colinesterase verdadeira ou específica hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a ACh) e a BuChE (E.C.3.1.8) ou pseudocolinesterase hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. A AChE é predominantemente encontrada em cérebro (10 vezes mais abundante que a BuChE), junção neuromuscular e eritrócitos (COCUGRAS, 2003). Já a BuChE, é principalmente encontrada em plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita que a AChE (MESULAM et al., 2002).

2.2.2 Acetilcolinesterase

A AChE é uma importante enzima regulatória que controla a transmissão do impulso nervoso através da sinapse colinérgica pela rápida hidrólise e inativação da ACh modulando a concentração deste neurotransmissor nas sinapses (GRISARU et al., 1999; SOREQ & SEIDMAN, 2001). É uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular.

Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica a AChE tem sido implicada em várias ações não colinérgicas como crescimento dos neuritos (DAY & GREENFIEL, 2002), regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, osteogênese (CHACÓN et al., 2003) e também tem sido proposto a atividade hematopoiética pela presença desta enzima em células progenitoras do sangue (SOREQ & SEIDMAN, 2001). A AChE também foi localizada e identificada em linfócitos onde provavelmente apresenta um papel importante na regulação das funções imunes (KAWASHIMA & FUJII, 2000). Assim uma inibição ou ativação desta enzima pode ter conseqüências devastadoras no cérebro e outros órgãos (MESULAN et al., 2002).

2.2.2.1 Estrutura da acetilcolinesterase

A AChE existe nas formas globular e assimétrica. A forma globular é composta por monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) da subunidade catalítica. A forma G1 é citosólica e a G4 é ligada à membrana, sendo esta última a mais encontrada em tecido nervoso (DAS et al., 2001; ALDUNATE et al., 2004) (Figura 4). Em sangue humano, a AChE é encontrada tanto em eritrócitos quanto no plasma, onde predominam as formas G2 e G4, respectivamente (SKAU, 1985).

Já a forma assimétrica consiste de um (A4), dois (A8) e três (A12), tetrâmeros catalíticos ligados covalentemente a uma subunidade estrutural colagênica chamada Q (ColQ). Essas formas estão associadas com a lâmina basal e são abundantes na junção neuromuscular (ALDUNATE et al., 2004) (Figura 2).

No SNC a secreção de AChE têm sido encontrada no hipotálamo, substância nigra, estriado, hipocampo, cerebelo e também no fluido cérebro espinal (PAXINOS, 1985). Esta enzima é secretada de ambos os terminais axonais dos neurônios, sendo esta taxa de secreção modulada pela estimulação neuronal, pelo nível de neurotransmissor na fenda sináptica, bem como, pelo tratamento com drogas (DESCARRIES, 1997).

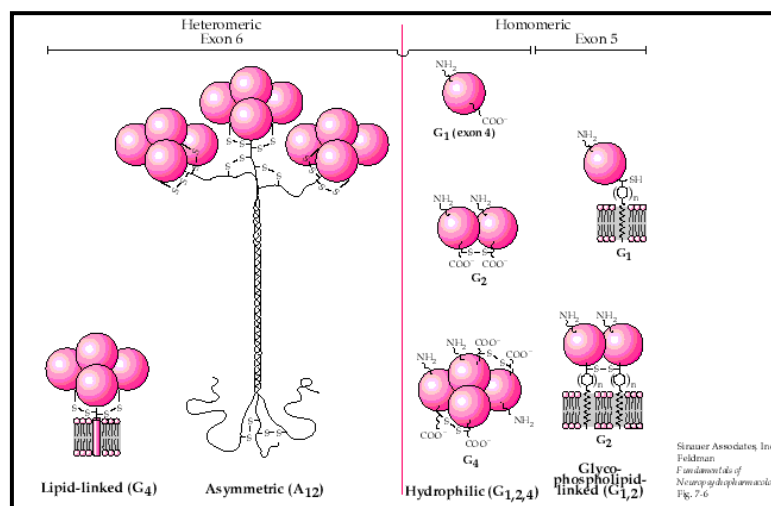


Figura 2 - Estrutura molecular (G1, G2, G4) e assimétrica (A 12) da AChE ([http //: WWW.chemistry.emory.edu/.../ach_inactivation.htm](http://WWW.chemistry.emory.edu/.../ach_inactivation.htm))

2.2.2.2 Mecanismo de ação da acetilcolinesterase

As propriedades bioquímicas e a importância fisiológica da AChE fizeram desta enzima um alvo interessante para a análise detalhada da sua função estrutural. A seqüência de aminoácidos da AChE foi codificada pela primeira vez no modelo de estrutura cristalina da AChE dimérica de Torpedo Califórnia, a qual vem sendo historicamente uma das principais fontes da enzima colinérgica para a pesquisa. Mais tarde, a estrutura da AChE de ratos, *Drosophila* e do homem foram obtidas e mostraram ser similares (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que seu sítio ativo é formado por resíduos da chamada tríade catalítica: serina 203, histidina 447 e glutamato 334. A visão tradicional do sítio ativo da AChE foi considerada como tendo dois subsítios: um sítio carregado negativamente ou aniônico, ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos, o qual aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (Figura 3A) (TAYLOR & BROWN, 1999). Um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site-PAS), foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. Tem sido proposto que este sítio possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou ainda na inibição por excesso de substrato (NUNES-TAVARES et al., 2002).

A AChE é classificada como uma serina hidrolase e seu mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de cargas que envolvem o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e hidroxila da serina (SUSSMAN et al., 1991).

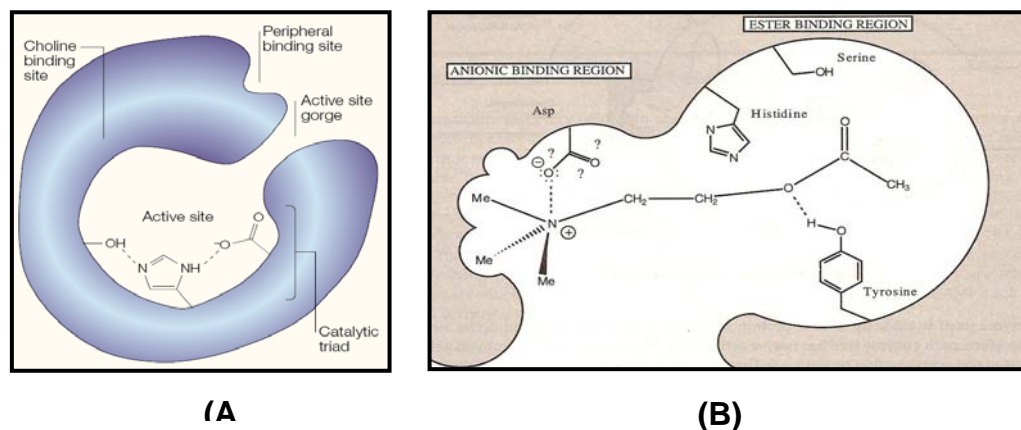


Figura 3 - A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico (PAS). Adaptado de Soreq & Seidman (2001). B) Interação do substrato com o sítio esterásico da AChE. Adaptado de Patric (2001).

A primeira etapa da ligação enzima-substrato se dá pelo ataque nucleofílico da hidroxila da serina do local esterásico sobre o grupamento éster carbonila do substrato, promovendo a quebra da ligação éster (Figura 3B). Durante o ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster que se rompe e forma um conjugado acetil-enzima, com a liberação concomitante da colina. O complexo acetil-enzima é passível de hidrólise e esta resulta na liberação de acetato e na regeneração da enzima ativa (TACHIKAWA et al., 2005). O processo enzimático é extraordinariamente eficiente por causa da proximidade do nucleófilo serina e a catálise ácido/básica da histidina, sendo que uma molécula da ACh é hidrolisada em 100 microsegundos (PATRICK, 2001).

2.3 Testes de aprendizado e memória

Para estudar os mecanismos envolvidos na aprendizagem e memória diversas tarefas experimentais têm sido propostas, entre elas, a esQUIVA INIBITÓRIA e o campo aberto (CAHILL et al., 1986; NETTO et al., 1993).

A tarefa da esQUIVA INIBITÓRIA (Figura 4) envolve a formação de uma memória declarativa onde o animal aprende que ao descer de uma plataforma ele recebe um choque. Numa exposição subsequente, o animal ficará mais tempo em cima da plataforma em vez de descer. Ou seja, o animal inibe uma resposta (descer de uma plataforma) para não receber um estímulo aversivo (um choque elétrico) (IZQUIERDO et al., 2006). Esta tarefa é adquirida muito rapidamente em um único treino e envolve a repressão específica da tendência natural dos ratos para explorar além da plataforma. Esta memória corresponde àquela em que nós evitamos colocar os dedos na tomada ou evitamos entrar numa rua perigosa (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; IZQUIERDO, 1998; IZQUIERDO et al, 2006). Estudos demonstram que este tipo de memória declarativa envolve estruturas encefálicas como hipocampo, septo medial e córtex cerebral, cada estrutura estaria envolvida em tempos diferentes no processo de consolidação da memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1995). Além disso, a tarefa da esQUIVA INIBITÓRIA é uma importante ferramenta para analisar, distintamente a ação das drogas e patologias na memória (IZQUIERDO et al., 2002).

Para avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais usou-se o teste de campo aberto. Esta tarefa é realizada em uma caixa de madeira, contendo parede frontal em vidro, cujo piso está dividido em vários quadrados (NETTO et al., 1993). Os animais são colocados na caixa e são observados por um tempo determinado. Para análise do teste, é obtido o número de cruzamentos entre os quadrados (crossing) e o número de elevações corporais (os animais mantêm-se sustentados pelas patas traseiras - rearings) que são usados para medida da atividade locomotora e comportamento exploratório, respectivamente. Também pode ser avaliada a latência para deixar o primeiro quadrado e o número de bolos fecais que fornecem uma medida de timidez e ansiedade dos animais (NETTO et al., 1993; SINGER et al., 2005; REOLON et al., 2006).

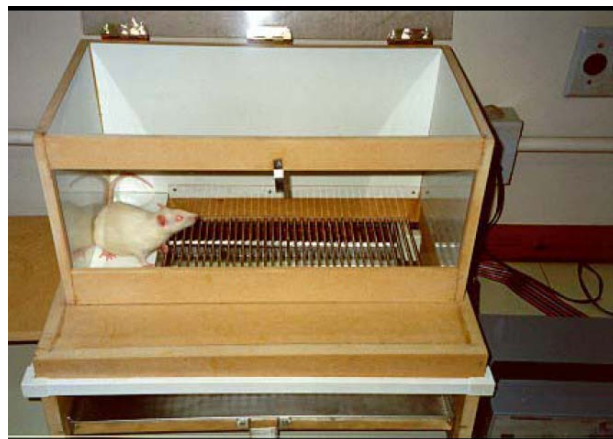


Figura 4 - Aparato de esquiwa inibitória

2.4 Coexistência e co-liberação do ATP e ACh

O ATP é co-estocado e co-liberado juntamente com o neurotransmissor ACh (na taxa de aproximadamente 1:5) na sinapse neuromuscular e, uma vez na fenda sináptica ele é degradado até adenosina pela ação das ectonucleotidases (LING et al., 2005). Assim, o ATP modula a liberação de ACh através de seu metabólito adenosina e também pela presença de seus receptores P2X e P2Y na sinapse neuromuscular (DE LORENZO et al., 2006). Apesar de existir pouca informação sobre a interação da sinalização purinérgica e colinérgica no SNC, foi demonstrado

por DÍAZ-HERNÁNDEZ et al. (2002) que receptores de nucleotídeos ionotrópicos estão presentes nos terminais colinérgicos, sendo capazes de induzir a liberação de ACh sinaptoossomal. Esses dados sugerem que receptores nucleotídicos podem co-existir com receptores nicotínicos no mesmo terminal, demonstrando a complexidade do funcionamento dos terminais colinérgicos e purinérgicos no SNC.

2.5 Sistemas purinérgico

Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP e ADP, e o nucleosídeo adenosina são considerados, atualmente, importantes moléculas sinalizadoras, mediando seus efeitos através de receptores purinérgicos localizados na superfície celular (ILLES & RIBEIRO, 2004). As concentrações destas moléculas nos fluídos extracelulares dependem de vários fatores como a quantidade liberada, os mecanismos de recaptção, situações de lise celular e a presença de enzimas como as ectonucleotidases (RATHBONE et al., 1999).

O papel dos nucleotídeos de adenina e do nucleosídeo adenosina na neurotransmissão e neuromodulação do SNC tem sido bem estabelecido (CUNHA & RIBEIRO, 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001). O ATP é um importante neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas e também age como um neuromodulador. Este nucleotídeo pode ser armazenado e liberado no meio extracelular juntamente com outros neurotransmissores, tais como acetilcolina, glutamato e noradrenalina através das vesículas pré-sinápticas dependentes de cálcio (GIBB & HALLIDAY, 1996; SPERLÁG & VIZI, 1996; ZIMMERMANN, 1996; ILLES & RIBEIRO, 2004).

A adenosina tem um papel relevante na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores, agindo tanto pré quanto pós-sinápticamente (CUNHA, 2001; DUNWIDDIE & MASINO, 2001; RIBEIRO, et al., 2003). A regulação da liberação de neurotransmissores excitatórios por esta molécula tem se tornado importante em muitos processos patológicos, pois a adenosina pode limitar o dano causado pela excitotoxicidade destes neurotransmissores, exercendo assim uma ação protetora no SNC (ZIMMERMANN et al., 1998; DUNWIDDIE & MASINO, 2001;

PURVES et al., 2005). Apesar de seus efeitos modulatórios, a adenosina não é considerada um neurotransmissor, pois não há indícios de que é armazenada em vesículas sinápticas (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997).

Além das propriedades neurotransmissoras e neuromoduladoras, estudos colocaram em evidência muitas outras ações dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina no sistema nervoso. Atualmente são reconhecidos por estarem envolvidos também na formação e regulação da sinaptogênese, plasticidade neuronal, proliferação de células gliais, e na diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) (RATHBONE et al., 1999; FIELS & STEVENS, 2000, CICARELLI et al., 2001; STEVENS et al., 2002; WINK et al., 2003, AGRETI et al., 2005).

2.5.1 Enzimas que degradam nucleotídeos de adenina

Os nucleotídeos de adenina extracelulares são hidrolisados por enzimas conhecidas como ecto-nucleotidases. Dentre estas destacam-se a NTPDase (apirase, CD39, ATP difosfohidrolase) e a ecto-5'-nucleotidase, duas enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP, ADP e AMP à seus receptores (ZIMMERMANN, 2001).

2.5.1.1 NTPDase

E-NTPDases (Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) é o termo genérico para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001). Oito membros desta família já foram identificados (Figura 5) e diferem quanto à especificidade ao substrato, distribuição tecidual e localização celular (SHI et al., 2001; ZIMMERMANN, 2001; BIOGENESE et al., 2004). Quatro das NTPDases são enzimas tipicamente localizadas na membrana celular com um sítio catalítico na face extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8) e quatro delas exibem localização intracelular (NTPDases 4, 5, 6 e 7) (ROBSON et al., 2006).

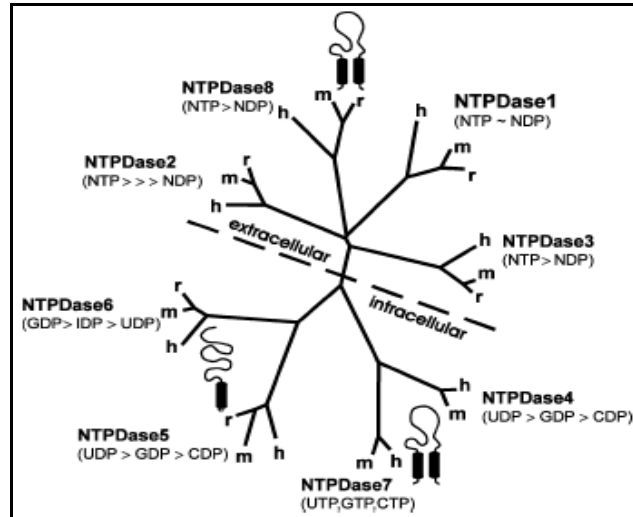


Figura 5 – Membros da Família das NTPDases. Adaptado de Robson et al. (2006)

Estas enzimas apresentam um alto grau de similaridade na sua seqüência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões que são conhecidas como “regiões conservadas da apirase” (ACRs), as quais são de extrema importância para a atividade catalítica (ZIMMERMANN, 1999).

A NTPDase 1 (ecto/CD 39) foi a primeira enzima da família E-NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 6) (ZIMMERMANN, 2001). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (ZIGANSHIN et al., 1994).

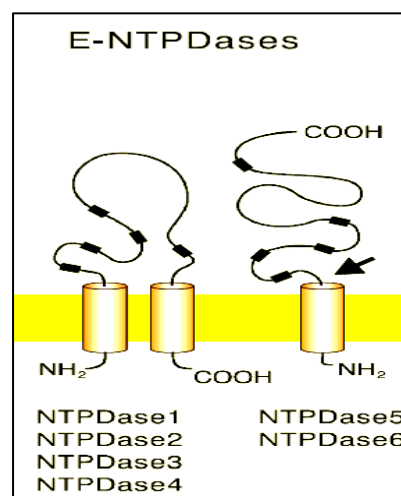


Figura 6 - Estrutura das enzimas da família NTPDase. Adaptado de Zimmermann (2001).

Tem sido identificado que a NTPDase-1 é expressa em sinaptossomas isolados, bem como em cultura de neurônios primários de córtex cerebral e astrócitos (BATTASTINI et al., 1991; WANG et al., 1997). Estudos imunistoquímicos têm demonstrado que essa enzima é amplamente distribuída no cérebro de ratos, encontrando-se presente em neurônios de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, células gliais e células endoteliais (WANG & GUIDOTTI, 1998).

A NTPDase vem sendo amplamente estudada nos últimos anos, tanto em condições patológicas quanto em modelos experimentais (BONAN et al., 2000; LUNKES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005; SCHMATZ et al., 2009). A função geral desta enzima tem sido atribuída à hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP e, portanto, dependendo da localização tecidual a atividade enzimática possui diferentes papéis fisiológicos (SARKIS et al., 1995; ZIMMERMANN, 1999; BONAN et al., 2001).

2.5.1.2 Ecto- 5'- Nucleotidase

A ecto-5'-nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5) é uma enzima ancorada a membrana plasmática via uma molécula de glicofosfatidil inositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figura 7). Entretanto, formas solúveis e clivadas desta enzima também já foram descritas (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER et al., 2005).

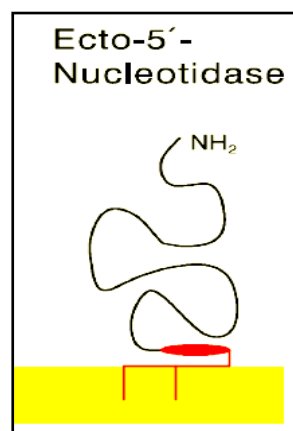


Figura 7 - Estrutura da ecto-5'-nucleotidase ancorada a membrana plasmática via uma molécula de GPI. Adaptado de Zimmermann (2001).

Esta enzima catalisa a desfosforilação de vários nucleotídeos ecto-5'-monofosfatados como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP à seus respectivos nucleosídeos (ZIMMERMANN, 1996). No entanto, foi demonstrado que a ecto-5'-nucleotidase hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN et al., 1998; ZIMMERMANN, 2001).

As funções da ecto-5'-nucleotidase correlacionam-se diretamente ao seu papel na produção de adenosina. Assim, de acordo com a sua localização tecidual, ela desempenha importantes funções como, por exemplo, o controle da agregação plaquetária, a regulação do tônus vascular e atua também na neuromodulação e neuroproteção do sistema nervoso (ZIMMERMANN et al., 1998; KAWASHIMA et al., 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

No SNC, a ecto-5'-nucleotidase está predominantemente associada à glia, mas várias evidências têm demonstrado que essa atividade também está associada a neurônios (ZIMMERMANN et al, 1998; ZIMMERMANN, 1996, 2001). A ecto-5' -nucleotidase é transitoriamente expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses durante o desenvolvimento sináptico (SCHOEN & KREUTZBERG, 1994; BRAUN et al, 1995). Foi demonstrado que, em várias regiões cerebrais, a atividade desta enzima se mostra crescente à medida que o animal envelhece (FUCHS, 1991). A atividade da ecto-5'-nucleotidase encontra-se aumentada em astrócitos, células microgliais (BRAUN et al, 1995) e em sinaptossomas de hipocampo após isquemia focal e reperfusão (SCHETINGER et al, 1998). Além disso, estudos têm demonstrado que a 5'-nucleotidase tem características de uma molécula de adesão (AÍRAS et al, 1995).

Diversos estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa têm evidenciado a importância das ectonucleotidasas no processo de neurotransmissão em diferentes patologias (LUNKES et al., 2004; BALZ et ; al., 2005; SPANEVELLO et al., 2005). De particular interesse, em ratos diabéticos induzidos com aloxano observou-se um aumento na hidrólise do ATP e do ADP em relação ao grupo saudável, possivelmente funcionando como um mecanismo adaptativo a fim de reduzir os níveis do ATP e aumentar os níveis de adenosina, um importante neuroprotetor (LUNKES et al., 2004).

2. 6 Resveratrol

Os estudos sobre resveratrol iniciaram nos anos 70, sendo primeiramente relatado na antiga União Soviética em 1974, em cascas de *Pinus sibirica* (HILLIS et al., 1974). Em 1976, ANGCAKE E PRYCE encontraram pela primeira vez a presença do isômero trans-resveratrol em videiras (*Vitis vinifera*) e em outros membros da família Vitaceae. Em 1977 esses mesmos autores sintetizaram *in vitro* o ϵ -viniferin, que é o primeiro dímero da família dos estilbenos e dois anos depois identificaram o trans-pterostilbeno (glicosídeo do resveratrol).

Mais tarde, nos anos 80, foram iniciadas algumas pesquisas sobre os efeitos biológicos do resveratrol, e só nos anos 90 os estudos sobre este composto tornaram-se mais freqüentes devido ao “paradoxo francês”, que direcionou o foco das pesquisas para a saúde (SOLEAS et al., 1995, FREMONT, 1999). Este paradoxo deve-se ao fato dos franceses, mesmo ingerindo uma dieta rica em gorduras saturadas, apresentarem uma baixa incidência de doenças cardiovasculares, isto sendo explicado pelo consumo regular de vinho tinto. Tal proteção foi atribuída aos polifenóis, presentes em concentrações elevadas no vinho, e em especial ao resveratrol, um dos seus principais componentes (RENAUD & LORGERIL, 1992; BRADAMANTE, 2004).

O resveratrol (3,5,4'-triidroxiestilbeno) é um polifenol encontrado em cerca de 72 espécies de plantas e também em produtos alimentares tais como amendoim, amora, framboesa e principalmente em uvas e no vinho tinto, onde sua presença é mais conhecida e estudada (SAIKO et al., 2008). Na uva o resveratrol é sintetizado quase que exclusivamente na casca, onde é formado a partir da condensação de três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de p-coumaroil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima resveratrol sintase (KING et al., 2006) (Figura 8A). O resveratrol faz parte de um conjunto de compostos denominados fitoalexinas, produzidos pelos vegetais com a função de protegê-los de estresses causados por fatores bióticos como fungos patogênicos ou por fatores abióticos como a radiação ultravioleta. Assim, os níveis de resveratrol nas uvas variam de acordo com a quantidade de infecção por fungos, exposição ao sol, composição do solo, além do processo de fabricação e conservação dos vinhos (SOLEAS et al., 1997). No vinho tinto, a concentração de resveratrol varia de 0,82 a 5,75 mg/L podendo chegar a 9

mg/L, enquanto o suco de uva comercial contém aproximadamente 0,07 a 1,59 mg/L de resveratrol (SOUTO et al., 2000; DONG, 2003). Estudos indicam que o vinho tinto brasileiro pode ser uma importante fonte de resveratrol, visto que o total deste composto ingerido através do vinho foi estimado para a população brasileira como 0,5 mg/dia, com base em um consumo regular de 160 mL/dia de vinho tinto (SOUTO et al., 2000; VITRAC et al., 2005).

O resveratrol é um polifenol da classe dos estilbenos com uma estrutura química constituída por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte metila e ligações de três grupos hidroxila inseridos nos anéis (KING et al., 2006). Esta estrutura é sintetizada naturalmente sob duas formas isômeras: *trans* e *cis*-resveratrol (Figura 8B). O isômero *trans* é encontrado em maiores quantidades e é responsável pelos efeitos biológicos do resveratrol. Na forma *cis* e *trans* o resveratrol também pode apresentar-se ligado a uma molécula de açúcar formando seus respectivos glicosídeos. A forma *trans*-resveratrol é fotossensível, podendo ser convertida em presença de luz visível, em *cis*-resveratrol, perdendo assim a sua função biológica (DORÉ, 2005; BAURE & SINCLAR, 2006).

Os efeitos benéficos do resveratrol à saúde dependem em parte da sua biodisponibilidade e metabolismo. Recentemente vários estudos têm analisado a absorção do resveratrol *in vivo*, sendo que em seres humanos foi observada uma absorção de cerca de 70 % após doses orais, no entanto pequenas quantidades do composto original foram encontradas no plasma desses indivíduos (WALLE et al., 2004). LANÇON et al.(2004) mostraram na linhagem humana hepática HepG2, que o transporte do resveratrol ocorre tanto por difusão passiva como por transporte ativo. O resveratrol também é capaz de ligar-se a albumina, contribuindo desta forma para sua distribuição no organismo (JANNIN et al., 2004). Os principais tecidos alvos deste composto são o fígado, os rins, o coração, os ovários, os pulmões e o cérebro (VITRAC et al., 2003). Estudos têm demonstrado que devido a sua elevada solubilidade lipídica o resveratrol é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e incorporar-se no tecido cerebral (WANG et al., 2002, JANNIN et al., 2004) o que contribui para seu efeito neuroprotetor.

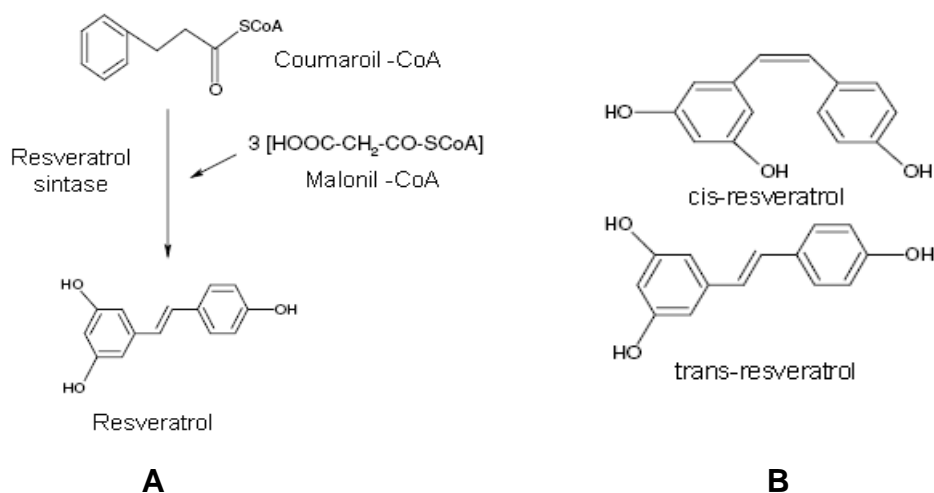


Figura 8 - A) Síntese do resveratrol. B) Isômeros cis- e trans-resveratrol. Adaptado de King et al., 2006

2.6.1 Propriedades biológicas do resveratrol

O resveratrol possui uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas estabelecidas que contribuem para seus efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversas patologias (SOLEAS et al, 1997; FREMONT et al, 2000; KING et al., 200; SAIKO et al., 2007).

Uma das mais conhecidas e importantes propriedades do resveratrol é a sua alta capacidade antioxidante atenuando os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo (FABRIS et al. 2008). Tal propriedade está associada principalmente com a estrutura química deste composto (KING et al., 2006). Os grupos hidroxilas dos anéis fenólicos do resveratrol agem como doadores de elétrons, sendo responsáveis pela capacidade de neutralizar e seqüestrar o radical hidroxil e o ânion superóxido prevenindo dessa forma a peroxidação lipídica das membranas, oxidação protéica e danos ao DNA (LÓPEZ-VÉLEZ et al., 2003; LEONARD et al., 2003; MOKNI et al., 2007). O resveratrol pode atuar também como um agente quelante de metais como o ferro, que exerce um papel importante na geração de EROs através de reações como a de Fenton. Além disso, dados da literatura mostram que o resveratrol é capaz de aumentar a atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo como a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (SHARMA e GUPTA, 2002; MOKNI et al, 2007).

Além das propriedades antioxidantes, vários estudos tem demonstrado que o resveratrol tem um importante papel neuroprotetor em condições de injúria cerebral e nos processos neurodegenerativos (ANEKONDA, 2006; DORE, 2005). De fato, o resveratrol tem mostrado seu efeito neuroprotetor em modelos experimentais de isquemia cerebral, observando-se uma importante recuperação neurológica, com redução das lesões nos neurônios após o tratamento com este composto (WANG et al., 2003; WANG et al., 2004; GAO et al., 2005). Outros trabalhos demonstraram que o resveratrol diminui a toxicidade induzida pelo peptídeo beta-amilóide em células PC12 e neurônios hipocámpais (HANG & SURH, 2003; HAN et al., 2004) e também é capaz de atenuar a neurodegeneração observada na Doença de Huntington e Parkinson amenizando o dano motor e cognitivo destas neuropatologias (PARKER et al., 2005; KUMAR et al., 2006; OKAWARA et al., 2007). Adicionalmente, o resveratrol tem mostrado ser eficiente na prevenção de déficits de memória em modelos experimentais de Alzheimer e também no envelhecimento, sugerindo o envolvimento deste composto na neurotransmissão colinérgica (SCHARMA et al., 2002; ANEKONDA et al., 2006, SAIKO et al., 2008). Contudo, os mecanismos através dos quais o resveratrol exerce seu efeito neuroprotetor ainda não estão claros, mas acredita-se que as propriedades antioxidantes deste composto possam contribuir para os efeitos benéficos no SNC (HAN et al., 2004; CHEN et al., 2005).

Outra propriedade bastante estudada e de grande importância do resveratrol é seu potente efeito na proteção e redução da incidência de doenças coronárias (BRADAMANTE et al., 2004; MOKNI et al., 2006). Estudos têm demonstrado que o resveratrol é capaz de inibir a agregação plaquetária tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SZEWCZUK et al., 2004; OLAS & WACHOWICZ, 2005), provocar vasodilatação através de um mecanismo envolvendo o óxido nítrico (CRUZ et al., 2006), além de prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a formação de placas ateroscleróticas (LI et al., 2006). O resveratrol também exerce atividade antitumoral inibindo os três estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão (STEWART et al., 2000). Além disso este composto também possui propriedades anti-inflamatórias, devido a sua capacidade de inibir a transcrição e a atividade da ciclooxigenase (COX), em especial a COX-2, prejudicando dessa forma o metabolismo do ácido araquidônico e interrompendo a produção de prostaglandinas que são substâncias pró-inflamatórias (MURIASET et al., 2004; KIM et al., 2006; ZHU et al. 2008).

Em relação ao diabetes, o resveratrol tem mostrado um papel benéfico na prevenção e também no alívio de algumas complicações. Em ratos diabéticos induzidos com STZ este composto tem diminuído eficientemente os danos causados pelo estresse oxidativo, tanto no soro quanto em tecidos como fígado, rim (CHAN, 2005) e cérebro (ATES et al., 2005). Além disso, o resveratrol mostrou um papel benéfico na disfunção renal (SHARMA et al., 2006) e disfunção cardíaca em animais diabéticos (THIRUNAVUKKARASU et al., 2006). Por todas as funções relatadas acima o resveratrol é uma ferramenta terapêutica promissora a ser testado em doenças endócrinas associadas às alterações neurológicas como o diabetes mellitus.

3. MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo e de um manuscrito, os quais se encontram aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos. As apresentações estão baseadas no artigo aceito para publicação na revista *European Journal of Pharmacology* e no manuscrito submetido para publicação na revista *Neuroscience Letters*.

3.1 Artigo: Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats.

3.2 Manuscrito: Ectonucleotidase and Acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol

3.1 Artigo

Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats

Roberta Schmatz, Cinthia Melazzo Mazzanti, Roselia Spanevello, Naiara Stefanello, Jessié Gutierrez, Maisa Corrêa, Michelle Melgarejo da Rosa, Maribel A. Rubin, Maria Rosa Schetinger, Vera Maria Morsch*



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Neuropharmacology and Analgesia

Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats

Roberta Schmatz, Cinthia Melazzo Mazzanti, Roselia Spanevello, Naiara Stefanello, Jessié Gutierrez, Maisa Corrêa, Michelle Melgarejo da Rosa, Maribel A. Rubin, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch*

Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2008
Received in revised form 2 March 2009
Accepted 10 March 2009
Available online xxx

Keywords:

Resveratrol
Memory
Acetylcholinesterase
Diabetes
Streptozotocin
(Rat)

ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the effect of the administration of resveratrol (RV) on memory and on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex, hippocampus, striatum, hypothalamus, cerebellum and blood in streptozotocin-induced diabetic rats. The animals were divided into six groups ($n=6-13$): Control/saline; Control/RV 10 mg/kg; Control/RV 20 mg/kg; Diabetic/saline; Diabetic/RV 10 mg/kg; Diabetic/RV 20 mg/kg. One day after 30 days of treatment with resveratrol the animals were submitted to behavioral tests and then submitted to euthanasia and the brain structures and blood were collected. The results showed a decrease in step-down latency in diabetic/saline group. Resveratrol (10 and 20 mg/kg) prevented the impairment of memory induced by diabetes. In the open field test, no significant differences were observed between the groups. In relation to AChE activity, a significant increase in diabetic/saline group ($P<0.05$) was observed in all brain structures compared to control/saline group. However, AChE activity decreased significantly in control/RV10 and control/RV20 ($P<0.05$) groups in cerebral cortex, hippocampus and striatum, while no significant differences were observed in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups in all brain structures compared to control/saline group. Blood AChE activity increased significantly in diabetic/saline group ($P<0.05$) decreased in control/RV10, control/RV20 and diabetic/RV20 groups ($P<0.05$) compared to control/saline group. In conclusion, the present findings showed that treatment with resveratrol prevents the increase in AChE activity and consequently memory impairment in diabetic rats, demonstrating that this compound can modulate cholinergic neurotransmission and consequently improve cognition.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent estimates indicate that around 200 million people suffer from diabetes mellitus, making it the most common serious metabolic disorder worldwide (American Diabetes Association, 2007). Diabetes is characterized by hyperglycemia due to insufficient availability of, or insensitivity to insulin and is associated with slowly progressive end-organ damage in the eyes, kidneys, blood vessels, heart and peripheral nerves, as well as in the brain (Gispén and Biessels, 2000; Northam et al., 2006).

Several studies have described the effects of diabetes in the central nervous system (CNS) as a series of neurochemical, neurophysiological and structural abnormalities, a condition referred to as diabetic encephalopathy (Biessels et al., 2002a; Sima et al., 2004). In addition

to these abnormalities, impairments in cognitive function have been observed in diabetic patients and also in animal models of diabetes (Strachan et al., 2003; Brands et al., 2007). These impairments have been characterized mainly by moderate deficits in learning and memory, psychomotor slowing and reduced mental flexibility (Cukierman et al., 2005; Brands et al., 2007). Furthermore, diabetic patients also seem to double the probability of developing Alzheimer's disease and other dementias (Arvanitakis et al., 2004; Biessels et al., 2006).

In fact, the mechanism causing brain damage in diabetes mellitus has not been fully elucidated, but it appears to be a multifactorial process which involves fluctuation in the blood glucose level, as well as acute and chronic metabolic and vascular disturbances, such as a decrease in cerebral blood flow (Manschot et al., 2003) and alterations in cellular calcium homeostasis (Cameron et al., 2001; Biessels, 2002b). Moreover, it has been demonstrated that hyperglycemia induces oxidative stress (Tuzcu and Baydas, 2006) in various brain regions and also alters activities of enzymes that are considered critical for normal CNS functioning, such as Na^+/K^+ -ATPase (Franzon

* Corresponding author. Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 32208978.

E-mail address: veramorsch@gmail.com (V.M. Morsch).

et al., 2004), catalase, NTPDase and 5'-nucleotidase (Lunkes et al., 2004). In addition, some studies using experimental diabetes have found an increase in acetylcholinesterase (AChE) activity which may indicate alterations in cholinergic neurotransmission and consequently be associated to cognitive impairments observed in diabetes mellitus (Sanchez-Chavez and Salceda, 2000; Kuhad et al., 2008).

Cholinergic neurons and their projections are widely distributed throughout the CNS with an essential role in regulating many vital functions, such as learning, memory, cortical organization of movement and cerebral blood flow control (Mesulam et al., 2002). Literature data have demonstrated that one of the most important mechanisms responsible for correct cholinergic function is performed by AChE (Appleyard, 1992). This enzyme hydrolyses the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic cleft of cholinergic synapses and neuromuscular junctions (Soreq and Seidman, 2001). In addition to its role in cholinergic neurotransmission, AChE has been implicated in several non-cholinergic actions such as cell proliferation (Appleyard, 1994) neurite outgrowth (Chacón et al., 2003) and haematopoiesis (Silman and Sussman, 2005). Interestingly, AChE responds to various insults including oxidative stress, an important event that has been related to the pathogenesis and progression of a variety of CNS disorders, such as stroke (Ozkul et al., 2007), Alzheimer's diseases (Chauhan and Chauhan, 2006) and diabetes mellitus (Kuhad et al., 2008).

Resveratrol (3,5,4-trihydroxy-trans-stilbene) is a polyphenol found mainly in grapes and red wine with diverse established biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective and anticarcinogenic roles (Baur and Sinclair, 2006; Saiko et al., 2008). Recently, a number of studies have focused on the neuroprotective effects of resveratrol, demonstrating that this compound attenuates amyloid β peptide-induced toxicity (Han et al., 2004; Anekonda, 2006), protects against cerebral ischemic injury (Wang et al., 2002; Uguralp et al., 2005) and kainic acid-induced excitotoxicity (Wang et al., 2004). Several neuroprotective properties of resveratrol have been attributed to its potent antioxidant activity that in many studies has been shown to protect the neural tissue against a variety of neurodegenerative conditions caused by oxidative stress (Ates et al., 2005; Mokni et al., 2007; Quincozes-Santos et al., 2007).

Therefore, considering that diabetes mellitus is associated with cognitive dysfunction and that resveratrol has important neuroprotective actions, the aim of this study was to investigate the effects of this compound on learning and memory as well as on activity of AChE enzyme in brain and whole blood of streptozotocin-induced diabetic rats in order to verify the participation of resveratrol in the modulation of the cholinergic system.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, streptozotocin, resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene, 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.

2.2. Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days; 250–270 g) from the Central Animal House of the University Federal of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. The 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: 21/2007).

2.3. Experimental induction of diabetes

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 55 mg/kg streptozotocin, diluted in 0.1 M sodium-citrate buffer (pH 4.5). The age-matched control rats received an equivalent amount of sodium-citrate buffer. Streptozotocin-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 48 h after streptozotocin or vehicle injection to measure glucose levels. Glucose levels were measured with a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO, USA). Only animals with fasting glycemia over 300 mg/dl were considered diabetic and used for the present study. During the experiment blood glucose levels were verified four times (2, 10, 20, and 30 days after the beginning of treatment). The animals that maintained fasting glycemia higher than 300 mg/dl were considered diabetic and selected for behavioral tests and enzymatic assays.

2.4. Treatment with resveratrol (RV)

The animals were randomly divided into six groups (six to thirteen rats per group): Control/saline; Control/RV 10 mg/kg; Control/RV 20 mg/kg; Diabetic/saline; Diabetic /RV 10 mg/kg; and Diabetic/RV 20 mg/kg. One week after diabetes induction, the animals belonging to group control/RV10 and diabetic/RV10 received 10 mg/kg of resveratrol intraperitoneally and the animals from control/RV20 and diabetic/RV20 groups received 20 mg/kg of resveratrol, while the animals from control/saline and diabetic/saline groups received saline solution intraperitoneally. Resveratrol was freshly prepared in 25% ethanol and was administered at between 10 and 11 a.m. once a day during 30 days, at a volume not exceeding 0.1 ml/100 g rat weight.

2.5. Behavioral procedure

2.5.1. Inhibitory avoidance

One day after the end of the treatment with resveratrol or saline, animals were subjected to training and test in a step-down inhibitory avoidance apparatus according to Guerra et al. (2006). Briefly, the rats were subjected to a single training session in a step-down inhibitory avoidance apparatus, which consisted of a $25 \times 25 \times 35$ -cm box with a grid floor whose left portion was covered by a 7×25 -cm platform, 2.5 cm high. The rat was placed gently on the platform facing the rear left corner, and when the rat stepped down with all four paws on the grid, a 2-s 0.4-mA shock was applied to the grid. Retention test took place in the same apparatus 24 h later. Test step-down latency was taken as a measure of retention, and a cut-off time of 500 s was established.

2.5.2. Open field

Immediately after the inhibitory avoidance test session, the animals were transferred to an open-field measuring $56 \times 40 \times 30$ cm, with the floor divided into 12 squares measuring 12×12 cm each. The open-field session lasted for 5 min and during this time, an observer, who was not aware of the pharmacological treatments, recorded the number of crossing responses and rearing responses manually. This test was carried out to identify motor disabilities, which might influence inhibitory avoidance performance at testing.

2.5.3. Foot shock sensitivity test

Reactivity to shock was evaluated in the same apparatus used for inhibitory avoidance, except that the platform was removed. The modified "up and down" method of Rubin et al. (2004) was used to determine the flinch and jump thresholds in experimentally naive animals. Animals (control/saline and diabetic/saline) were placed on the grid and allowed a 3 min habituation period before the start of a series of shocks (1s) delivered at 10 s intervals. Shock intensities

Table 1

The effect of different doses of resveratrol (RV) on body weight and fasting blood glucose levels in control and diabetic rats at the onset and the end of the experiment (30 days after resveratrol treatment).

| Groups | Glucose (mM) | | Body weight (g) | |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Onset | End | Onset | End |
| Control/saline | 6.30 ± 1.10 ^a | 6.20 ± 1.19 ^a | 256 ± 4.50 ^a | 284 ± 8.15 ^a |
| Control/RV 10 mg/kg | 5.60 ± 0.86 ^a | 6.10 ± 2.87 ^a | 250 ± 5.19 ^a | 269 ± 9.40 ^a |
| Control/RV 20 mg/kg | 6.20 ± 0.90 ^a | 5.80 ± 1.27 ^a | 240 ± 3.10 ^a | 261 ± 4.68 ^a |
| Diabetic/saline | 6.10 ± 1.28 ^a | 25.10 ± 1.26 ^b | 250 ± 5.09 ^a | 189 ± 15.44 ^b |
| Diabetic/RV10 mg/kg | 5.80 ± 2.13 ^a | 25.60 ± 2.24 ^b | 265 ± 4.17 ^a | 202 ± 7.47 ^b |
| Diabetic/RV20 mg/kg | 5.90 ± 1.19 ^a | 23.20 ± 1.52 ^b | 270 ± 5.24 ^a | 202 ± 11.41 ^b |

Values are expressed as mean ± S.E.M. Groups with different letters are statistically different (^{a,b} $P < 0.05$, $n = 6-8$). ANOVA–Duncan's Test.

ranged from 0.1 to 0.5 mA in 0.1 mA increments. The adjustments in shock intensity were made in accordance with each animal's response. The intensity was raised by one unit when no response occurred and lowered by one unit when a response was made. A flinch response was defined as withdrawal of one paw from the grid floor, and a jump response was defined as withdrawal of three or four paws. Two measurements of each threshold (flinch, and jump) were made, and the mean of each score was calculated for each animal.

2.6. Brain tissue preparation

After behavioral tests, the animals were submitted to euthanasia being previously anesthetized with ethyl ether and brain structures were removed and separated into cerebral cortex, hippocampus, striatum, hypothalamus and cerebellum and placed in a solution of 10 mM Tris–HCl, pH 7.4, on ice. The brain structures were homogenized in a glass potter in Tris–HCl solution. Aliquots of resulting brain structure homogenates were stored at -8°C until utilization. Protein was determined previously in a strip that varied for each structure: cerebral cortex (0.7 mg/ml), striatum (0.4 mg/ml), hippocampus (0.8 mg/ml), hypothalamus (0.6 mg/ml) and cerebellum (0.6 mg/ml) as determined by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard solution.

2.7. Cerebral AChE enzymatic assay

The AChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellmann et al. (1961) as previously described by Rocha et al. (1993). The reaction mixture (2 ml final volume) contained 100 mM K^{+} -phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid-nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2-min incubation at 25°C . The enzyme (40–50 μg of protein) was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and the enzyme activity was expressed in μmol AcSCh/h/mg of protein.

2.8. Blood sample collection

The blood was collected in vacutainer tubes using EDTA as anticoagulant. The samples were hemolysed with phosphate buffer, pH 7.4 containing Triton X 100 (0.03%) and stored at -20°C for one week.

2.9. Determination of AChE activity in whole blood

The AChE enzymatic assay was determined by the method of Ellmann et al. (1961) modified by Worek et al. (1999). The specific activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and hemoglobin content and the results were expressed as $\mu\text{M}/\mu\text{mol}$ of whole blood.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of training and test step-down latencies was carried out by the Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–Wallis test (nonparametric two-way ANOVA). Foot shock sensitivity was analyzed by unpaired t test. AChE activity, blood glucose, body weight, crossing and rearing responses were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all experiments.

3. Results

3.1. Blood glucose and body weight

"The body weight and blood glucose levels determined at the onset and at the end of the experiment are presented in Table 1. As can be observed, the blood glucose levels at the onset of the study showed no significant differences among the groups. The blood glucose levels for the diabetic/saline group ($P < 0.05$) were significantly increased when compared to the control/saline group at the end of the experiment. However, the treatment with resveratrol had no effects on glucose levels in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups, which remained increased, when compared to the control/saline group. Similarly, no significant differences in glucose levels were observed when resveratrol was administered per se in control/RV10 and control/RV20 groups at the end of the study when compared to the control/saline group. In relation to body weight, no significant differences among the groups were observed at the onset of the experiment. In the diabetic/saline group a significant decrease ($P < 0.05$) in body weight was observed when compared to the control/saline group at the end of the experiment. The treatment with resveratrol had no effects on body weight in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups at the end of the study, which remained reduced in relation to the control/saline group. Treatment with resveratrol per se also had no effects on body weight in control/RV10 and control/RV20 groups when compared to the control/saline group at the end of the study."

3.2. Behavioral tests

3.2.1. Inhibitory avoidance

Fig. 1 shows the effect of administration of resveratrol per se (10 and 20 mg/kg), as well as its administration in streptozotocin-induced diabetic rats, on step-down latencies. Statistical analysis of testing (nonparametric two-way ANOVA) showed a significant diabetic or control vs resveratrol (10 and 20 mg/kg) or saline interaction

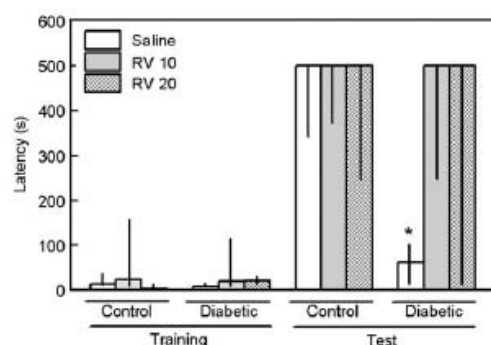


Fig. 1. Rats were made diabetic by streptozotocin. Control and diabetic rats were treated with resveratrol once daily i.p. for 30 consecutive days. After one treatment-free day animals were tested in a step-down latency test. Data are median ± interquartile of training and test. * $P < 0.05$ compared with the others groups at testing by the Dunn's nonparametric multiple comparisons task. $n = 6-13$.

($P < 0.05$), revealing that treatment with resveratrol reversed the impairment of memory induced by diabetes. Statistical analysis of training showed no difference between groups.

Because motivational disparities in the training session may account for differences in inhibitory avoidance at testing, experiments were performed to assess whether diabetes or resveratrol affected shock threshold, or locomotor ability of the animals. Statistical analysis of open-field data (one-way ANOVA) revealed that pharmacological treatment did not alter the number of crossing ($P > 0.05$) or rearing ($P > 0.05$) responses in a subsequent open-field test session, suggesting that neither STZ-induced diabetes nor resveratrol caused gross motor disabilities at testing. Moreover, diabetes did not alter foot shock sensitivity, as demonstrated by the similar flinch (unpaired t test, $P = 0.45$) and jump (unpaired t test, $P = 1.57$) thresholds exhibited by the animals. These data suggest that neither the diabetic state nor treatment with resveratrol administered before training of inhibitory avoidance caused motor disabilities or altered foot shock sensitivity (data not shown).

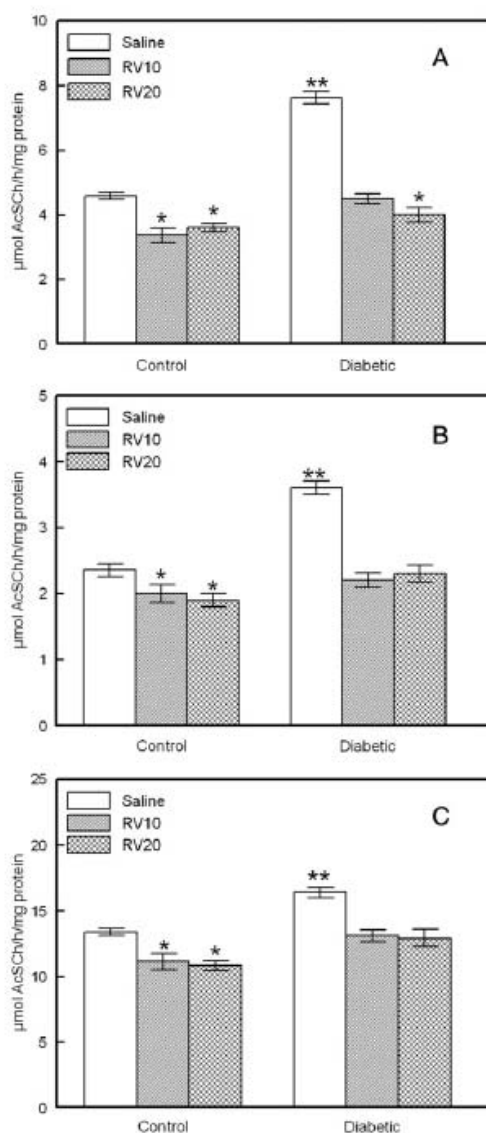


Fig. 2. AChE activity in cerebral cortex (A), hippocampus (B) and striatum (C) of streptozotocin-induced diabetic rats and those treated with resveratrol. Bars represent means \pm S.E.M. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ $n = 6-8$). ANOVA–Duncan's Test.

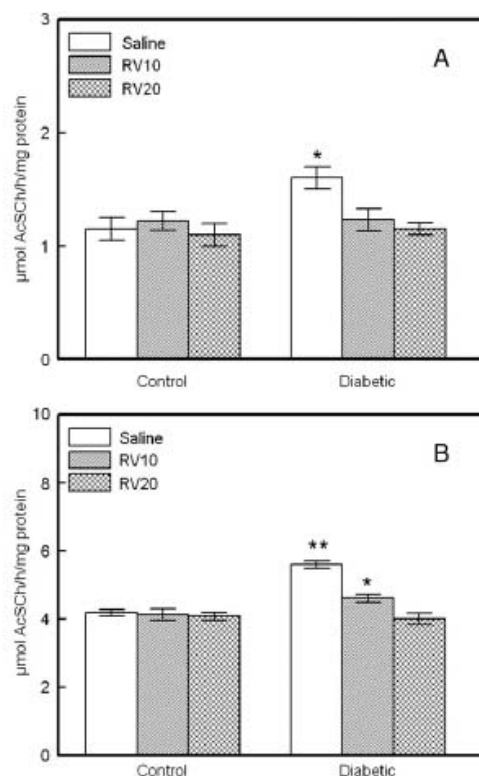


Fig. 3. AChE activity in cerebellum (A) and hypothalamus (B) of streptozotocin-induced diabetic rats and those treated with resveratrol. Bars represent means \pm S.E.M. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ $n = 6-8$). ANOVA–Duncan's Test.

3.3. Activity of AChE in brain

The results obtained for AChE activity in cerebral cortex are presented in Fig. 2A. As can be observed, AChE activity was significantly increased in the diabetic/saline group ($P < 0.05$) compared to the control/saline group. However, treatment with resveratrol significantly prevented the increase in AChE activity in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P < 0.05$). On the other hand, treatment with resveratrol per se inhibited significantly AChE activity in control/RV10 and control/RV20 groups ($P < 0.05$) when compared to control/saline group.

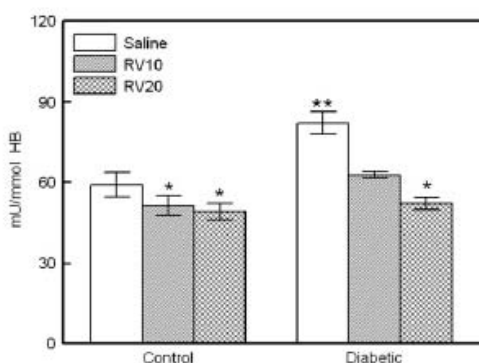


Fig. 4. AChE activity in whole blood of induced diabetic rats and those treated with resveratrol. Bars represent means \pm S.E.M. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ $n = 6-8$). ANOVA–Duncan's Test.

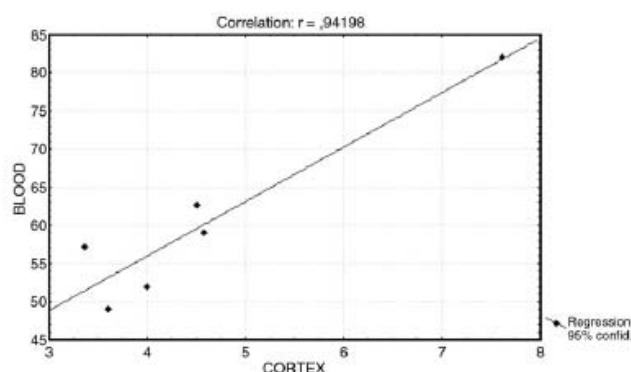


Fig. 5. Correlation between AChE activities obtained in cerebral cortex and whole blood ($r = 0.94198$, $P < 0.05$), Pearson's correlation.

In relation to hippocampus, a significant increase in AChE activity in the diabetic/saline group ($P < 0.05$) was observed when compared to the control/saline group (Fig. 2B). Treatment with resveratrol prevented this increase in AChE activity in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P < 0.05$). In addition, treatment with resveratrol per se significantly inhibited AChE activity in control/RV10 and control/RV20 groups ($P < 0.05$) when compared to the control/saline group.

The results obtained for striatum are presented in Fig. 2C. Similarly to cortex and hippocampus, a significant increase in AChE activity in the diabetic/saline group ($P < 0.05$) was observed when compared with the control/saline group, while treatment with resveratrol prevented this rise in AChE activity in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P < 0.05$). However, treatment with resveratrol per se significantly inhibited AChE activity in control/RV10 and control/RV20 groups ($P < 0.05$) when compared to the control/saline group.

In cerebellum and hypothalamus the results were similar and can be observed in Fig. 3A and B, respectively. AChE activity in these two cerebral regions was significantly increased in diabetic/saline group ($P < 0.05$) when compared to control/saline group. Treatment with resveratrol also prevented the increase in AChE activity in control/RV10 and control/RV20 groups ($P < 0.05$). However, when resveratrol was given per se no significant differences in AChE activity were observed in control/RV10 and control/RV20 groups when compared to the control/saline group.

3.4. Activity of AChE in whole blood

Similarly to brain regions, AChE activity in blood was also increased in the diabetic/saline group ($P < 0.05$) when compared to the control/saline group (Fig. 4). In addition, treatment with resveratrol prevented this rise in AChE activity in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P < 0.05$). On the other hand, treatment with resveratrol per se significantly inhibited AChE activity in control/RV10 and control/RV20 groups ($P < 0.05$) when compared to control/saline group.

Analyzing only AChE activity in cerebral cortex and whole blood, there was statistically significant positive correlation ($r = 0.94189$, $P < 0.05$) (Fig. 5).

4. Discussion

Diabetes mellitus is associated with cognitive dysfunctions which are paralleled by neurophysiological and structural changes in the CNS (Biessels et al., 2008). In addition, polyphenolic compounds have recently received considerable attention since they have been shown to protect neurons against a variety of experimental neurodegenerative conditions including cognitive deficits associated with diabetes

(Baydas et al., 2003, 2004). Although some studies have investigated the neuroprotective actions of resveratrol in diabetes animal models (Ates et al., 2005; Kumar et al., 2007) the effects of this compound on cholinergic neurotransmission has not been reported in the literature. Thus, in the present study the effects of this polyphenol on memory and AChE activity were investigated in streptozotocin-induced diabetic rats.

The inhibitory avoidance test is a classic model behavioral test, with a strong aversive component, utilized for evaluating learning and memory in rats and mice (Cahill et al., 1986). In our study, we observed a significant decrease in step-down latency in diabetic rats in the inhibitory avoidance test (Fig. 1), suggesting learning and memory impairment in these animals. These results are in agreement with other studies that have also verified cognitive impairment in streptozotocin-induced diabetes mellitus (Biessels and Gispen, 2005; Kuhad et al., 2008). However, when the diabetic rats were treated with resveratrol (10 and 20 mg/kg) (Fig. 1) the step-down latency in the inhibitory avoidance test was similar to that found for rats from the control group. These findings indicate that treatment with resveratrol was able to prevent learning and memory impairment induced by diabetes.

A major concern in shock motivated learning tests, particularly in those that investigate the effect of drugs given before the acquisition of a given test, is whether pharmacological treatment affects locomotor activity or motivational aspects of learning, such as shock sensitivity. To rule out this possibility, we assessed locomotor behavior immediately after the inhibitory avoidance test session in order to identify any motor disability, which might influence inhibitory avoidance performance. Our results demonstrated that locomotor activity in the control, diabetic group and the diabetic group treated with resveratrol did not affect the number of crossing or rearing responses in the open-field session. We also demonstrated that streptozotocin-induced diabetic rats did not demonstrate altered shock sensitivity (data not shown). These data exclude the possibility that locomotor activity or shock sensitivity may have contributed to the change alteration in step-down latencies at testing in the inhibitory avoidance test in diabetic rats.

Although the exact mechanism through which diabetes alters cognitive functions is still not completely understood, it has been demonstrated that AChE has a fundamental role in learning and memory (Das et al., 2002; Sato et al., 2004) and alterations in its activity as well as in the acetylcholine neurotransmitter level are neurochemically associated with cognitive deficits observed in patients and in animal models of diabetes mellitus (Kuhad and Chopra, 2007; Ghareeb and Hussien, 2008).

In the present work, we observed an increase in AChE activity in diabetic rats in all brain regions evaluated (cerebral cortex, hippocampus, striatum, cerebellum and hypothalamus) (Figs. 2A,B,C,3A and B). However, this increase was less pronounced in cerebellum and hypothalamus. The lack of uniformity in the profile of AChE may be a reflection of the functional heterogeneity in the central cholinergic system. Neurons containing choline acetyltransferase are present at virtually all levels of the CNS. In any one region, all of the cholinergic neurons are usually similar in appearance, and in some cases, the neurons in different regions are similar. However, cholinergic neurons generally vary in appearance from region to region and this difference can be quite striking (Malik et al., 1998; Das et al., 2001). For example, the hippocampus and cerebral cortex receive cholinergic projections from de nucleus basalis of Meynert and the striatum, which has an intrinsic cholinergic circuit, presented similar results. On the other hand, the cerebellum and hypothalamus presented little cholinergic neuron, that can explain the low activity of AChE in relation to other structures (Das et al., 2001).

Similarly, Sanchez-Chavez and Salceda (2000) also observed a significant elevation in AChE activity in serum and cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. Interestingly, AChE activation

leads to a fast acetylcholine degradation and a subsequent down stimulation of acetylcholine receptors causing undesirable effects on cognitive functions (Tōugu and Kesvatera, 1996; Soreq and Seidman, 2001). Based on our results we can suggest that the increase in AChE activity caused by diabetes leads to a reduction of cholinergic neurotransmission efficiency due to a decrease in acetylcholine levels in the synaptic cleft, thus contributing to progressive cognitive impairment and other neurological dysfunctions seen in diabetic patients. Furthermore, we may infer that the activator effect elicited by diabetic state on AChE activity could be one of the mechanisms involved on the memory impairment observed in the inhibitory avoidance test in this study as well as and other behavioral tests.

It is well recognized that the diabetic state results in altered membrane functions in several tissues including brain (Ghareeb and Hussien, 2008). These alterations occur due to an enhancement of free radical formation which promotes increased lipid peroxidation, having as major consequence oxidative deterioration of the cellular membranes (Halliwell and Chirico, 1993). AChE is a significant biological component of the membrane that contributes to its integrity and changes in permeability occurring during synaptic transmission and conduction. This enzyme is present in G4 (membrane bound) and G1 (cytosolic) form in different brain regions (Das et al., 2001). In the mammalian brain the G4 form represents 60–90% of the total AChE, depending on the anatomical region, the remainder is composed by G1 and G2 forms (Descarries et al., 1997). Additionally, alterations in the lipid membrane observed during the diabetic state could be a decisive factor in the modification of the conformational state of the AChE molecule and would explain changes activity this enzyme (Das et al., 2001; Aldunate et al., 2004). Based on these observations, we can suggest that AChE activation found in diabetes mellitus may be mediated by free radical production and consequent oxidative stress in the different brain regions.

In this study, treatment with resveratrol in doses of 10 and 20 mg/kg was able to preventing the increase in AChE activity in all cerebral structures evaluated in diabetic rats (Figs. 2A,B,C,3A and B). These results are similar to those found in studies with other antioxidants such as vitamin E (Tuzcu and Baydas, 2006), curcumin (Kuhad and Chopra, 2007) and lycopene (Kuhad et al., 2008) that also prevented the rise in AChE activity and consequently in cognitive deficits induced by the diabetic state. In line with this, we can suggest that the antioxidant property of resveratrol may be responsible for preventing cholinergic dysfunction in diabetic rats. In fact, several studies have shown that resveratrol protects against oxidative stress, decreasing membrane lipid peroxidation and increasing the antioxidant defensive capacity in diabetic animal brain (Ates et al., 2005; Kumar et al., 2007).

One important aspect to be discussed in this study is that resveratrol *per se* (10 and 20 mg/kg) was capable of inhibiting AChE activity in cortex cerebral, hippocampus and striatum, which are structures rich in cholinergic pathway (Fig. 2A,B and C). AChE inhibitors are an important therapeutic target for the treatment of many neurological diseases. These compounds increase the efficiency of cholinergic transmission by preventing the hydrolysis of released ACh by inhibition of AChE, thus making more ACh available at the cholinergic synapse (Benzi and Morreti, 1998; Grisar et al., 1999; Das et al., 2002). In this line, we suggest that a decrease of AChE activity by resveratrol can contribute for increasing levels of ACh and consequently to improve the cognitive functions, such as learning and memory (Mesulam et al., 2002; Kaur et al., 2007), suggesting an interaction between resveratrol and the neurotransmission cholinergic.

In addition to its antioxidants properties, the biological role of resveratrol may also be related to several other properties (Ovesna and Horvathova-Kozics, 2005). Resveratrol has structural similarity with estrogens and this could explain its estrogenic effect as well as, at least in part, its anti-inflammatory activity, by binding to estrogens receptors (Jannin et al., 2004). In agreement with these findings, it has

been reported by Nizri et al. (2005, 2006) that AChE inhibitors possess anti-inflammatory properties that promote cholinergic up-regulation by reducing lymphocyte proliferation and the secretion of pro-inflammatory cytokines. In this context, we can suggest that, resveratrol besides possessing antioxidant and anti-inflammatory properties also inhibits AChE activity as shown in our study, combining thus different functions in a single molecule.

In relation to AChE activity in the whole blood, the results were similar with those obtained in the cerebral regions. In fact, the correlation data demonstrated similar behavior between cerebral cortex and blood AChE activity (Fig. 5). Supporting these findings, it was reported by Bernhardt et al. (2005) that the concentration of AChE in whole blood is potentially a stable biomarker for the study of neurodegenerative disorders. In addition, it was reported by Thiermann et al. (2005) that whole blood could have similar functional properties as synaptic AChE and therefore may reflect the status at the synaptic site. In this context, we can infer that AChE activity in blood could be a good peripheral marker because it permits evaluation through the more accessible methods of the action of this enzyme in CNS.

In conclusion, the results from the present study demonstrated impairment in memory and learning in diabetic rats, which was coupled with a marked increase in AChE activity in all brain structures. In addition treatment with resveratrol was able to prevent the increase in AChE activity and consequently in cognitive impairment in diabetic rats, demonstrating that this compound can modulate cholinergic neurotransmission and consequently improves cognition. These results may contribute to a better understanding of the neuroprotective role of resveratrol, emphasizing the influence of this polyphenol and other antioxidants in the diet for human health, possibly preventing brain disorders associated with cognitive impairments such as diabetes mellitus.

Acknowledgements

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

References

- Aldunate, R., Casar, J.C., Brandan, E., 2004. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res. Rev.* 47, 96–104.
- American Diabetes Association, 2007. Standards of medical care for diabetes. *Diabetes Care* 17, 1514–1522.
- Anekonda, T.S., 2006. Resveratrol – A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.* 52, 316–326.
- Appleyard, M.E., 1992. Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci.* 15, 485–490.
- Appleyard, M.E., 1994. Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 749–755.
- Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A., Bennett, D.A., 2004. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch. Neurol.* 61, 661–666.
- Ates, O., Cayli, S.R., Yucel, N., Altinoz, E., Kocak, A., Durak, M.A., Turkoz, Y., Yologlu, S., 2005. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Clin. Neurosci.* 14, 256–260.
- Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493–506.
- Baydas, G., Kutlu, S., Naziroglu, M., Canpolat, S., Sandal, S., Ozcan, M., Kelestimur, H., 2003. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *J. Pineal Res.* 34, 36–39.
- Baydas, G., Donder, E., Kiliboz, M., Sonkaya, E., Tuzcu, M., Yasar, A., Nedzvetkii, V.S., 2004. Neuroprotection by alpha-lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry—Moscow* 69, 1001–1005.
- Benzi, G., Morreti, A., 1998. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.* 346, 1–13.
- Bernhardt, R.V., Alarcón, R., Mezzano, D., Fuentes, P., Inestrosa, N.C., 2005. Blood cells cholinesterase activity in early Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 19, 204–212.
- Biessels, G.J., Heide, L.P., Kamal, A., 2002a. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 441, 1–14.

- Biessels, G.J., Laak, M.P., Hamers, F.P.T., Gispen, W.H., 2002b. Neuronal Ca^{2+} dysregulation in diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 201–209.
- Biessels, G.J., Gispen, W.H., 2005. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol. Aging* 26, 36–41.
- Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., Scheltens, P., 2006. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 5, 64–74.
- Biessels, G.J., Deary, I.J., Ryan, C.M., 2008. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol.* 7, 184–190.
- Brands, A.M., Biessels, G.J., Kappelle, L.J., de Haan, E.H., de Valk, H.W., Algra, A., Kessels, R.P.C., 2007. Cognitive functioning and brain MRI in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: a comparative study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 23, 343–350.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cahill, L., Brioni, J., Izquierdo, I., 1986. Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia and some clinical implications. *Psychopharmacology* 90, 454–456.
- Cameron, N.E., Eaton, S.E.M., Cotter, M.A., Tesfaye, S., 2001. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44, 1450–1458.
- Chacón, M.A., Reyes, A.E., Inestrosa, N.C., 2003. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *J. Neurochem.* 87, 195–204.
- Chauhan, V., Chauhan, A., 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology* 13, 195–208.
- Cukierman, T., Gerstein, H.C., Williamson, J.D., 2005. Cognitive decline and dementia in diabetes – systematic overview of prospective observational studies. *J. Diabet.* 48, 12–19.
- Das, A., Dikshit, M., Nath, C., 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 68, 1545–1555.
- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S., Singh, H.K., 2002. A comparative study I rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *ginkgo biloba* anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 893–900.
- Descarries, L., Gsiger, V., Steriade, M., 1997. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 53, 603–625.
- Ellmann, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Franzoni, R., Chiarani, F., Mendes, R., Belló-Klein, A., Wyse, A., 2004. Dietary soy prevents brain Na⁺ K-ATPase reduction in streptozotocin diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 69, 107–112.
- Ghareeb, D.A., Hussen, H.M., 2008. Vanadium improves brain acetylcholinesterase activity on early stage alloxan-diabetic rats. *Neurosci. Lett.* 436, 44–47.
- Gispen, W.H., Biessels, G.J., 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23, 542–549.
- Grisaru, D., Sternfeld, m., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H., 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264, 672–686.
- Guerra, G.P., Mello, C.F., Sauzem, P.D., Berlese, D.B., Furian, A.F., Tabarelli, Z., Rubin, M.A., 2006. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology* 186, 150–158.
- Halliwel, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715–724.
- Han, Y.S., Zheng, W.H., Bastianetto, S., Chabot, J.G., Quiron, R., 2004. Neuroprotective effects of resveratrol against β -amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 141, 997–1005.
- Jamin, B., Menzel, M., Berlot, J.P., Delmas, D., Lanchón, A., Latruffe, N., 2004. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1113–1118.
- Lunkes, G., Lunkes, D., Morsch, V., Mazzanti, C., Morsch, A., Miron, V., Schetinger, M.R., 2004. NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65, 1–6.
- Kaur, T., Pathak, C.M., Pandhi, P., Khanduja, K.L., 2007. Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn.* 67, 25–30.
- Kuhad, A., Chopra, K., 2007. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur. J. Pharmacol.* 576, 34–42.
- Kuhad, A., Sethi, R., Chopra, K., 2008. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sci.* 83, 128–134.
- Kumar, A., Kaundal, R.K., Iyer, S., Sharma, S.S., 2007. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci.* 80 (13), 1236–1244.
- Malik, O., Compston, D.A.S., Scolding, N.J., 1998. Interferon-beta inhibits mitogen induced astrocyte proliferation in vitro. *J. Neuroimmunol.* 86, 155–162.
- Manschot, S.M., Biessels, J.G., Cameron, N.E., Cotter, M.A., Kamal, A., Kappelle, L.J., Gispen, W.H., 2003. Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.* 966, 274–282.
- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627–639.
- Mokni, M., Elkahoui, S., Limam, F., Amri, M., Aouani, E., 2007. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochem. Res.* 32, 981–987.
- Nizri, E., Adani, R., Meshulam, H., Amitai, G., Brenner, T., 2005. Bifunctional compounds eliciting both anti-inflammatory and cholinergic activity as potential drugs for neuroinflammatory impairments. *Neurosci. Lett.* 376, 46–50.
- Nizri, E., Hamra-Amitay, Y., Sicsic, C., Lavon, I., Brenner, T., 2006. Anti inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 50, 540–547.
- Northam, E., Rankins, D., Cameron, F.J., 2006. Therapy insight: the impact of type 1 diabetes on brain development and function. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 78–86.
- Ovesna, Z., Horvathova-Kozics, K., 2005. Structure–activity relationship of trans-resveratrol and its analogues. *Neoplasma* 52, 450–455.
- Ozkul, A., Akyol, A., Yenisey, C., 2007. Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J. Clin. Neurosci.* 14, 1062–1066.
- Quincozes-Santos, Andreazza, A.C., Nardin, A.P., Funchala, C., Gonçalves, C.A., Gottfried, C., 2007. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells A. *Neurotoxicology* 28, 886–891.
- Rocha, J.B.T., Emanuelli, T., Pereira, M.E., 1993. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 53, 431–437.
- Rubin, M.A., Berlese, D.B., Stiegemeier, J.A., Volkweis, M.A., Oliveira, D.M., dos Santos, T.L., Fenili, A.C., Mello, C.F., 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J. Neurosci.* 24, 2328–2334.
- Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., Szekeles, T., 2008. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res., Rev.* 658, 68–94.
- Sanchez-Chavez, G., Saceda, R., 2000. Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina. *IUBMB Life* 49, 283–287.
- Sato, A., Sato, Y., Uchida, S., 2004. Activation of the intracerebral cholinergic nerve fibers originating in the basal forebrain. *Neurosci. Lett.* 361, 90–93.
- Silman, I., Sussman, J., 2005. Acetylcholinesterase: classical and non classical functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 293–302.
- Sima, A.A.F., Kamiya, H., Lia, Z.G., 2004. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 187–197.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat. Rev., Neurosci.* 2, 294–302.
- Strachan, M.W.J., Frier, B.M., Deary, I.J., 2003. Type 2 diabetes and cognitive impairment. *Diabet. Med.* 20, 1–2.
- Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Zilker, T., Worek, F., 2005. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 157–158, 345–347.
- Töugü, V., Kesvatera, T., 1996. Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1298, 12–30.
- Tuzcu, M., Baydas, G., 2006. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 537, 106–110.
- Uguralp, S., Mizrak, B., Bay Karabulut, A., 2005. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 15, 114–119.
- Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G.E., 2002. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.* 958, 439–447.
- Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Rottinghaus, G., Sun, G.Y., Sun, A.Y., 2004. Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem. Res.* 29, 2105–2112.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved 12 determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* 288, 73–79.

3.2 Manuscrito

Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol

Roberta Schmatz, Cinthia Melazzo Mazzanti, Roselia Spanevello, Naiara Stefanello, Jessié Gutierrez, Paula Acosta Maldonado, Maisa Corrêa, Lara Vargas Becker, Cíntia Saydelles da Rosa, Jamile Fabbrin Gonçalves, Margarete Dulce Bagatini, Maria Rosa Schetinger, Vera Maria Morsch

¹ Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

* Corresponding author:

Dr. Vera Maria Morsch

Departamento de Química /Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria RS Brasil - 97105-900

Fax: 0+55 55 32208978

E-mail: veramorsch@gmail.com

Abstract

Diabetes mellitus is associated with cognitive dysfunctions and neurophysiological and structural changes in central nervous system. The aim of the present study was to investigate the effects of resveratrol, an important neuroprotective compound on NTPDase, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase (AChE) activities in synaptosomes from cerebral cortex of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. The animals were divided into six groups (n= 8): Control/saline; Control/RSV 10 mg/kg; Control/RSV 20 mg/kg; Diabetic/saline; Diabetic/RSV 10 mg/kg; Diabetic/RSV 20 mg/kg. After 30 days of treatment with resveratrol the animals were sacrificed and the cerebral cortex was removed for synaptosomes preparation and enzymatic assays. The results demonstrated that NTPDase and 5'-nucleotidase activities were significantly increased in the diabetic/saline group ($P<0.05$) compared to control/saline group. Treatment with resveratrol significantly increased NTPDase, 5'-nucleotidase activities in the diabetic/RSV10 and diabetic/RSV20 groups ($P<0.05$) compared to diabetic/saline group. When resveratrol was administered per se there was also an increase in the activities of these enzymes in the control/RSV10 and control/RSV20 groups ($P<0.05$) compared to control/saline group. AChE activity was significantly increased in the diabetic/saline group ($P<0.05$) compared to control/saline group. The treatment with resveratrol prevented this increase in the diabetic/RSV10 and diabetic/RSV20 groups. In conclusion, this study demonstrated that the resveratrol interfere with the purinergic and cholinergic neurotransmission by altering NTPDase, 5'-nucleotidase and AChE activities in synaptosomes from cortex cerebral of diabetic rats. In this context, we can suggest that resveratrol should be considered potential therapeutics and scientific tools to be investigated in brain disorders associated with the diabetes.

Key words: NTPDase; 5'-nucleotidase; Acetylcholinesterase; Diabetes; Resveratrol; Rats; Streptozotocin; Synaptosomes;

Introduction

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder that has taken on pandemic proportions and its long-term effects can be devastating. Besides the most common complications in the peripheral nervous system [1], studies have demonstrated that diabetes may also cause a series of structural and functional abnormalities in the central nervous system (CNS) [2-4]. In diabetic patients, modest cerebral atrophy and an increased occurrence of subcortical and brain stem lesions have been reported. In addition, cognitive dysfunctions, affecting mainly learning and memory and complex information processing have been reported in patients and in animal models of diabetes [5,6]. Furthermore, diabetes is also associated with increased risk of stroke, depression, Alzheimer's disease and other dementias [7, 8].

Adenine nucleotides represent an important class of extracellular molecules involved in modulation of signaling pathways that are crucial for the normal functioning of the CNS [9]. ATP plays important roles in the cell to cell signaling via the activation of specific ionotropic P2X and G protein coupled P2Y receptors. It acts as a fast excitatory neurotransmitter [10], as a presynaptic neuromodulator [11], and it is also involved in neuron–glial interactions [7] with a role in neuronal development and plasticity [12]. Furthermore, its breakdown product, adenosine, plays an important modulatory role in neuronal activity and neuroprotective actions in pathological conditions which are mediated by the activation of P1-purinoreceptors [10, 13].

Signaling events, induced by extracellular adenine nucleotides, are directly correlated to the activity of ectonucleotidases, including ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) and ecto-5'-nucleotidase/CD73 [14, 15]. These enzymes are involved in the control of nucleotide and nucleoside levels in the

synaptic cleft and in the control of purinergic neuromodulation and neurotransmission [16]. NTPDase is a membrane-bound enzyme that hydrolyzes ATP and ADP to AMP, which is subsequently converted to adenosine by 5'-nucleotidase [16, 17]. Since this enzymatic cascade contributes to the maintenance of physiological levels of extracellular ATP and adenosine, it has been proposed to exert a considerable effect on the effective regulation of several pathophysiological situations [18, 19]. Recent data from our laboratory have indicated alterations in NTPDase and 5'-nucleotidase activities in diabetic patients and rats which have been interpreted as adaptive responses in the attempt to counteract the pathophysiology of this disease [20, 21].

On the other hand, studies in humans and experimental models of diabetes also have found alterations in the activity of acetylcholinesterase (AChE), which may indicate modifications in cholinergic neurotransmission in this pathology [22, 23]. This enzyme promotes the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft of cholinergic synapses and neuromuscular junctions [24] and has an essential role in regulating many vital functions, such as learning, memory, cortical organization of movement and cerebral blood flow control [25]. In addition to its role in cholinergic neurotransmission, AChE has been implicated in several non-cholinergic actions such as cell proliferation [26], neurite outgrowth [27] and hematopoiesis [28]. In this context, an increase or inhibition of this enzyme may result in important consequences in the brain and other organs [25].

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), a polyphenol found in berries, grapes and red wine has been proposed to have several biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective and chemopreventive properties [29, 30]. Recent evidence suggests that resveratrol could play a significant role in important functions of the CNS, especially under pathological conditions. For

example, resveratrol exerts protective effects against cerebral ischemic injury [31], attenuates β -amyloid toxicity [32] induces activation of MAP kinases and protects against diabetic oxidative damage [33]. However, the mechanisms underlying the neuroprotective effects of resveratrol are not fully clarified, but have been attributed mainly to its potent antioxidant activity that has been shown to protect neural tissue against damage caused by oxidative stress [34].

In this context, considering the neuroprotective actions of RSV and the importance of NTPDase, 5'-nucleotidase and AChE for CNS functioning, the aim of the present study was to evaluate the activity of these enzymes in cerebral cortex synaptosomes from streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats treated with resveratrol, in order to investigate the potential therapeutic use of this compound in cerebral dysfunction associated with the diabetic state.

Experimental procedure

Chemicals

Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, streptozotocin, resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene, 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.

Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days; 250–270 g) from the Central Animal House of the University Federal of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$) 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: 21/2007).

Experimental induction of diabetes

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 55 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 48 h after STZ or vehicle injection to measure glucose levels. Glucose levels were measured with a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO, USA). Only animals with fasting glycemia over 300 mg/dl were considered diabetic and used for the present study. During the experiment the levels of blood glucose were verified four times (2, 10, 20, and 30 days after the beginning of treatment). The animals that maintained fasting glycemia higher than 300 mg/dl were considered diabetic and selected for enzymatic assays.

Treatment with resveratrol (RV)

The animals were randomly divided into six groups (eight rats per group): Control/saline; Control/RV 10 mg/kg; Control/RV 20 mg/kg; Diabetic/saline; Diabetic /RV 10 mg/kg; Diabetic/RV 20 mg/kg. One week after diabetes induction, the animals belonging to group control/RV10 and diabetic/RV10 received 10 mg/kg of resveratrol intraperitoneally and the animals from control/RV20 and diabetic/RV20 groups received 20 mg/kg of resveratrol, while the animals from control/saline and

diabetic/saline groups received saline solution intraperitoneally. Resveratrol was freshly prepared in 25% ethanol and was administered at between 10 and 11 a.m. once a day during 30 days, at a volume not exceeding 0.1 ml/100g rat weight.

Synaptosome preparation

After the treatment, the animals were submitted to euthanasia being previously anesthetized with ethyl ether and cerebral cortex was removed for synaptosome preparation. The cerebral cortex was homogenized in 10 volumes of an ice-cold medium (medium I), consisting of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, with a pH of 7.5, in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described by Nagy and Delgado-Escueta (35) using a discontinuous Percoll gradient. The pellet was suspended in an isoosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4 - 0.6 mg/ml. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0 - 4°C throughout the procedure and used for enzymatic assays.

NTPDase and 5'- nucleotidase activities assays

The NTPDase enzymatic assay of the synaptosomes was carried out in a reaction medium containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM Tris– HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µl as described in a previous work from our laboratory [36]. Twenty microliters of enzyme preparation (8–12 µg of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM and incubation proceed for 20 min in either case. 5'-nucleotidase activity was determined essentially by the method of

Heymann et al. (37) in a reaction medium containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µl. Twenty microliters of enzyme preparation (8–12 µg of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37°C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 2.0 mM and proceeded for 20 min. In all cases, reaction was stopped by the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to obtain a final concentration of 5%. Following, the tubes were chilled on ice for 10 min. The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. (38) using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the synaptosomal fraction after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

Acetylcholinesterase (AChE) activity assay

The AChE enzymatic assay was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (39) as previously described by Rocha et al. (40). The reaction mixture (2 ml final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM DTNB. The method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithio-bis-acid-nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2-min incubation at 25°C. The enzyme (40-50 µg of protein) was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide. All samples were run in duplicate or triplicate and the enzyme activity were expressed in µmoles AcSCh/h/mg of protein.

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (41) using serum albumin as standard.

Statistical Analysis

The statistical analysis used was one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range tests. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference. All data were expressed as means \pm SEM.

Results

Blood glucose and body weight

The body weight and blood glucose levels determined at the end of the experiment are presented in table 1. The blood glucose levels for the diabetic/saline group ($P < 0.05$) were significantly increased when compared to the control/saline group. However, treatment with resveratrol had no effect on glucose levels in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups, which remained increased, compared to the control/saline group. Similarly, when resveratrol was administered per se, no significant differences in glucose levels were observed in control/RV10 and control/RV20 groups when compared to the control/saline group. In relation to body weight, a significant decrease was observed in the diabetic/saline group ($P < 0.05$) when compared to the control/saline group and treatment with resveratrol had no effect on body weight in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups which remained reduced in relation to the control/saline group. Treatment with resveratrol per se also had no effect on body weight in control/RV10 and control/RV20 groups when compared to the control/saline group.

NTPDase and 5'-nucleotidase activity

The results of the present study demonstrate that NTPDase and 5'-nucleotidase activities were altered both in the diabetic state and after treatment with resveratrol. The results obtained for NTPDase activity are shown in fig. 1. As can be observed, NTPDase activity with ATP as substrate was significantly increased in the diabetic/saline group ($P<0.05$) when compared to the control/saline group (Fig. 1A). Treatment with resveratrol significantly increased ATP hydrolysis in the diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P<0.05$) when compared to the diabetic/saline group. On the other hand, treatment with resveratrol per se significantly increased ATP hydrolysis in the control/RV10 and control/RV20 groups ($P<0.05$) when compared to the control/saline group.

In relation to ADP hydrolysis, a significant increase in the diabetic/saline group was observed when compared to the control/saline group (Fig. 1B). However treatment with resveratrol significantly increased ADP hydrolysis in the diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P<0.05$) when compared to the diabetic/saline group. Resveratrol per se produced a significant increase in ADP hydrolysis in the control/RV10 and control/RV20 groups ($P<0.05$) compared to the control/saline group.

The results obtained for 5'-nucleotidase activity were similar to those found for NTPDase activity (Fig. 2). Post hoc analysis revealed that AMP hydrolysis was also significantly increased in the diabetic/saline group ($P<0.05$) when compared with the control/saline group. Treatment with resveratrol significantly increased AMP hydrolysis in the diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P<0.05$) when compared to the diabetic/saline group. Moreover, treatment with resveratrol per se provoked a

significant increase in AMP hydrolysis in the control/RV10 and control/RV20 groups ($P<0.05$) when compared to the control/saline group.

AChE activity

The results obtained for AChE activity in cerebral cortex synaptosomes are presented in fig. 3. As can be observed, AChE activity was significantly increased in the diabetic/saline group ($P<0.05$) compared to the control/saline group. However, treatment with resveratrol significantly prevented the increase in AChE activity in diabetic/RV10 and diabetic/RV20 groups ($P<0.05$). On the other hand, treatment with resveratrol per se significantly inhibited AChE activity in the control/RV20 group ($P<0.05$) when compared to the control/saline group.

It is important to note that controls were performed to correct for vehicle (ethanol) interference, and no differences between vehicle and control enzyme activities were observed (data not shown).

Discussion

Diabetes mellitus is associated with cognitive dysfunctions and neurophysiological and structural changes in the CNS. In addition, polyphenolic compounds, including resveratrol, have recently received considerable attention since they have demonstrated the ability to prevent or delay the incidence of cerebral complications in the diabetic state [42, 43]. However, the effects of resveratrol on purinergic and cholinergic neurotransmission in animal models of diabetes remain unknown. Thus, in this study we investigated the effects of resveratrol on NTPDase, 5'-nucleotidase and AChE activities in cerebral cortex synaptosomes from STZ-diabetic induced rats.

Several studies from our laboratory have demonstrated that ectonucleotidases and cholinesterases have an important role in neurotransmission and alterations in their activities have been observed in various diseases suggesting that it could be an important physiological and pathological parameter [21, 44-47].

The results of the present study demonstrated that ATP, ADP and AMP hydrolysis was increased in synaptosomes of STZ-induced diabetic rats (Fig. group 1A, 1B and 2). These results agree with those obtained in previous studies from our laboratory that demonstrated that NTPDase and 5'-nucleotidase activities were also increased in cerebral cortex synaptosomes from diabetic rats experimentally induced with alloxan [21] suggesting that central purinergic neurotransmission was altered in experimental diabetes.

ATP is a molecule involved in a diverse group of functions in the central nervous system [48]. There is considerable evidence that ATP acts as a fast neurotransmitter, co-transmitter in autonomic and sensory nerves and as a presynaptic modulator [49]. On the other hand, it has also been demonstrated that in brain injury, ATP released in large amounts can promote an increase in intracellular calcium levels, which could cause significant tissue damage in diabetic patients [50-52]. In addition to ATP, its breakdown product, adenosine, is an important molecule in neuromodulation, homeostatic regulation and neuroprotection of the CNS [13, 14]. In this context and considering our results, we can suggest that the increase in NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from diabetic rats may be related to an important adaptive plasticity of the ectonucleotidase pathway that could occur in order to terminate the function of extracellular ATP, including its cytotoxic effects, and in order to increase extracellular adenosine production, a known endogenous neuromodulator and neuroprotective.

When treatment with resveratrol (10 and 20 mg/kg) was associated with diabetes, a more accentuated increase in NTPDase and 5'-nucleotidase activities was observed (Fig. 1A, 1B and 2). These results suggest that the modulation of NTPDase and 5'-nucleotidase activities caused by resveratrol may be very important because the increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis contributes to enhance adenosine levels, an important neuroprotective molecule that protects the CNS from neurological complications caused by the diabetic state.

An important data observed in our study is that resveratrol per se also promoted an increase in adenine nucleotide hydrolysis in cerebral cortex synaptosomes. These results suggest that resveratrol promotes an increase in NTPDase and 5'-nucleotidase activities in both pathological and healthy conditions, in order to promote an increase in adenosine levels with favorable effects on the CNS. Thus we can suggest that one of the mechanisms by which resveratrol exerts its neuroprotective effects is through the modulation of the ectonucleotidase pathway in the CNS.

The next set of experiments was performed in order to evaluate the effects of resveratrol on AChE activity in STZ -induced diabetic rats.

Our results demonstrated an increase in the activity of this enzyme in cerebral cortex synaptosomes from diabetic rats (Fig. 3). These results are similar to those found by Kuhad and Chopra (23) who also observed a significant elevation in AChE activity in cerebral cortex from STZ-induced diabetic rats. AChE activation leads to a fast ACh degradation and a subsequent downstimulation of ACh receptors causing undesirable effects on cognitive functions [24, 56]. In this context, we can suggest that the increase in AChE activity caused by experimental diabetes leads to a reduction in the efficiency of cholinergic neurotransmission due to a decrease in

acetylcholine levels in the synaptic cleft, thus contributing to the progressive cognitive impairment and other neurological dysfunctions seen in diabetic patients [57, 58]. In addition, treatment with resveratrol at doses of 10 and 20 mg/Kg was able to prevent an increase in AChE activity. These results are similar to those found in studies with other antioxidants such as curcumin [54] and lycopene [23], which also prevented the rise in AChE activity and consequently the cognitive deficits induced by the diabetic state. In line with this, we can suggest that the antioxidant properties of resveratrol may be responsible for preventing cholinergic dysfunction in diabetic rats. In fact, studies have demonstrated that alterations in AChE activity may be induced by the increased free radical formation in the diabetic state which can provoke lipid peroxidation of cerebral membranes and cause changes in the conformational state of the AChE molecule and consequently in its activity. In addition, studies have demonstrated that resveratrol is able to protect against oxidative stress, decreasing membrane lipid peroxidation and increasing the antioxidant defensive capacity of the brain and thus may prevent alterations in AChE activity in the diabetic condition [32, 58, 59).

Another important aspect to be discussed in this study is that resveratrol *per se* at a dose of 20mg/kg was capable of significantly inhibiting AChE activity in cerebral cortex synaptosomes from diabetic rats (Fig. 2, 3, 4). A decrease in AChE activity indicates an increase of ACh levels in the synaptic cleft enabling an improvement in cognitive functions, such as learning and memory [56], which suggests an interaction between resveratrol and the cholinergic system

In addition, studies have indicated that resveratrol (or one of its metabolites) is able to cross the blood–brain barrier, a very useful property in the treatment of brain pathologies such as cancer, Alzheimer, or Parkinson diseases [60]. Interestingly,

some investigators recently have demonstrated the presence of high affinity plasma membrane binding sites for resveratrol [61]. On the basis of these findings, we can suggest that resveratrol is a promising candidate for treating brain disorders associated with cognitive impairment such as diabetes mellitus.

In conclusion, the results obtained in the present study demonstrate alterations in NTPDase, 5'-nucleotidase and AChE activities in cerebral cortex synaptosomes from diabetic rats, indicating that purinergic and cholinergic neurotransmission is altered in the diabetic state. In addition, resveratrol increased adenine nucleotide hydrolysis and, consequently, levels of adenosine, a neuroprotective nucleoside, contributing to the treatment of neurologic complications in the diabetic state. Resveratrol also prevented the increase in AChE activity, demonstrating that this compound may modulate cholinergic neurotransmission . Thus, we can suggest that resveratrol is a promising natural compound with important neuroprotective actions which should be investigated in future studies in order to find a better therapy for patients with purinergic and cholinergic disorders caused by the hyperglycemic state.

References

1. Bloomgarden ZT (2007) Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*. 30:1027-1032
2. Sima AAF, Kamiya H, Lia ZG (2004) Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 490: 187-197
3. Biessels GJ, Gispen WH (2005) The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol. Aging* 26: 36-41
4. Mijnhout GS, Scheltens P, Diamant M et al (2006) Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition. *Diabetologia* 49: 1447-1448
5. Brands AM, Kessels RP, Haan EH et al (2004) Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk factors and blood-glucose levels. *Eur. J. Pharmacol.* 490: 159-168
6. Biessels GJ, Deary IJ, Ryan, CM (2008) Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol.* 7: 184-90.
7. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL et al (2004) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch. Neurol.* 61: 661-666
8. Burnstock G (2004) Cotransmission. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:47–52

9. Gibb A, Halliday FC (1996) Fast purinergic transmission in the central nervous system. *Neuroscience* 8: 225–232
10. Cunha RA, Ribeiro JA (2000) ATP as presynaptic modulator. *Life Sci.* 68: 119–137
11. Fields RD, Stevens B (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *TINS* 23: 625–633
12. Rathbone M, Middlemiss P, Gysbers J et al (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59: 663–690
13. Cunha RA (2001) Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38: 107–125
14. Dumwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24: 31–35
15. Robson S, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic. Signal.* 2: 409–430

16. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 1783(5): 673-694
17. Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56
18. Oses JP, Cardoso CM, Germano RA et al (2004) Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci.* 74: 3275-3284
19. Agteresch HJ, Dagnelie PC, Van Den Berg JW et al (1999) Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58:211–232
20. Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F (2003) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb. Res.* 109(4): 189-194
21. Lunkes G, Lunkes D, Morsch V et al (2004) NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan - induced diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 65(1): 1-6
22. Sanchez-Chavez G, Salceda R (2000) Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina. *IUBMB Life* 49: 283-287
23. Kuhad A, Sharma S, Chopra K (2008) Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 12: 624–632

24. Appleyard ME (1992) Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci.* 15: 485-490
25. Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P et al (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110: 627-639
26. Appleyard ME (1994) Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 749-755
27. Chacón MA, Reyes AE, Inestrosa NC (2003) Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *J. Neurochem.* 87: 195-204
28. Silman I, Sussman J (2005) Acetylcholinesterase: classical and non classical functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 293-302
29. Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 493-506
30. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W et al (2008) Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res. Rev.* 658: 68-94

31. Wang Q, Yu S, Simonyi A et al (2004) Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem. Res.* 29: 2105-2112
32. Han YS, Zheng WH, Bastianetto S (2004) Neuroprotective effects of resveratrol against b-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 141: 997-1005
33. Ates O, Cayli SR, Yucel N et al (2005) Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Clin. Neurosci.* 14, 256-260
34. Mokni M, Elkahoui S, Limam, F et al (2007) Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neuroch. Res.* 32: 981-987
35. Nagy A, Delgado Escueta AV (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using non-toxic isosmotic gradient material (Percoll). *J. Neurochem.* 43: 1114–1123
36. Schetinger MR, Porto NM, Moretto MB et al (2000). New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. *Neurochem. Res.* 25: 949- 955
37. Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW (1984) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem.* 43: 971–978
38. Chan K, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -NTPase activity. *Anal Biochem.* 157: 375–378

39. Ellmann, GL, Courtney KD, Andres, V et al (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95
40. Rocha, JBT, Emanuelli, T, Pereira ME (1993) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 53: 431-437
41. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
42. Bastianetto S, Quirion R (2002) Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol. Aging* 23:891–897
43. Arts ICW, Hollman PCH (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:156-162
44. Spanevello RM, Mazzanti C, Kaizer R et al (2006) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon. *Neurochem. Res.* 31:455-462

45. Spanevello RM, de Souza Wyse AT, Mazzanti CM et al (2008) Effects in vitro of guanidinoacetate on adenine nucleotide hydrolysis and acetylcholinesterase activity in tissues from adult rats. *Neurochem. Res.* 33(6):1129-37
46. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan C et al (2008) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31(2):77-98
47. Mazzanti CM, Spanevello RM, Pereira LB et al (2006) Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. *Neurochem. Res.* 31(8):1027- 1032
48. Rathbone M, Middlemiss P, Gysbers J et al (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59: 663-690
49. Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:166–176
50. Feuvre, R, Brough D, Rothwell N(2002) Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 447:261-269
51. Biessels GJ, Laak MP, Hamers, FPT et al (2002) Neuronal Ca²⁺ dysregulation in diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* 447: 201-209

52. Sperlágh B, Vizi E, Wirkner K (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 78: 327-346
53. Dumwiddie T, Masino S (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 31-55
54. Kuhad A, Chopra K (2007) Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. *Eur. J. Pharmacol.* 576: 34-42
55. Tõugu V, Kesvatera T (1996) Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1298: 12-30
56. Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase-new roles for and old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 294-302
57. Biessels GJ, Deary IJ, Ryan CM (2008) Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol.* 7: 184–90
58. Kumar A, Kaundal RK, Iyer S (2007) Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci.* 80(13): 1236-1244

59. Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP et al (2008) Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 480 (1):27-32
60. Gilgun-sherki Y, Melamed E, Offen D (2001) Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol* 40:959–975
61. Han YS, Bastianetto S, Dumont Y (2006) Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318:238-245

Acknowledgements

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

Legends

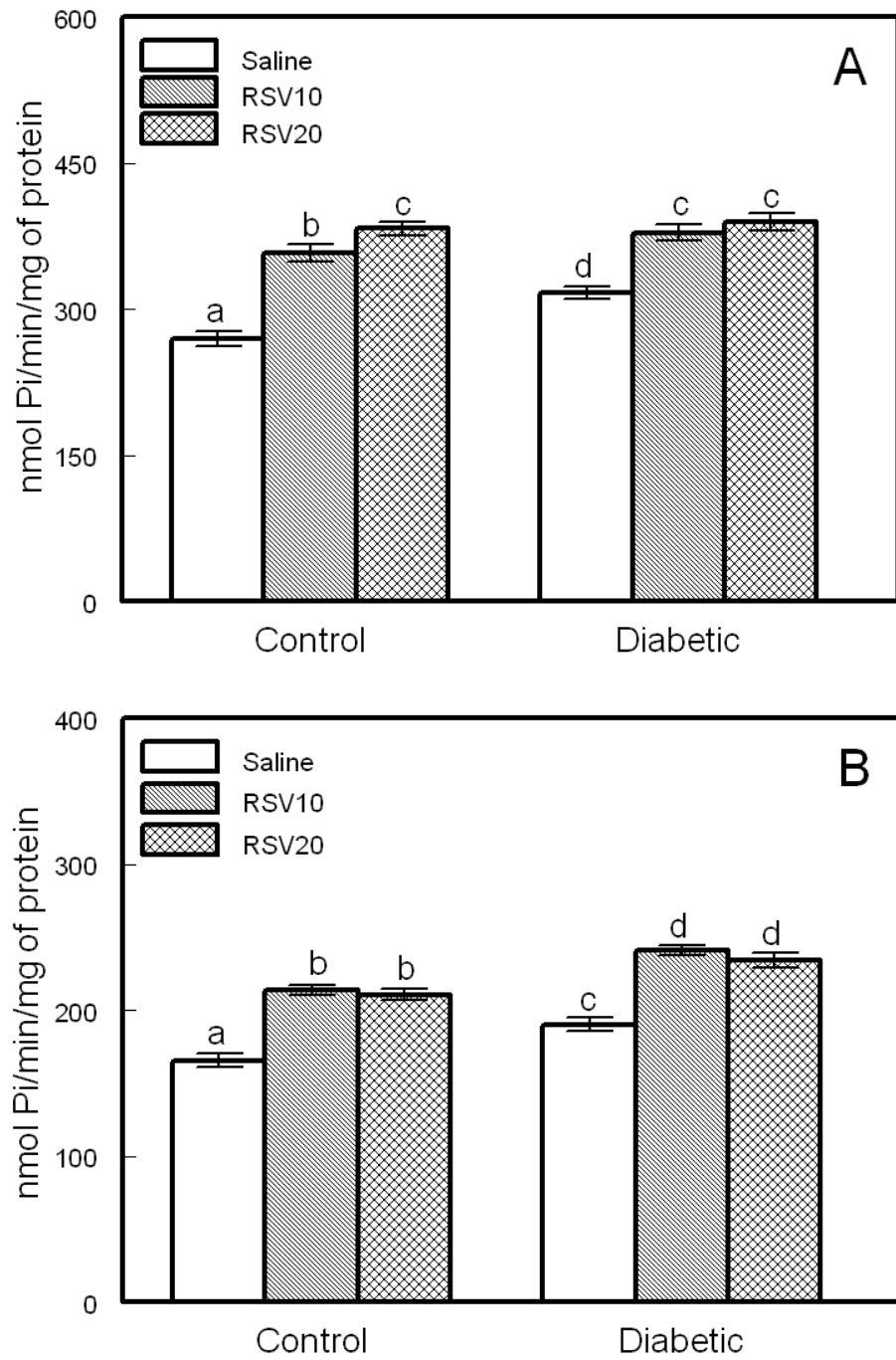
Fig. 1. NTPDase activity in cerebral cortex synaptosomes from STZ-induced diabetic rats treated with resveratrol using ATP (1A) and ADP (1B) as substrate (nmol Pi/ min/mg of protein). Bars represent means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$; $n=8$).

Fig. 2. 5'-nucleotidase activity in cortex cerebral synaptosomes from STZ-induced diabetic rats treated with resveratrol using AMP as substrate (nmol Pi/ min/mg of protein). Bars represent means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$, $n=8$).

Fig. 3. AChE activity in cerebral cortex synaptosomes from STZ-induced diabetic rats treated with resveratrol ($\mu\text{mol AcSCh/h/mg protein}$). Bars represent means \pm SEM. Groups with different letters are statistically different ($P < 0.05$; $n=6-8$).

Table 1 Body weight and blood glucose levels of STZ-induced diabetic rats and those treated with resveratrol at the end of the experiment.

| Groups | Body weight (g) | Glucose (mg/dL) |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control/saline | 284 ± 8.15 ^a | 111 ± 11.19 ^a |
| Control/RV 10 mg/kg | 269 ± 9.40 ^a | 110 ± 5.87 ^a |
| Control/RV 20 mg/kg | 261 ± 4.68 ^a | 104 ± 14.27 ^a |
| Diabetic /saline | 189 ± 15.44 ^b | 452 ± 51.26 ^b |
| Diabetic/RV 10 mg/kg | 202 ± 17.47 ^b | 460 ± 40.24 ^b |
| Diabetic/ RV 20 mg/kg | 202 ± 11.41 ^b | 418 ± 49.52 ^b |

**Fig.1**

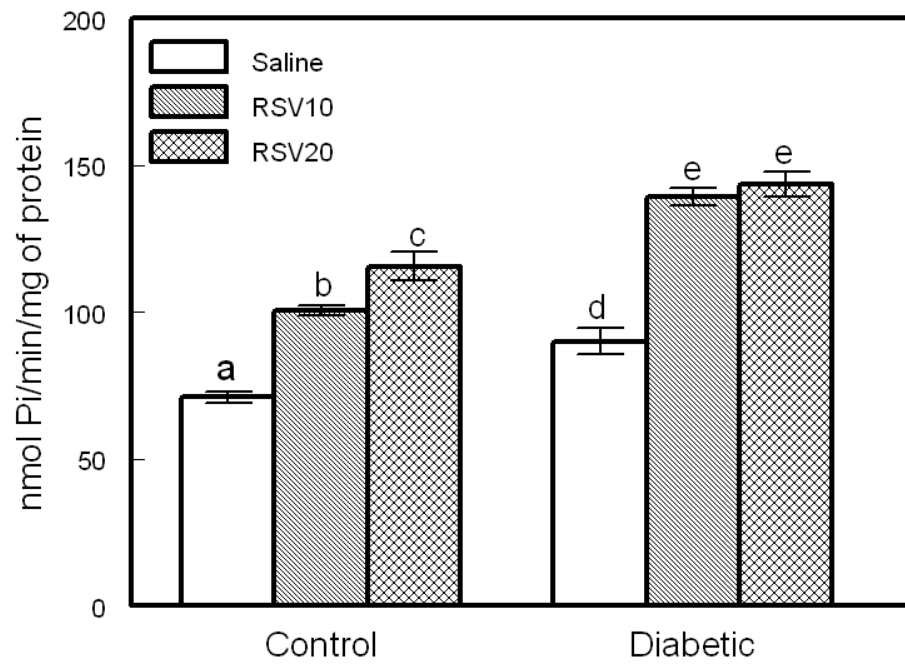


Fig. 2

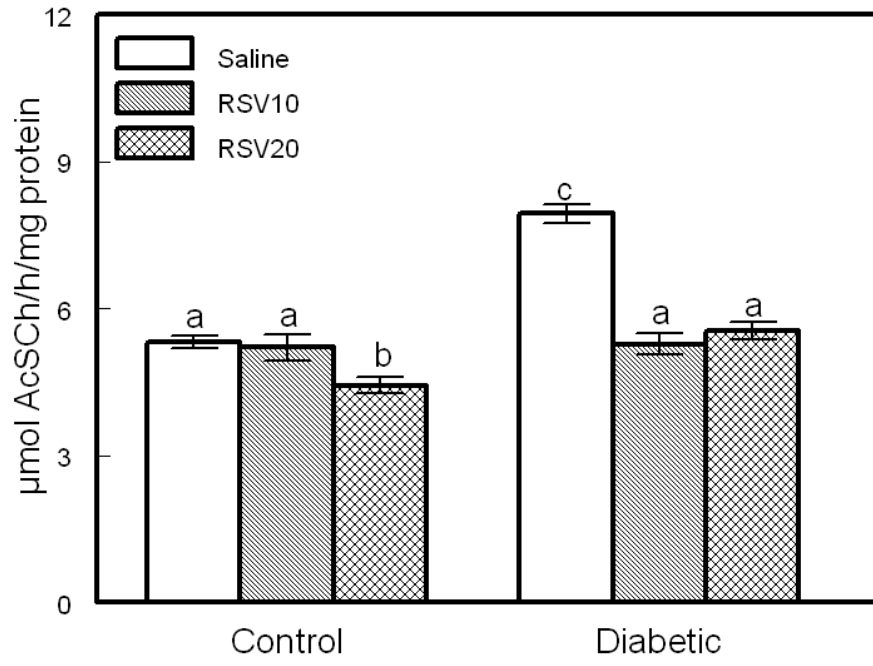


Fig. 3

4. DISCUSSÃO

O DM, tanto em humanos quanto em modelos animais de diabetes, causa uma série de alterações neurofisiológicas, neuroquímicas e estruturais no SNC (BIESSELS et al, 2008). Além disso, o diabetes está associado com disfunções cognitivas e com um risco aumentado de demência. Em adição, compostos polifenólicos, como o resveratrol, tem recebido considerável atenção já que tem demonstrado efeitos benéficos na prevenção e no tratamento de complicações cerebrais decorrentes do estado diabético (BASTIANETTO & QUIRION, 2002; ARTS & HOLLMAN, 2005). No entanto, estudos relacionando os efeitos do resveratrol com a atividade das enzimas NTPDase, ecto-5'-nucleotidase e AChE em encéfalo de ratos diabéticos induzidos com STZ, não foram encontrados na literatura.

Vários estudos, incluindo trabalhos realizados em nosso laboratório, têm demonstrado que as ectonucleotidases e as colinesterases possuem um importante papel no mecanismo de neurotransmissão; e alterações em suas atividades têm sido observadas em várias patologias sugerindo que estas enzimas podem ser um importante parâmetro fisiológico e patológico (LUNKES et al., 2004; SPANEVELLO et al., 2006, 2008; SCHETINGER et al., 2008; MAZZANTI et al., 2006; 2007; SCHMATZ et al., 2009).

Neste estudo foi observado um aumento na atividade da enzima AChE em todas as regiões encefálicas estudadas e em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos diabéticos. Similarmente a esses resultados KUHAD & CHOPRA (2007) também observaram um aumento na atividade desta enzima em soro e no córtex cerebral de ratos diabéticos. A ativação da AChE leva a rápida degradação da ACh e uma baixa estimulação dos receptores causando efeitos indesejáveis nas funções cognitivas (TÕUGU & KEVASTERA, 1996; SOREQ & SEIDMAN, 2001). Por outro lado, um aumento na atividade da AChE leva a uma redução na eficiência da neurotransmissão colinérgica devido ao decréscimo nos níveis de ACh na fenda sináptica, contribuindo assim para um progressivo prejuízo cognitivo e outras disfunções neurológicas vistas em pacientes diabéticos.

Outro aspecto a ser discutido é que a AChE é um importante componente das membranas biológicas, contribuindo assim para a integridade das mesma. É bem conhecido que o estado diabético causa um aumento na peroxidação lipídica das

membranas cerebrais o que pode ser um fator decisivo na modificação do estado conformacional da molécula de AChE e pode estar relacionado com alterações na atividade desta enzima no estado diabético (DAS et al., 2001; ALDUNATE et al., 2004). Baseado nestas observações pode-se sugerir que a ativação da AChE encontrada em ratos diabéticos neste estudo pode estar associada ao processo de estresse oxidativo nas diferentes regiões encefálicas no DM.

Neste estudo, o tratamento com resveratrol nas doses de 10 e 20 mg/Kg foi capaz de prevenir o aumento na atividade da AChE em todas as estruturas encefálicas avaliadas e em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos diabéticos. Estes resultados são similares aos encontrados em estudos com outros antioxidantes, como a vitamina E (TUZK & BAYDAS, 2006), o licopeno (KUHAD et al., 2008) e o curcumim (KUHAD & CHOPRA, 2007) que também demonstraram prevenir disfunções colinérgicas em ratos diabéticos. Neste contexto, pode-se sugerir que as propriedades antioxidantes do resveratrol podem ser responsáveis por prevenir disfunções colinérgicas em ratos diabéticos. De fato, vários estudos têm demonstrado que o resveratrol protege contra o estresse oxidativo, diminuindo a peroxidação lipídica das membranas e aumentando a capacidade antioxidante no cérebro de animais diabéticos (ATES et al., 2005; KUMAR et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007).

Outro importante dado observado neste trabalho é que o resveratrol per se (10 and 20 mg/kg) inibiu a atividade da AChE em córtex cerebral, hipocampo e estriado e também em sinaptossomas de córtex cerebral que são estruturas ricas em projeções colinérgicas. Um decréscimo na atividade da AChE leva a um aumento dos níveis de ACh na fenda sináptica melhorando as funções colinérgicas, tais como aprendizagem e memória sugerindo dessa forma que o resveratrol pode interagir com a neurotransmissão colinérgica.

Em relação à atividade da AChE no sangue os resultados encontrados foram similares aos obtidos nas regiões cerebrais. De fato, os dados de correlação da AChE de córtex cerebral com a AChE de sangue demonstrou um comportamento similar na atividade destas enzimas. Corroborando com estes resultados foi reportado por THIERMANN et al (2005) que a AChE sangüínea possui propriedades funcionais similares com a AChE do SNC e assim pode refletir seu estado com a AChE da fenda sináptica. Neste contexto, pode-se sugerir que a atividade da AChE sangüínea pode ser um bom marcador periférico para estudar disfunções

neurológicas, pois permite avaliar através de métodos mais acessíveis a ação desta enzima no SNC.

Tendo em vista os prejuízos nas funções cognitivas observados no estado diabético, neste trabalho também foi investigado o efeito do resveratrol na memória e aprendizagem através da tarefa de esquiva inibitória em ratos diabéticos. Foi observado um decréscimo na latência de ratos diabéticos na tarefa de esquiva inibitória sugerindo prejuízos na aprendizagem e memória destes animais. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que também tem demonstrado danos cognitivos no DM induzido com STZ em outras tarefas comportamentais como o labirinto aquático de Morris.(BIESSEL & GISPEN, 2005; KUHAD et al., 2008). Assim, pode-se sugerir que o aumento na atividade da AChE observado neste estudo, pode ser um dos mecanismos envolvidos nos prejuízos da memória na tarefa da esquiva inibitória bem como em outros testes comportamentais. Porém, quando ratos diabéticos foram submetidos ao tratamento com resveratrol a latência de descida na tarefa de esquiva inibitória foi similar àquela encontrada em ratos controles. Estes resultados indicam que o tratamento com resveratrol foi capaz de prevenir prejuízos na memória induzidos pela hiperglicemia diabética.

Também foi verificado o comportamento locomotor imediatamente após a seção de teste da esquiva inibitória a fim de identificar qualquer disfunção motora, que poderia influenciar o desempenho na esquiva inibitória. Os resultados demonstraram que a atividade locomotora nos grupos diabético e diabético tratado com resveratrol não afetou o número de cruzamentos e a habituação na seção de campo aberto. Estes dados excluem a possibilidade que a atividade locomotora possa ter contribuído para as latências de descida na tarefa de esquiva inibitória em ratos diabéticos e também no tratamento com resveratrol.

Em relação às ectonucleotidases, foi encontrado um aumento na atividade da NTPDase e ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos diabéticos. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios do nosso grupo, que também encontraram um aumento na hidrólise do ATP, ADP e AMP em sinaptossomas de ratos diabéticos experimentalmente induzidos com aloxano (LUNKES et al., 2004) sugerindo que a neurotransmissão purinérgica pode estar alterada no estado diabético.

O ATP é considerado um importante neurotransmissor excitatório e um neuromodulador do SNC (RATHBONE et al., 2006). Entretanto, tem sido

demonstrado que na injúria cerebral o ATP é liberado em grandes quantidades promovendo um aumento nos níveis de cálcio intracelular que pode causar significativo dano nos tecidos. Por outro lado, a adenosina, produto de hidrólise do ATP, é uma importante molécula na neuromodulação, na regulação homeostática e na neuroproteção do SNC (CUNHA, 2001; DUNWIDDIE & MASINO, 2001; BIESSELS et al., 2002). Neste contexto, pode-se sugerir que o aumento na atividade da NTPDase e 5'-nucleotidase em sinaptossomas de ratos diabéticos, pode ser relatado como uma importante capacidade adaptativa da via das ectonucleotidases, que ocorre com objetivo de terminar a função do ATP extracelular, incluindo seus efeitos citotóxicos, e produzir adenosina, um composto neuroprotetor.

Quando ratos diabéticos foram tratados com resveratrol (10 e 20 mg/Kg) um aumento mais acentuado na atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase foi observado. Estes resultados demonstram que a modulação destas enzimas, causada pelo resveratrol, tem um efeito benéfico no estado diabético, já que o aumento na hidrólise do ATP, ADP e AMP contribui para o aumento dos níveis de adenosina, a qual pode proteger o SNC das complicações neurológicas causadas pelo diabetes.

Um importante dado observado neste estudo é que o resveratrol per se também provocou um marcado aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP em sinaptossomas de córtex cerebral. Estes resultados sugerem que o resveratrol tanto em condições patológicas quanto em condições saudáveis promove um aumento na atividade da NTPDase e da ecto-5'-nucleotidase e conseqüentemente nos níveis do nucleosídeo adenosina o qual possui uma série de efeitos benéficos no SNC. Dessa forma, pode-se sugerir que um dos mecanismos pelos quais o resveratrol exerce seus efeitos neuroprotetores é através da modulação da hidrólise dos nucleotídeos de adenina pela cascata de ectonucleotidases presente no córtex cerebral.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o diabetes está associado com alterações na neurotransmissão colinérgica e purinérgica. O tratamento com resveratrol preveniu o aumento na atividade da AChE e conseqüentemente a disfunção na memória observados em ratos diabéticos, demonstrando que este composto pode modular a neurotransmissão colinérgica e conseqüentemente melhorar a cognição. Além disso, o tratamento com resveratrol foi capaz de modular a hidrólise dos nucleotídeos de adenina e da adenosina, podendo contribuir para a prevenção de disfunções neurológicas no DM. Assim,

pode-se sugerir que o resveratrol é um composto natural promissor que tem importantes efeitos neuroprotetores e deve ser investigado em estudos futuros com a intenção de encontrar a melhor terapia para beneficiar pacientes diabéticos com disfunções neurológicas.

5. CONCLUSÕES

- A atividade da AChE aumentou em sinaptossomas de córtex cerebral e em homogeneizados de córtex cerebral, estriado, hipocampo, cerebelo e hipotálamo de ratos diabéticos. O tratamento com resveratrol preveniu este aumento sugerindo que o resveratrol pode interagir com a neurotransmissão colinérgica.
- A atividade da AChE no sangue aumentou em ratos diabéticos de forma similar as estruturais encefálicas. O tratamento com resveratrol preveniu este aumento sugerindo que este composto interage com a AChE sangüínea de maneira similiar com a AChE do SNC.
- Um aumento na latência na tarefa da esquiva inibitória foi observada em ratos diabéticos e o tratamento com resveratrol preveniu este aumento sugerindo que este composto é capaz de melhorar a memória. Nenhuma alteração na tarefa de campo aberto foi observada entre os grupos, sugerindo que o nem o diabetes e nem o resveratrol causam disfunções motoras que poderiam influenciar nas latências da tarefa da esquiva inibitória.
- A atividade das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase aumentou em ratos diabéticos, indicando que a neurotransmissão purinérgica está alterada no estado diabético. O tratamento com resveratrol potencializou a ativação da NTPDase e da 5'-nucleotidase indicando que este composto foi capaz de modular a hidrólise dos nucleotídeos de adenina, o que pode contribuir para o controle da sinalização purinérgica.

6. REFERÊNCIAS

ALDUNATE, R.; CASAR, J.C.; BRANDAN, E. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**, v. 47, p. 96-104, 2004.

ALMEIDA, L.M.; LEITE, M.C.; THOMAZI, A.P.; Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. **Archives Biochemica Biophysica**, v. 480, p. 27-32, 2008.

AGRESTI, C.; MEOMARTINI, M.E.; AMADIO, S.; AMBROSINI, E.; VOLONTÉ, C.; ALOISI, F.; VISENTIN, S. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. **Brain Research Reviews**, v. 48, p.157-165, 2005.

AGTERESCH, H.J; DAGNELIE, P.C; VAN DEN BERG, J.W. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. **Drugs**, v. 58, p. 211–232, 1999.

ANEKONDA, T.S. Resveratrol - A boon for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Reviews**, v. 52, p. 316-326, 2006.

ARAÚJO, M.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p.421-426, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care for diabetes. **Diabetes Care**, v.17, p.1514–1522, 2007.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p.12- 20, 2005.

ATES, O.; CAYLI, S.R.; YUCEL, N.; ALTINOZ, E.; KOCAK, A.; DURAK, M.A.; TURKOZ, Y.; YOLOGLU, S.; Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Clinical Neuroscience**, v. 14, p. 256-260, 2005.

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

BALZ, D.; WYSE, A.T.; MORSCH, V.M.; SILVA, A.C.; VIEIRA, V.L.; MORSCH, A.L.; SCHETINGER, M.R. In vitro effects of image-arginine and guanidino compounds on NTPDase1 and 5'-nucleotidase activities from rat brain synaptosomes. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.21, p.75-82, 2003.

BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. **Neurobiology Aging**, v. 23, p. 891–897, 2002.

BATTASTINI, A.M.O.; ROCHA, J.B.T.; BARCELLOS, C.K.; DIAS, R.; SARKIS, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochemical Research**, v.16, p.1303-1310, 1991.

BIESSELS, G.J.; HEIDE, L.P.; KAMAL, A, A. Ageing and diabetes: implications for brain function. **European Journal Pharmacology**, v. 441, p.1-14, 2002a.

BIESSELS, G.J.; LAAK, M.P.; HAMERS, F.P.T.; GISPEN, W.H. Neuronal Ca²⁺ dysregulation in diabetes mellitus. **European Journal Pharmacology**, v. 447, p. 201-209, 2002b.

BIESSELS, G.J.; GISPEN, W.H. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? **Neurobiology Aging**, v. 26, p. 36–41, 2005.

BIESSELS, G.J.; DEARY, I. J.; RYAN, C. M. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. **Lancet Neurology**, v.7, p. 184–90, 2008.

BRADAMANTE, S.; VILLA, A. Cardiovascular Protective Effects of Resveratrol. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22(3), p.169-188, 2003.

BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; PICCININI, F.; BERTELLI, A.A.E.; DE JONGE, R.; BEEMSTER, P.; DE JONG, J.M. Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric oxide- and adenosine-mediated mechanism. **European Journal Pharmacology**, v. 465(1-2), p.115–23, 2004.

BRANDS, A.M.; BIESSELS, G.J.; KAPPELLE, L.J.; DE HAAN, E.H.; DE VALK, H.W.; ALGRA, A.; KESSELS, R.P.C. Cognitive functioning and brain MR1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: a comparative study. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 23, p. 343-350, 2007.

BRAUN, A.P.; SCHULMAN, H. The Multifunctional Calcium/Calmodulin-Dependent rotein Kinase: From Form to Function. **Annual Reviews in Physiology**, v.57, p. 417-445, 1995.

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

BONAN, C.D.; SCHETINGER, M.R.C.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, v.52, p. 57-65, 2001.

BUDDEBERG, B.; KERSCHENSTEINER, M.; MERKLER, D.; STADELMANN, C.; SCHWAB, M. Behavioral testing strategies in a localized animal model of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.153, p.158-170, 2004.
CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v. 21, p. 294-299, 1998.

CAMERON,N.E.; EATON, S.E.M.; COTTER, M.A.; TESFAYE, S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Diabetologia**, v. 44, p. 1450-1458, 2001.

CHACON, M.A., REYES, A.E., INESTROSA, N.C. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 15, p. 87:1, 2003.

CHEN, C,Y; JANG, J.H; LI, M.H; SURH, Y.J. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331(4), p. 993-1000, 2005.

CICARRELLI, R.; BALLERINI, P.; SABATINO, G.; RATHBONE, M.; D'ONOFRIO, M.; CACIAGLI, F.; IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine - mediated reparative processes in the brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.19, p.395-414, 2001.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.C.; JORNS, A.; LENZEN, S. Mechanisms of: Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, p.97-107, 2005.

COKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 28, p. 54-61, 2003.

CRYER, P.E; FISHER, J.N.; SHAMOON, H. Hypoglicemia. **Diabetes Care**, v. 17, p. 734-755, 1994.

CUNHA, R.; RIBEIRO, J.A. ATP as a presynaptic modulator. **Life Sciences**, v. 68, p.119-137, 2000.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v.38, p.107 -125, 2001.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Science**, v. 68, p. 1545-55, 2001.

DAY, T.; GREENFIELD, S. A. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 111, p. 649-656, 2002.

DE LORENZO, S.; VEGGETTI, M.; MUCHNIK, S.; LOSAVIO, A. Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. **Neuroscience**, v. 142, p. 71-85, 2006.

DESCARIES, L.; GISIGER, V.; STERIADE, M. Diffuse transmission by acetilcholine in CNS. **Progress in neurobiology**, v. 53, p. 603-6025, 1997.

DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 20-33, 2002.

DINSMOR, R. The history of Diabetes. C. F. K. Magazine Fil,1996. (Informação disponível na Internet na página). <http://www.jdf.org/kids/searchforacure/2000/05/history.html>.

DONG, Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523-524, p.145-150, 2003.

DONNELLY, L.E.; NEWTON, R.; KENNEDY, G.E.; FENWICK, P.S.; LEUNG, R.H.; ITO, K.; RUSSELL, R.E.; BARNES, P.J. Anti-inflammatory effects of resveratrol in

lung epithelial cells: molecular mechanisms. **American Journal of Physiology**, v. 287, p.774–783, 2004.

DORÉ, S. Unique Properties of Polyphenol Stilbenes in the Brain: More than Direct Antioxidant Actions; Gene/Protein Regulatory Activity **Neurosignals**, v. 14, p. 61-70, 2005.

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

EVANS, J.M.M; WANG, J.; MORRIS, A.D. Comparison of cardiovascular risk between patients with type 2 diabetes and those who had had a myocardial infarction: cross sectional and cohort studies. **British Medical Journal**, v. 324, p.1357, 2002.

FABRIS, S.; MOMO, F.; RAVAGNAN, G.; STEVANATO, R. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. **Biophysical Chemistry**, v. 135, p. 76-83, 2008.

FIELDS, D.; STEVENS, B. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. **Trends in Neurosciences**, v.23, p.625-633, 2000.

FRÉMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Science**, v. 64(26), p.2511–21, 1999.

FRÉMONT L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66(8), p. 663–673, 2000.

FUCHS, J.L. 5'-Nucleotidase activity increases in aging rat brain. **Neurobiology of Aging**, v. 12, p. 523-530, 1991.

GAO, Z.B.; CHEN, X.Q.; HU, G.Y. Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1111, p. 41-47, 2006.

GANNON, M.; Molecular genetic analysis of diabetes in mice. **Trends in Genetics**, v.17 (10), p. 23-28, 2001.

GHAREEB, D.A.; HUSSEN, H.M. Vanadium improves brain acetylcholinesterase activity on early stage alloxan-diabetic rats. **Neuroscience Letters**, v. 436, p. 44-47, 2008.

GIBB, A.; HALLIDAY, F. Fast purinergic transmission in the central nervous system. **The Neuroscience**, v.8, p.225-232, 1996.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 672-686, 1999.

HAN, Y.S.; ZHENG, W.H.; BASTIANETTO, S.; CHABOT, J.G.; QUIRON, R. Neuroprotective effects of resveratrol against b-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 141, p. 997-1005, 2004.

HERR, R.R.; EBLE, T.E.; BERGY, M.E.; JAHNKE, H.K. Isolation and characterization of streptozotocin. **Antibiotics annual**, v. 7, p.1959-1960, 1960.

HILLIS, W.E.; HART, J.H.; YAZAKI, Y. Polyphenols of Eucalyptus sideroxydon wood. **Phytochemistry**, v. 13, p.1591-5, 1974.

HOUNSOM, L.; HORROBIN, D.F.; TRITSCHLER, H.; CORDER, R. A lipoic acid-gamma linolenic acid conjugate is effective against multiple indices of experimental diabetic neuropathy. **Diabetologia**, v. 41, p. 50 -57, 1998.

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

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

ISLAS-ANDRADE, S.; MONSALVE, M.C.R.; PEÑA, J.E. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of the Two Models in Rats. **Acta Histochemica Et Cytochemica**, v. 33, p. 201-208, 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Correlation between the Pharmacology of Long-Term Potentiation and the Pharmacology of Memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 63, p. 19-32, 1995.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M. Short-and Long-Term Memory Are Differentially Regulated by Monoaminergic Systems in the Rat Brain. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 69, p. 219-224, 1998.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: **ArtMed**, p.95, 2002.

IZQUIERDO, I.; WELLMAN, C.L.; A HOLMES. Brief Uncontrollable Stress Causes Dendritic Retraction in Infralimbic Cortex and Resistance to Fear Extinction in Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 26(21), p. 5733-5738, 2006.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. **Blood**, v.6, p. 2157-2162, 2000.

KHANDKAR, M.A. Alloxan-diabetes alters kinetic properties of membrane-bound form, but not of the soluble form, of acetylcholinesterase in rat brain. **Biochemical Journal**, v. 307, p. 647-649, 1995.

KIM, Y.A.; LIM, S.Y.; RHEE, S.H.; PARK, K.Y.; KIM, C.H.; CHOI, B.T.; LEE, S.J.; PARK, Y.M.; CHOI, Y.H. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. **International journal of molecular medicine**, v. 17(6), p.1069-75, 2006.

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

KUHAD, A.; CHOPRA, K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. **European Journal Pharmacology**, v. 576, p. 34-42, 2007.

KUHAD, A., SETHI, R., CHOPRA, K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. **Life Science**, v. 83, p.128-134, 2008.

KUMAR, A.; KAUNDAL, R.K.; IYER, S.; SHARMA, S.S. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Science*, v. 80(13), p. 1236-1244, 2007.

JANNIN, B.; MENZEL, M.; BERLOT, J.P.; DELMAS, D.; LANÇON, A. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 1113-1118, 2004.

JORNS, A.; TIEDGE, M.; LENZEN, S.; MUNDAY, R.; Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1300-1304, 2002.

LANÇON, A.; DELMAS, D.; OSMAN, H.; THÉNOT, J.P.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. **Biochemical Biophysical Research Commune**, v. 316(4), p. 1132–7, 2004.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R.J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological plant pathology**, v. 9, p. 77–86, 1976.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal Neurochemical**, v. 79, p. 463–484, 2001.

LEONARD, S.S.; XIA, C.; JIANG, B.H.; STINEFELT, B.; KLANFORF, H.; HARRIS, G.K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p.1017–1026, 2003.

LI, Y.; LIU, J.; LIU, X.; XING, K.; WANG, Y.; LI, F.; YAO, L. Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated akt and caspase⁹. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, 181-192, 2006.

LING, K.K.Y.; SIOW, N.L.; CHOI, R.C.Y.; TSIM, K.W.K. ATP potentiates the formation of AChR aggregate in the co-culture of NG108-15 cells with C2C12 myotubes. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2469-2474, 2005.

LOPEZ-VELEZ, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 233–244, 2003.

LUNKES, G.I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V.; MAZZANTI, C.M.; SCHETINGER, M.R.C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Trombosis Research**, v.109, p.189-194, 2003.

LUNKES, G.; LUNKES, D.; MORSCH, V.; MAZZANTI, C.; MORSCH, A.; MIRON, V.; SCHETINGER, M. R.C. NTPDase e 5'-nucleotidase activities in rats alloxan - induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.65, p.1-6, 2004.

MANSCHOT, S.M.; BIESSELS, J.G.; CAMERON, N.E.; COTTER, M.A.; KAMAL, A.; KAPPELLE, L.J.; GISPEN, W.H. Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats. **Brain Research**, v. 966, p. 274-282, 2003.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in neurobiology**, v. 41, p.31-91, 1993.

MAZZANTI, C.M.; SPANEVELLO, R.M.; PEREIRA, L.B.; GONÇALVES, J.F.; KAIZER, R.; CORRÊA, M.; AHMED, M.; MAZZANTI, A.; FESTUGATTO, R.; GRAÇA, D.L.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. **Neurochemical Research**, v, 31(8), p. 1027- 1032, 2006.

MENDES, J.D.; RAMOS, H.G. Animal models in diabetes research. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 4, p. 367-375, 1994.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience** v. 110, p. 627-639, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica. Diabetes mellitus. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, v. 16, p. 64, 2006.

MINKOSWSKI, O. Historical development of the theory of pancreatic diabetes (introduction and translation by R. Levine). **Diabetes**, v. 38, p. 1, 1989.

MOKNI, M.; ELKAHOUI, S.; LIMAM, F.; AMRI, M.; AOUANI, E. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemical Research**, v. 32, p. 981-987, 2007.

MORDES, J.P.; ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. **The American Journal of Medicine**, v.70, p. 353-360, 1981.

NETTO, C.A.; Hodges, H.; Sinden, J.D.; LePeillet, E.; Kershaw, T.; Sowinski, P.; Meldrum, B. S.; Gray, J.A. Foetal grafts from hippocampal regio superior alleviate ischaemic-induced behavioral deficits. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p.107-112, 1993.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney International**, v. 58, p. 26-30, 2000.

NUNES-TAVARES, A.; MATTA, N.; BATISTA, C.M. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, p. 1071-1079, 2002.

OLAS, B.; WACHOWIC, B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. **Platelets**, v. 16, p. 251 – 260, 2005.

OKAWARA, M.; KATSUKI, H.; KURIMOTO, E.; SHIBATA, H. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 550-560, 2007.

PARKER, J.A.; ARANGO, M.; ABDERRAHMANE, S.; LAMBERT, E.; Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. **Nature Genetics**, v. 37, p. 349 – 350, 2005.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. 2nd, **Oxford**, p 432-482, 2001.

PAXINOS, G. **The rat nervous System. Forebrain and midbrain**, cap. 14, Academic press Australia, p. 487-508, 1985.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, F. V.; MELLO, M. C. GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry Internacional**, v. 41, p. 291-299, 2002.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.; LAMANTIA, A.; MCNAMARA, J.; WILLIAMS, S. **Neurociências**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p.728.

RAND, J. D. Acetylcholine. Program in Molecular, Cell and Developmental Biology, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK 73104 USA, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (Ed). **Farmacologia**. Elsevier, Sao Paulo, Brasil, p. 674-695, 2004.

RATHBONE, M.; MIDDLEMISS, P.; GYSBERS, J.; ANDREW, C.; HERMAN, M.; REDD, J.; CICCARELLI, R.; IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in neurobiology**, v. 59, p. 663-690, 1999.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. D. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523–1526, 1992.

REOLON, G.K.; BRAGA, L.M; CAMASSOLA, M.; LUFT, T. Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua* $-/-$ mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. **Brain Research**, v. 1076, p. 225-230, 2006.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M.; MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Progress in Neurobiology**, v.68, p.377-392, 2003.

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

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research Review**, v. 658, p. 68-94, 2008.

SANCHEZ-CHAVEZ, G.; SALCEDA, R. Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina. **IUBMB Life**, v.49, p.283-287, 2000.

SARKIS, J.; BATTASTINI, A.; OLIVEIRA, E.; FRASSETO, S.; DIAS, F. ATP diphosphohydrolases: and overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 43, p.131-136, 1995.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature reviews**, v. 6, p. 48-56, 2005.

SCHETINGER, C.; BONAN, R.; SCHIERHOLT, A.; WEBBER, N.; EMANUELLI, T.; DIAS, R.; SARKIS, J. F.; NETTO, C. Nucleotide hydrolysis in rats submitted to global cerebral ischemia: A possible link between preconditioning and adenosine production. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 7, p. 281-286, 1998.

SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BONAN, C.; WYSE, A. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31(2), p.77-98, 2008.

SCHMATZ, R.; SCHETINGER, M.R.; SPANEVELLO, R.; MAZZANTI, C.M.; STEFANELLO, N.; MALDONADO, P.A.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; GIROTTO, E.; MORETTO, M.; MORSCH, V.M. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, In Press.

SCHNEDL, W.J.; FERBER, S.; JOHNSON, J.H.; NEWGARD, C.B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2- expressing cells. **Diabetes**, v. 43, p. 1326-33, 1994.

SCHOEN, S.W.; KREUTZBERG, G.W. Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. **Experimental Neurology**, v. 127, p. 106-118, 1994.

SHARMA, M.; GUPTA, Y.K. Chronic treatment with trans-resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Life Sciences**, v. 71, p. 2489-2498, 2002.

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

SIMA, A.A.F.; KAMIYA, H.; LIA, Z.G. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. **European Journal Pharmacology**, v. 490, p.187-197, 2004.

SINGER, J.B; HILL, A.E.; NADEAU, J.H.; LANDER, E.S. Mapping Quantitative Trait Loci for Anxiety in Chromosome Substitution Strains of Mice. **Genetics**, v. 169, p. 855-862, 2005.

SOLEAS, G.J; GOLDBERG, D.M. Influences of viticultural and oenological factors on changes in cis- and trans-resveratrol in commercial wines. **Australian journal of grape and wine research**, v. 6(2), p.107–22, 1995.

SOLEAS, G.J; DIAMANDIS, E.P; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30(2), p.91–113, 1997.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for na old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SOUTO , A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.;CONZ, A. GOBBI, K. Determination of trans-Resveratrol Concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 441-445, 2001.

SPANEVERELLO, R.M.; MAZZANTI, C.; KAIZER, R.; ZANIN, R.; CARGNELUTTI, D.; HANNEL, L.; CORREA, M.; MAZZANTI, A.; FESTUGATTO, R.; GRAÇA, D.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . **Neurochemical Research**, v. 31, p. 455-462, 2006.

SPANEVERELLO, R.M.; WYSE, A.T.; MAZZANTI, C.M.; SCHMATZ, R.; STEFANELLO, N.; GONÇALVES, J.F.; BAGATINI, M.; BATTISTI, V.; MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R. Effects in vitro of guanidinoacetate on adenine nucleotide hydrolysis and acetylcholinesterase activity in tissues from adult rats. **Neurochemical Research** v. 33(6), p. 1129-37, 2008.

SPERLÁGH, B.; VIZI, E. Neuronal synthesis, storage and release of ATP. **The Neuroscience**, v.8, p.175-186, 1996.

STEVENS, B.; PORTA, S.; HAAK, L.; GALLO, V.; FIELDS, D. Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. **Neuron**, v.36, p.855-868, 2002.

STEWART, J.R.; CHRISTMAN, K.L.; O'BRIAN, C.A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase d but not protein kinase c isozyme autophosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1355-1359, 2000.

STRACHAN, M.W.J.; FRIER, B.M.; DEARY, I.J. Type 2 diabetes and cognitive impairment. **Diabetic Medical**, v. 20, p.1-2. 2003.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo Californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, p. 872-879, 1991.

SZEWCZUK, L.M.; FORTI, L.; STIVALA, L.A.; PENNING, T.M. Resveratrol is a Peroxidase-mediated Inactivator of COX-1 but Not COX-2. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p. 22727-22737, 2004.

TACHIKAWA, H.; IGARASHI, M.; NISHIHARA, J.; ISHIBASHI, T. Ab initio model study on acetylcholinesterase catalysis: potential energy surfaces of the protontransfer reactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 79, p. 11–23, 2005.

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

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R.W.; Molinoff, P. B. (Ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p. 214-242, 1999.

THIERMANN, H.; SZINICZ, L.; EYER, P.; ZILKER, T.; WOREK F. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. **Chemical Biological Interaction**, v. 157-158, p. 345-347, 2005.

THIRUNAVUKKARASU, M.; PENUMATHSA, S.V; KONERU, S. Resveratrol mediated cardioprotection in STZ-induced diabetic rat model. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.40, p. 881-887, 2006.

TÖUGU, V.; KESVATERA, T. Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1298, p.12-30, 1996.

TUZCU, M.; BAYDAS, G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. **European Journal Pharmacology**, v. 537, p.106-110, 2006.

VERICEL, E.; JANUEL, C.; CARRERAS, M.; MOULIN, P. Diabetic Patients without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status. **Diabetes**, v. 53, p.1046-1051, 2004.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.; MERILLON, J.; TEISSEDRE, P. Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, β -viniferin) in Brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.49, p.589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, v.32, p.421-425, 1998.

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

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

ZIGANSHIN, A.U.; HOYLE, C.; BURNSTOCK, G. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. **Drug Developmental Research**, v. 32, p.134-146, 1994.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M.H.; OATIS, J.E.; WALLE, U.K. High absorption and very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 9, p. 1887-1893, 2004.

WANG T.; GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. **Brain Research**, v. 790, p. 318-322, 1998.

WANG, Z.; HUANG, Y.; ZOU, J.; CAO, K.; XU, Y.; WU, J.M. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. **Int J Mol Med** v. 9, p. 77-9, 2002.

WANG, Q.; YU, S.; SIMONYI, A.; ROTTINGHAUS, G.; SUN, G.Y.; SUN, A.Y. Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. **Neurochemical Research**, v. 29, p. 2105-2112, 2004.

WILD, S.; BCHIR, M.B.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; PHD, SICREE, R.; KING, M.;
Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030.
Diabetes Care, v. 27, p.1047-1053, 2004.

WILSON JD, FOSTER DW, KRONENBER HM, LARSEN PR. Williams Textbook of
endocrinology. 9^a ed. Philadelphia: WB Saunders Co; p. 1018-1080, 1998.

WINK, M.; BRAGANHOL, E.; TAMAJUSUKU, A.; CASALI, E.; KARL, J.; BARRETO-
CHAVES, M.; SARKIS, J.J.; BATTASTINI, A. Extracellular adenine nucleotides
metabolism in astrocytes cultures from different brain regions. **Neurochemistry
International**, v.43, p.621-628, 2003.

WOLTER, F.; ULRICH, S.; STEIN, J. Molecular mechanisms of the chemoprotective
effects of resveratrol and its analogues in colorectal cancer: key role of polyamines.
Journal of Nutrition, v.134, p.3219–3222, 2004.