

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**EFEITO DA RUTINA SOBRE A ATIVIDADE DA  
ADENOSINA DEAMINASE EM RATOS DIABÉTICOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Eduardo Ottobelli Chielle**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

# **EFEITO DA RUTINA SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE EM RATOS DIABÉTICOS**

**Eduardo Ottobelli Chielle**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do grau  
de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador(a): Profa. Dra. Maria Beatriz Moretto**  
**Co-orientador(a): Profa. Dra. Marli Matiko A. Campos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a dissertação de mestrado

**EFEITO DA RUTINA SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA  
DEAMINASE EM RATOS DIABÉTICOS**

elaborado por  
Eduardo Ottobelli Chielle

como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Maria Beatriz Moretto, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Melânia Palermo Manfron Dra. (UFSM)**

**Paula Augusti Dra. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 12 de julho de 2012.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Cerenita e Telmo, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho meu crescimento pessoal e profissional. A minha irmã Ana Paula pelo apoio, carinho e alegria.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força interior para superar as dificuldades, me amparar nos momentos difíceis e me proporcionar esta trajetória, me mostrando o caminho nas horas incertas e me suprindo em todas as minhas necessidades.

A minha família pai, mãe, irmã os quais amo com todas as minhas forças. Obrigado por estarem sempre ao meu lado me incentivando e apoiando em minhas escolhas, sem vocês minha felicidade não seria completa.

As minhas alunas Sara, Aline, Filomena, Nathana, Eliete, Luciane, Daniela, Lediane por me ajudarem no desenvolvimento do trabalho, vocês foram muito importantes.

As colegas do laboratório 1207 Gabriela, Karine, Paula, Lariane, Pricila pela imensa contribuição que me forneceram na execução deste projeto, sem vocês não existiriam resultados.

A Eliseu pela amizade, apoio incondicional e ajuda em todos os momentos, pelas conversas, descontração, caronas, fostes um grande chofer e uma pessoa muito especial.

Aos demais amigos que fazem parte da minha vida, proporcionando momentos de companhia, descontração e alegria em jantares, churrascos, festas.

Aos colegas de trabalho Jacson e Eleandra que sempre se dispuseram a ajudar sem medir esforços.

A UNOESC por me apoiar e me liberar das minhas atividades para que eu pudesse cumprir a carga horária do mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e do Pós em Farmacologia pelos conhecimentos transmitidos.

A UFSM e ao PPGCF pela oportunidade de realizar um grande sonho.

Ao Paulo Ricardo, funcionário do PPGCF, pela colaboração, pela paciência, dedicação e disposição em ajudar.

A professora Maria Beatriz, que mesmo não me conhecendo aceitou-me como orientando dedicando seu tempo, seus conhecimentos, suas experiências para que eu conseguisse executar o projeto. A ti profe fica um muito obrigado

especial, pois fostes uma grande mestre conduzindo este trabalho com dedicação, empenho, me espelho em seus exemplos para conduzir meus trabalhos como professor e com teu apoio me encorajo para continuar esta caminhada.

Enfim, a todos que de uma forma outra contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho deixo do fundo do meu coração o meu MUITO OBRIGADO.

Só existe dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.

(Dalai Lama)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **EFEITO DA RUTINA SOBRE A ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE EM RATOS DIABÉTICOS**

AUTOR: Eduardo Ottobelli Chielle

ORIENTADORA: Maria Beatriz Moretto

LOCAL E DATA DE DEFESA: Santa Maria, 12 de julho de 2012.

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma disfunção metabólica de múltipla etiologia caracterizado por hiperglicemia crônica resultante da deficiência da produção e/ou ação da insulina. Esse estado de hiperglicemia pode provocar uma série de complicações cardiovasculares, renais, neurológicas e oculares. A Adenosina deaminase (ADA) é uma importante enzima responsável por regular os níveis de adenosina (ado), um importante nucleosídeo componente do sistema purinérgico. Alterações na atividade da ADA têm sido demonstradas em várias doenças, incluindo o DM. A rutina (RT) é um flavonoide polifenólico abundante nos alimentos que exibe múltiplas atividades farmacológicas como atividade antibacteriana, antitumoral, vasodilatadora e hepatoprotetora. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da RT sobre a atividade da ADA sérica e tecidual e parâmetros bioquímicos em modelos de diabetes induzidos por estreptozotocina (STZ). O diabetes foi induzido através de injeção única intraperitoneal (i.p.) de 55 mg/kg de STZ. A RT (100 mg / kg / dia) e a glibenclamida (10mg/kg/dia) foram administradas durante 30 dias, com exceção dos grupos controles (não diabéticos e diabéticos). Seis grupos de ratos foram utilizados no estudo e agrupados com base nos níveis de glicose em jejum após a indução de diabetes. Os resultados demonstraram um aumento na atividade da ADA no soro e no fígado de ratos diabéticos, assim como das transaminases (AST, ALT),  $\gamma$ -glutamilttransferase ( $\gamma$ -GT) e glicose. A RT na concentração de 100 mg/kg foi capaz de reduzir a atividade sérica e em tecido hepático da ADA quando comparado com o controle. O efeito protetor da RT também foi observado sobre a atividade das enzimas ALT e  $\gamma$ -GT. Reduções significativas foram observadas no colesterol total e LDL-colesterol, bem como, na concentração sérica de glicose no grupo diabético tratado com RT. Os resultados sugerem que a RT pode melhorar a hiperglicemia e dislipidemia, restabelecer danos à função hepática, bem como é capaz de prevenir o aumento da atividade da ADA no soro e no fígado de ratos diabéticos tratados com este flavonoide.

**Palavras-chave:** Adenosina deaminase; Diabete *mellitus*; Estreptozotocina; Glicose; Rutina;



## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Graduation Program of Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### EFFECT OF RUTIN ON THE ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY IN DIABETIC RATS

AUTHOR: Eduardo Ottobelli Chielle

ADVISOR: Maria Beatriz Moretto

PLACE AND DATE OF DEFENSE: Santa Maria, July 12, 2012.

Diabetes *mellitus* (DM) is a metabolic disorder of multiple etiology characterized by chronic hyperglycemia resulting from deficiency of insulin production and/or action. This state of hyperglycemia may cause a variety of cardiovascular, renal, neurological and eye complications. Adenosine deaminase (ADA) is an important enzyme responsible for regulation the levels of adenosine (ado) an important component of the system purinergic nucleoside. Changes in ADA activity has been demonstrated in several diseases, including DM. The Rutin (RT) is an abundant polyphenolic flavonoid found in food that exhibits multiple pharmacological activities including antibacterial, antitumoural, vasodilator and hepatoprotective activities. The objective of this study was to investigate the effect of RT on the activity of ADA in serum, tissues and biochemical parameters in models of diabetes induced by streptozotocin (STZ). Diabetes was induced in rats by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). RT (100 mg/kg/day) and glibenclamide (10mg/kg/day) were administered for 30 days, except for control groups (non diabetic and diabetic). Six groups of rats were used in the study and grouped based on fasting blood glucose levels after diabetes induction. The results showed an increase in ADA activity in serum and liver of diabetic rats, like transaminases (AST, ALT),  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) and glucose. The RT at a concentration of 100 mg/kg was able to reduce the ADA activity in serum and liver tissue when compared with the diabetic control. The protective effect of RT was also observed increases the activity of enzymes ALT and  $\gamma$ -GT. Significant reductions were also observed in total cholesterol and LDL-cholesterol as well as in blood glucose levels in the diabetic group treated with RT. The results suggest that RT can improve hyperglycemia and hyperlipidemia, and restoring damaged liver function, as well as prevents the increase in ADA activity in serum and liver tissue on diabetic rats treated with this flavonoid.

**Keywords:** Adenosine deaminase. Diabetes *mellitus*. Glucose. Rutin. Streptozotocin.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – Adenosina deaminase  
Ado - Adenosina  
ADP - Adenosina difosfato  
AGEs - Produtos Avançados da Glicosilação não-enzimática  
AIDS - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
ALT - Alanina aminotransferase  
ATP - Adenosina trifosfato  
AST - Aspartato aminotransferase  
AVC - Acidente Vascular Cerebral  
CRE - Creatinina  
CT - Colesterol total  
DAG - Diacilglicerol  
DM - Diabetes *mellitus*  
DM2 - Diabetes *mellitus* Tipo 2  
DM1 - Diabetes *mellitus* Tipo 1  
DMID - Diabetes *mellitus* insulino dependente  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DPP-IV - Dipeptidil Peptidase IV  
ET-1 - Endotélio 1  
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio  
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio  
GLP-1 - Glucagon-like peptídeo 1  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
HDL-c - Lipoproteína de alta densidade  
IAM - Infarto Agudo do Miocárdio  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-6 - Interleucina 6  
kDa - Quilodaltons  
LADA - Diabetes Auto-imune Latente em Adultos  
LDL-c - Lipoproteína de baixa densidade  
NADH:NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF $\kappa$ B - Fator Nuclear Kappa Beta

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Oxigênio

<sup>•</sup>OH - Radical Hidroxila

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAI-1 - Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1

PCR - Proteína C Reativa

PKC - Proteína quinase C

RAGES - Produtos Avançados da Glicosilação não-enzimática

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

STZ - Estreptozotocina

TFN- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa

TG - Triglicerídeos

TGF- $\beta$  - Fator Transformador do Crescimento Beta

UDPGlcNAc - Uridina difosfato-N-acetil glucosamina

VEGF - Fator de Crescimento de Células derivadas do Endotélio

5'NT - 5'nucleotidase

$\gamma$ -GT - Gama-glutamilttransferase

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 -	Vias de produção, metabolismo e transporte de adenosina .....	27
Figura 2 -	Reações catalisadas pela ADA, tendo como substrato a adenosina (ado) e a 5'desoxiadenosina (d-ado) .....	28
Figura 3 -	A) Estrutura da ADA; B) Estrutura Tridimensional da enzima, com o sítio ativo no centro da estrutura, e as cadeias laterais polares e não polares em rosa e amarelo, respectivamente .....	29
Figura 4 -	Estrutura da estreptozotocina .....	31
Figura 5 -	Atuação da estreptozotocina nas células beta pancreáticas .....	32
Figura 6 -	Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonoides .....	34
Figura 7 -	Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonoides .....	35
Figura 8 -	Estrutura da rutina .....	37
Figura 9 -	Hidrólise da Rutina .....	38

### MANUSCRITO

Figure 1A -	ADA activity in serum .....	60
Figure 1B -	ADA activity in liver tissue .....	60

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para o diagnóstico de DM e seus estágios pré-clínicos .....	26
---	----

### MANUSCRITO

Table 1 - Changes in serum glucose levels during treatment .....	58
Table 2 - Changes body weight during treatment .....	58
Table 3 - Serum biochemical parameters of all experimental groups, after 30 days .....	59
Table 4 - ADA activity in Kidney and brain tissues .....	59

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral .....	20
2.2 Objetivos Específicos .....	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Diabetes <i>mellitus</i> .....</b>	<b>22</b>
3.1.1 Definição e histórico .....	22
3.1.2 Classificação do Diabetes <i>mellitus</i> .....	23
3.1.3 Fisiopatologia do Diabetes <i>mellitus</i> 1 .....	24
3.1.4 Diagnóstico clínico e laboratorial .....	25
<b>3.2 Sistema Purinérgico .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Adenosina Deaminase .....	28
<b>3.3 Diabetes Experimental .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Plantas Medicinais .....</b>	<b>33</b>
3.4.1 Flavonoides .....	34
3.4.2 Rutina .....	36
<b>4. MÉTODOS E RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1 MANUSCRITO .....	42
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>76</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação foi escrita sob a forma de manuscrito submetido à publicação. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito, representando as características deste trabalho.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica Food and Chemical Toxicology.





O Diabetes *mellitus* (DM) é uma enfermidade endócrino metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica tanto de jejum quanto pós-prandial decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. O DM apresenta uma variedade de alterações bioquímicas, mas a fundamental é a redução da entrada de glicose nas células e o aumento na liberação de glicose circulante pelo fígado, o que ocasiona a hiperglicemia, fator preponderante para o desenvolvimento das manifestações clínicas da doença como, acidose, retinopatia, nefropatia, alterações vasculares, dificuldade de cicatrização entre outros (ADA, 2006).

A prevalência do diabetes está aumentando e alcançando proporções epidêmicas, sendo um problema crescente de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existam em torno de 220 milhões de diabéticos no mundo e a projeção para 2030 indicam que esse número pode dobrar (WILD et al., 2004; WHO, 2009). O Brasil está entre os países com maior número absoluto de pessoas com diabetes ocupando o oitavo lugar no ranking mundial. Dados do final da década de 80 apontam uma prevalência de 7,6% na população de 30 a 69 anos de idade e dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas entre 12,1 e 13,5%. A faixa etária com maior prevalência é de 60-79 anos com 17,4%. Em campanha nacional realizada em 2001, envolvendo 20,7 milhões de pessoas com 40 anos ou mais, em 5.507 municípios, foram identificados 2,9 milhões de suspeitos de DM, o que corresponderia a uma prevalência de 14,66% na população testada. Neste estudo os três estados do Sul do país apresentaram a maior prevalência (19%), superando a média nacional. Além disso, o DM é responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade e um elevado custo econômico relacionado, em partes, às condições crônicas da doença (MALERBI et al., 1992; SBD, 2009).

No DM a inflamação é um fator preponderante para o desenvolvimento da aterosclerose, pois o tecido adiposo de pacientes obesos e especialmente com DM produzem em grande quantidade citocinas pró-inflamatórias as quais são preditoras de risco cardiovascular (ANTONIADES et al., 2007; HAJER et al., 2008). Além disso, dados recentes têm demonstrado que a atividade da Adenosina deaminase (ADA), enzima que catalisa a hidrólise da adenosina (ado) para inosina, apresenta atividade alterada em pacientes com DM2 e em modelos experimentais de diabetes, indicando

que a sinalização purinérgica pode estar alterada no estado diabético (DE BONA et al., 2010).

Nas últimas décadas, inúmeros compostos estão sendo pesquisados com o objetivo de atenuar os parâmetros bioquímicos e imunológicos alterados, bem como as complicações clínicas do diabetes. Os produtos naturais usados na medicina popular para tratar diabetes como, por exemplo, os flavonoides representam uma alternativa viável para o controle desta doença (GUERRA et al., 2009).

Dentre os flavonoides destaca-se a rutina (RT), um flavonol glicosídico extensamente encontrado na natureza, que tem demonstrado importante atividade sobre o metabolismo glicídico podendo inclusive exercer atividade hipoglicemiante por meio de ações extra – pancreáticas e independentes de insulina (GUERRA et al., 2009; FERNANDES et al., 2010).

Neste contexto, considerando que o DM pode desencadear várias alterações bioquímicas e que a RT é um flavonoide glicosídico amplamente encontrado na dieta alimentar humana, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da RT sobre a atividade da enzima ADA sérica e tecidual e sobre parâmetros bioquímicos em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) como uma proposta futura de princípio ativo capaz de prevenir e atenuar as complicações crônicas do DM.



## 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da RT ( $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ ) sobre a atividade da enzima ADA sérica e tecidual e sobre parâmetros bioquímicos de ratos com Diabetes *mellitus*, induzidos por STZ.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito da RT sobre atividade da ADA em amostras de soro, homogenato de fígado, rim e cérebro de animais diabéticos e controles.
- Determinar a influência da RT sobre perfil lipídico, marcadores renais, hepáticos, pancreático e níveis glicêmicos em amostras de soro.
- Relacionar o efeito da RT sobre a atividade da ADA com a atividade hipoglicemiante.



## 3.1 Diabetes

### 3.1.1 Definição e histórico

O DM caracteriza-se por um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos dos carboidratos, lipídios e proteínas culminando em um quadro de hiperglicemia a qual decorre da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos o que é considerado o fator de risco clássico para o desenvolvimento da doença e progressão de suas complicações cardiovasculares, renais, neurológicas e oculares (SBD, 2009).

Além da hiperglicemia marcante nesta patologia estão presentes também características como: glicosúria, poliúria, polidipsia, perda de peso mesmo na presença de polifagia, cetose, acidose e em casos mais extremos coma (OLIVEIRA, 2008).

O termo diabetes foi determinado pelo médico Areteu da Capadócia, no século II da era Cristã, nesta época este termo era utilizado para se referir ao símbolo mais chamativo da patologia que era a eliminação exagerada de água pelos rins, expressando que a água passava pelo organismo diabético sem se fixar a ele. Em 1679, Thomas Willis, realizou a descrição magistral do diabetes e desde então ficou reconhecida a sua sintomatologia como entidade clínica. Foi ele também que referiu o sabor doce a urina dos pacientes diabéticos estabelecendo o termo *Diabetes mellitus* (sabor de mel) (DINSMOR, 1996).

Dopson em 1775 identificou a presença de glicose na urina e a partir disso vários trabalhos experimentais relacionados ao metabolismo dos glicídios começaram a surgir, sendo que os pioneiros foram realizados por Claude Bernarde, em 1848, que descobriu o glicogênio hepático e promoveu o aparecimento de glicose na urina excitando os centros tubulares. Na metade do século XIX ficou estabelecida a importância da obesidade e do sedentarismo na origem do DM, isso foi determinado pelo grande clínico francês Bouchardat, o qual também traçou normas para o tratamento de diabéticos referindo-se a restrição de açúcar e diminuição do valor calórico das dietas (DIERETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

No ano de 1869, Langerhans descreveu as células das ilhotas do pâncreas, despertando interesse na descoberta do hormônio produzido por estas células. O que foi determinado por dois canadenses Banting e Best em 1921, os quais isolaram a insulina e demonstraram seu poder hipoglicemiante (MINKOWSKI, 1989). Esta grande descoberta do século XX, significou uma das maiores conquistas médicas, porque transformou as expectativas e a vida dos diabéticos e ampliou os horizontes no campo experimental e biológico para o estudo do diabetes e do metabolismo dos glicídios.

### 3.1.2 Classificação do diabetes

Na história natural do diabetes o grau de alteração da glicemia evolui geralmente em um processo silencioso desde um estado normoglicêmico, passando por alterações caracterizadas de pré-diabetes, como glicemia de jejum alterada e intolerância à glicose, até atingir valores hiperglicêmicos patológicos e condizentes com o diagnóstico. Esse processo ocorre em todos os tipos de diabetes, com diferença na intensidade e velocidade de eventos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

A Classificação atual do DM proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Associação Americana de Diabetes baseia-se na etiologia, sendo recomendadas quatro classes clínicas: Diabetes *mellitus* Tipo 1 (DM1), Diabetes *mellitus* Tipo 2 (DM2), Diabete *mellitus* Gestacional e outros tipos específicos de DM.

O DM1 caracteriza-se por ser insulino dependente, em virtude da deficiência das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, tanto pela produção como pela secreção de insulina, sofrendo ampla participação de fatores genéticos e ambientais. Na maioria dos casos a destruição das células beta é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM1. A taxa de destruição das células beta é variável, sendo, em geral, mais rápida em crianças. A forma lentamente progressiva ocorre nos adultos, sendo referida como, Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) (TODD et al., 1987; ERLICH et al., 2008). A maior prevalência é em crianças e jovens, sendo que, os sintomas aparecem antes

dos 14 anos de idade. Os pacientes apresentam sintomas agudos, hiperglicemia acentuada, forte tendência em desenvolver cetoacidose e atualmente este tipo representa 5 a 10% dos casos existentes (ADA, 2009).

Por outro lado, o DM2 caracteriza-se por não ser insulino dependente, sendo decorrente de uma ineficiência de captação de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo determinado pela resistência à insulina, o que contribui para um acúmulo de glicose no meio extracelular e, conseqüentemente, no sangue. O DM2 corresponde a cerca de 90 a 95% dos casos de diabetes (SBD, 2009).

Os pacientes com essa forma de diabetes apresentam-se obesos ou com sobrepeso e em geral apresentam idade igual ou superior à 40 anos, porém pode ocorrer em qualquer idade. Caracteriza-se em geral, por um prolongado período assintomático na maioria das populações, e a suspeita clínica se caracteriza por hiperglicemia de jejum e pelo aparecimento de alguns sintomas como sede excessiva, cansaço, poliúria e prurido. Apresenta elevado componente hereditário (fatores genéticos), além de ambientais e quadros de obesidade. A cetoacidose é rara e quando presente é acompanhada de infecções ou estresse muito grave. Os pacientes com DM2 têm uma prevalência aumentada de anormalidade lipídicas que contribuem para taxas mais elevadas de doença arterial coronariana, infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) (MORRISH et al., 2001; MEIGS, 2003).

Podem ser encontradas outras formas de Diabetes, como o Diabetes Gestacional que é definido como a tolerância diminuída aos carboidratos, em graus variados de intensidade, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Ainda existem alguns tipos específicos, menos frequentes, que podem surgir de forma secundária a algum fator que cause destruição das ilhotas pancreáticas, como defeitos genéticos da função das células beta e na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções e efeito colateral de medicamentos e produtos químicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

### 3.1.3 Fisiopatologia do Diabetes *mellitus* 1

O DM1 é uma doença crônica autoimune, caracterizada pela destruição seletiva das células beta das ilhotas pancreáticas, resultando em uma perda lenta e



progressiva da secreção de insulina e para qual contribuem predisposição genética e fatores ambientais. Este é um processo de destruição crônico que normalmente tem início na infância, se estende por meses ou anos expressando-se na adolescência, de modo que, quando esta patologia se torna sintomática e diagnosticada, cerca de 80 a 90% das células beta já foram destruídas (KUKREJA, 1999; ICHINOSE, 2007).

Do ponto de vista fisiopatológico, caracteriza-se por uma incapacidade do pâncreas em produzir a insulina, e o seu estudo histopatológico evidencia uma destruição de células beta das ilhotas pancreáticas, sendo observado, inicialmente, um infiltrado linfoplasmocitário local, que demonstra um provável processo de autoagressão imunológica com posterior disfunção celular. Em reforço à hipótese autoimune, nessa forma de apresentação da doença, destaca-se a constatação da presença de anticorpos circulantes anti-insulina e anti-células beta, cujo mecanismo fisiopatológico não é ainda totalmente conhecido. Uma predisposição genética, principalmente nos indivíduos portadores de histocompatibilidade de classe II DR3 e DR4, associada a uma possível exposição a fatores ambientais como vírus e agentes químicos podem ser a explicação para as alterações imunológicas acima descritas (THAI, 1993; DE FRONZO et al., 1992).

Os mecanismos exatos que permitem o surgimento e a progressão da destruição das células beta no DM1 permanecem desconhecidos. No entanto sabe-se que a ativação do sistema imunitário mediado por células T em indivíduos geneticamente suscetíveis leva a infiltração linfocitária das ilhotas (insulinite), assim como uma resposta humoral através de células B, com a produção de auto-anticorpos contra um ou mais auto-antígenos (ICHINOSE, 2007; DIAMOND, 2006).

A maioria dos estudos em humanos e em animais, sugere o envolvimento direto das células T CD4+ (Th1) no ataque autoimune, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento de células T CD8+ citotóxicas (ADEGHATE, 2006; ICHINOSE, 2007; GILLESPIE, 2006).

#### 3.1.4 Diagnóstico clínico e laboratorial

Em 1997 os critérios para diagnóstico do DM foram modificados pela American Diabetes Association, posteriormente aceito pela OMS e pela SBD. Tais modificações foram realizadas com a finalidade de prevenir, de maneira eficaz, as

complicações micro e macrovasculares do DM. Os níveis de glicose plasmática tanto em jejum quanto pós sobrecargas, são indispensáveis para caracterizar o diagnóstico do DM, conforme mostra a tabela 1 (SBD, 2009).

Atualmente, são três os critérios aceitos para o diagnóstico do DM, de acordo com a SBD, :

- sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual (qualquer hora do dia), acima de 200 mg/dL.
- glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL, em mais de uma ocasião.
- glicemia de duas horas após sobrecarga de 75g de glicose acima de 200 mg/dL.

Tabela 1: Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para o diagnóstico de DM e seus estágios pré – clínicos.

<b>Categoria</b>	<b>Jejum*</b>	<b>Duas horas após 75g de glicose</b>	<b>Casual**</b>
Glicemia normal	Menor que 100	Menor que 140	-
Tolerância à glicose diminuída	Maior que 100 a menor que 126	Igual ou superior a 140 a menor que 200	-
Diabetes <i>mellitus</i>	Igual ou superior a 126	Igual ou superior a 200	Igual ou superior a 200 com sintomas ***

\*Define-se jejum como a falta de ingestão calórica por, no mínimo, oitos horas.

\*\*Glicemia plasmática casual é a realizada qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição.

\*\*\*Os sintomas clássicos incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.

Nota: deve-se sempre confirmar o diagnóstico de DM pela repetição do teste em outro dia, amenos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de DM.

Fonte: Diretrizes da SBD, 2009.

### 3.2 Sistema Purinérgico

O sistema purinérgico é uma importante via de sinalização em diversos tecidos, participando de eventos de curta e longa duração, dentre estes resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular. A sinalização purinérgica envolve os nucleosídeos de adenina, os receptores através dos quais eles exercem seus efeitos

e as ectoenzimas. Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP e ADP, e os nucleosídeos são considerados atualmente importantes moléculas sinalizadoras, mediando seus efeitos através dos receptores purinérgicos localizados na superfície celular (OLIVEIRA, 2008).

Um importante nucleosídeo componente do sistema purinérgico é a adenosina (ado) que está envolvida em inúmeros processos fisiológicos. No sistema cardiovascular promove a redução da pressão arterial em virtude de sua atividade vasodilatadora (SATO et al., 2005). A ado também modula a liberação de neurotransmissores e de citocinas, participa da inibição da lipólise, induz broncoconstrição (FAN et al., 2003), além de exercer importante papel na modulação da ação da insulina no metabolismo da glicose em diferentes tecidos. Estudos indicam que em condições diabéticas pode ocorrer uma alteração da homeostase da ado o que por sua vez pode estar relacionado com a função diminuída das células imunes (RUTKIEWICZ & GORSKI, 1990).

A ado está presente em todos os vertebrados, é produzida por diferentes vias e sua síntese ocorre no meio intra e extracelular. No meio intracelular, a sua produção ocorre a partir da atividade da 5'nucleotidase (5'NT) sobre o 5'-AMP, resultando em adenosina, sendo esta a principal via de produção deste nucleosídeo. Também pode ocorrer a produção de ado pela atividade da S-adenosinahomocisteína hidroxilase que converte a S-adenosinahomocisteína em adenosina. Ambas as adenosinas são metabolizadas em inosina pela ADA, como pode ser observado na Figura 1 (LATINI & PEDATA, 2001).

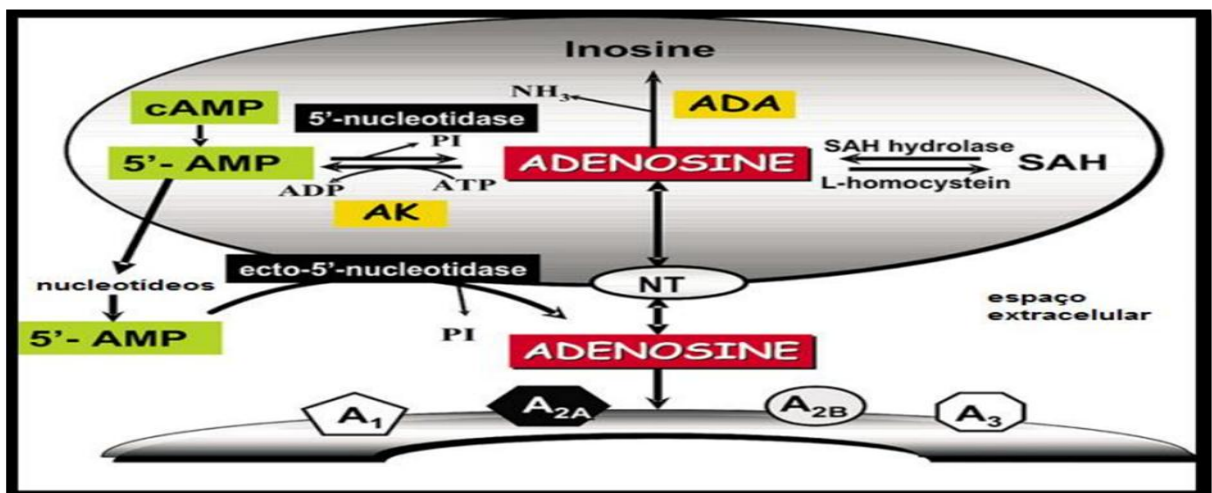


Figura 1: Vias de produção, metabolismo e transporte de adenosina.

Fonte: (Disponível em [www.bioscience.org](http://www.bioscience.org)).

A ado é capaz de modular a liberação de diversos hormônios incluindo a insulina (FELDMAN & JACKSON, 1974), glucagon (WEIR et al., 1975), corticosterona (FORMENTO et al., 1975) e síntese de esteroides (WOLF & COOK, 1977).

### 3.2.1 Adenosina Deaminase

A ADA é uma metaloenzima que catalisa a desaminação da ado e da desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente (Figura 2). A ADA está presente principalmente no citoplasma e na superfície celular das células e encontra-se distribuída em todo o organismo agindo na sinalização extracelular mediando um grande número de respostas via interação com seus receptores de membrana (OLIVEIRA, 2008). Essa enzima polimórfica da rota metabólica das purinas vem sendo objeto de considerável interesse devido ao seu papel na manutenção dos níveis de ado intra e extracelulares (FRANCO et al., 1998).

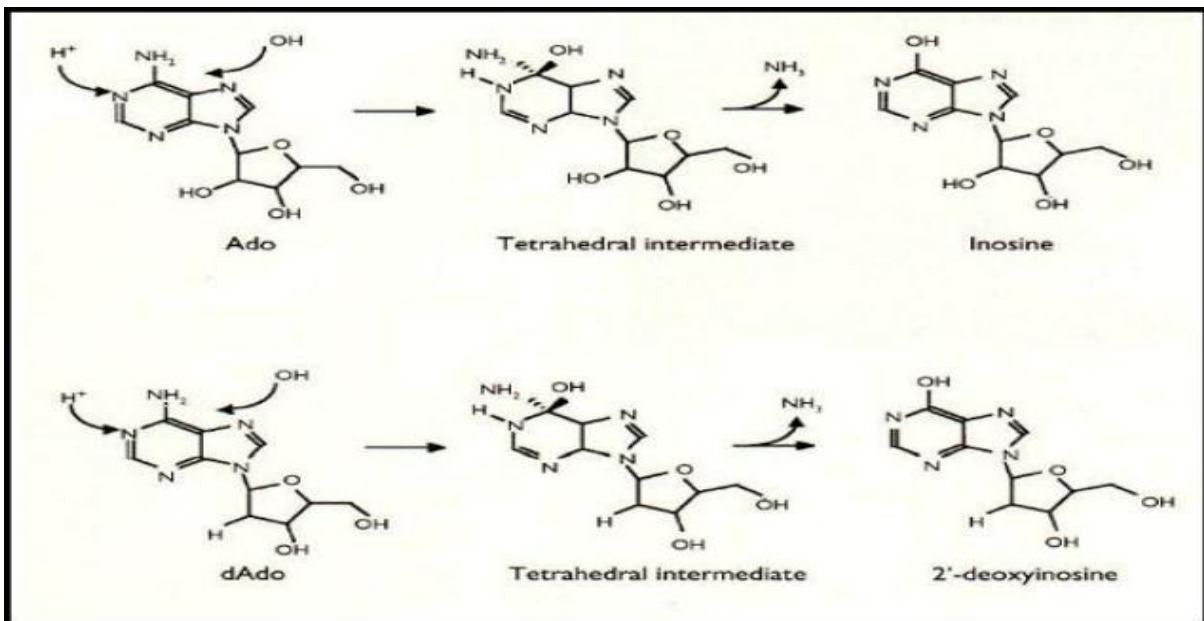


Figura 2: Reações catalisadas pela ADA, tendo como substrato a adensina (ado) e a 5'desoxiadenosina (d-ado).

Fonte: FRANCO et al.,1998.

A ADA (Figura 3) está presente em plantas, bactérias (LUPIDI, et al.,1992), invertebrados, vertebrados e mamíferos (LUPIDI et al., 1992). Em humanos (DADDONA, 1981), encontra-se distribuída em todo o organismo e age como sinal extracelular mediando um grande número de respostas via interação com seus

receptores de membrana (RODWELL, 1998). Possui um importante papel biológico no metabolismo dos nucleosídeos purínicos, é essencial para a proliferação e diferenciação de células linfoides, particularmente células T e maturação de monócitos (BOTA et al., 2011).

Estudos recentes evidenciam que pacientes com diabetes apresentam reações imunológicas inadequadas, desencadeadas por defeitos na ação da insulina, visto que esta exerce função sobre a atividade de linfócitos T. A ADA apresenta elevada atividade em indivíduos diabéticos, fator que pode ser explicado pela ação alterada da insulina sobre os linfócitos T. Estudos observaram um aumento da atividade da ADA em soro e eritrócitos hiperglicêmicos (BOPP et al., 2009) e em plaquetas de pacientes diabéticos (DE BONA et al., 2010), reduzindo assim os níveis de ado. Desse modo, esta enzima poderia ser considerada um biomarcador importante de disfunção imunológica em indivíduos diabéticos (OLIVEIRA, 2008). Outros estudos relataram que não houve diferença significativa na atividade da ADA em células cardíacas de ratos diabéticos (PODGORSKA et al., 2006).

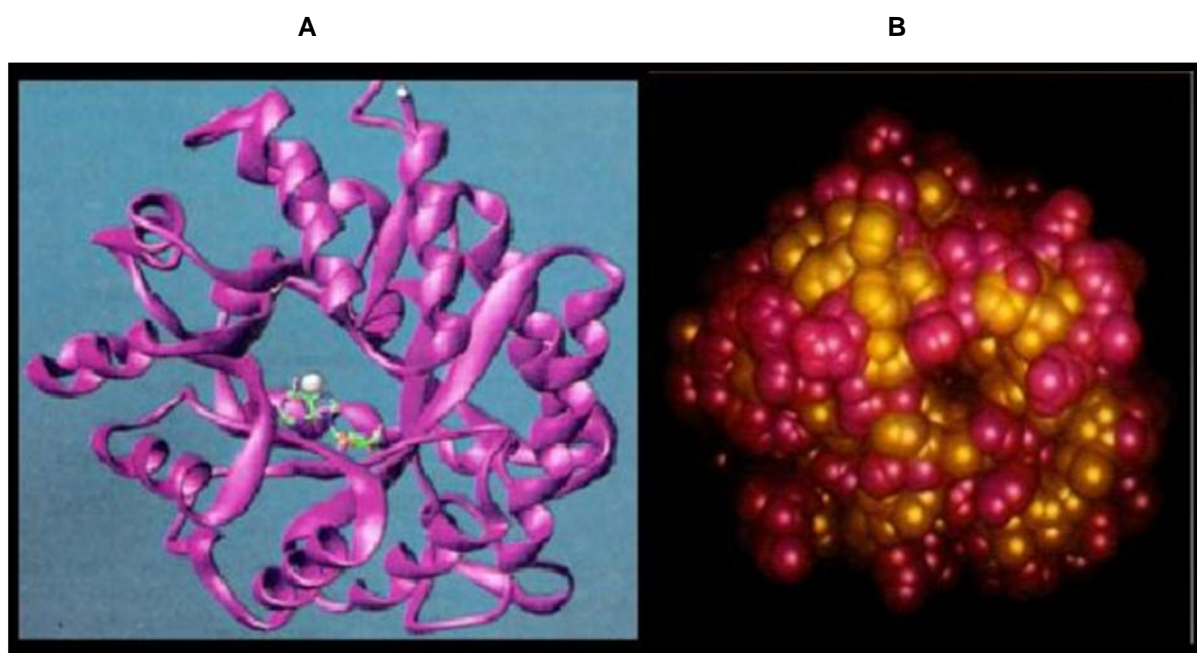


Figura 3: A) Estrutura da ADA. B) Estrutura Tridimensional da enzima, com o sítio ativo no centro da estrutura, e as cadeias laterais polares e não polares em rosa e amarelo, respectivamente.

Fonte: FRANCO et al., 1998.

Um aumento na atividade da enzima em diferentes fluídos biológicos (líquidos pleural, pericárdico, peritoneal, intra-articular e fluído cérebro-espinhal) tem sido

utilizado para diagnóstico de tuberculose (BAGANHA et al., 1990; DA CUNHA, 1991), peritonite infecciosa, mononucleose infecciosa, febre tifoide, sinusite, meningite e AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) (TITARENKO et al., 2006).

### 3.3 Diabetes Experimental

O estudo experimental do DM em diversos modelos animais contribuíram e contribuem para o melhor entendimento das causas, consequências e tratamento da doença. As alterações fisiopatológicas do DM demoram muito tempo para aparecer, pois são transmitidas geneticamente, assim os modelos experimentais podem ser utilizados para aumentar a rapidez no desenvolvimento da doença. Modelos que propiciem a destruição das células beta pancreáticas, células produtoras de insulina, são atualmente aceitos para caracterizar o DM insulino dependente (DMID). A utilização de animais com DM autoimune e, mais recentemente, o aparecimento de modelos experimentais transgênicos, que possuem a expressão para o desenvolvimento da doença, tem ajudado a esclarecer as condições moleculares que podem ocorrer em humanos (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

O diabetes experimental pode ser induzido por manipulação cirúrgica, manipulação genética (tecnologia dos nocautes ou transgênicos) e por drogas. Atualmente para indução de diabetes em roedores têm se utilizado a STZ (Figura 4), droga que atua diretamente na indução da morte das células beta pancreáticas (HOUNSOM & TOMLISOM, 1997). A estreptozotocina ou estreptozocina é uma nitrosurea isolada, derivada do *Streptomyces griseus*, que, quando administrada em animais saudáveis, promove uma grave deficiência na liberação de insulina pancreática. A STZ pode ser aplicada em pequenas e múltiplas doses, ou então, em dose única, variando de 50 a 100 mg/Kg de peso corporal. Com a administração da droga e consequente necrose das células beta, o DM se desenvolve em um ou dois dias. Quando administrada em altas doses, pode produzir profunda deficiência de insulina contribuindo para um quadro de cetose espontânea e, em alguns casos, para a morte do animal (HOUNSOM & TOMLISOM, 1997).

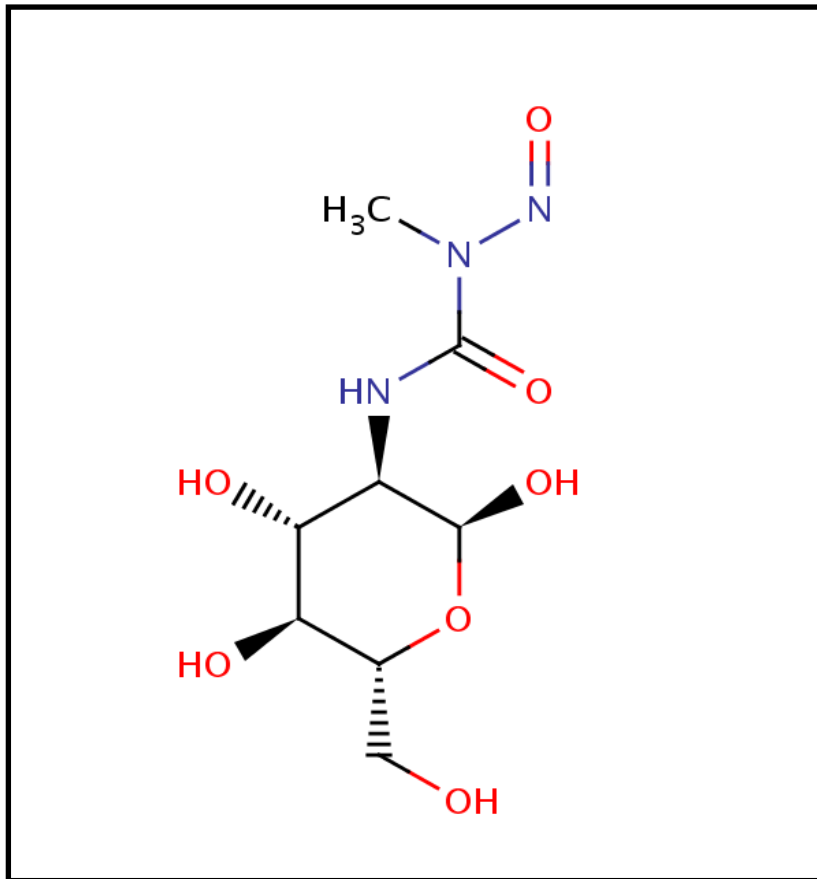


Figura 4: Estrutura química da estreptozotocina.

Fonte: [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com)

A STZ promove uma destruição das membranas celulares e a indução da quebra do DNA, levando a ativação da enzima poli (ADP-ribose) sintetase e a depleção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (YAMAMOTO, et al. , 1981). Esta enzima está localizada no núcleo das células beta e necessita de NAD para realizar o reparo do DNA nuclear. A depleção do NAD pelo aumento da atividade desta enzima impossibilita a formação de insulina nas células beta pancreáticas (Figura 5). Porém esses efeitos podem ser prevenidos e evitados com a administração de nicotinamida e picolinamida, visto que são substâncias que inibem a ação da enzima poli (ADP-ribose) sintetase, ocorrendo assim uma homeostase nos níveis de NAD intracelular (UCHIGATA, et al., 1983).

Doses subdiabetogênicas de STZ (5 mg/Kg de peso corporal) desenvolveram o DM em camundongos. As alterações metabólicas decorrentes foram muito semelhantes às observadas em humanos, podendo ser constatado processo inflamatória em grande parte das células das ilhotas pancreáticas, sugerindo uma

resposta autoimune, que influenciaria alguns fatores genéticos dos próprios animais. Diante dessas constatações, iniciaram-se os estudos com as linhagem de animais geneticamente modificados para desenvolver o DM (LIKE e ROSSINI, 1976).

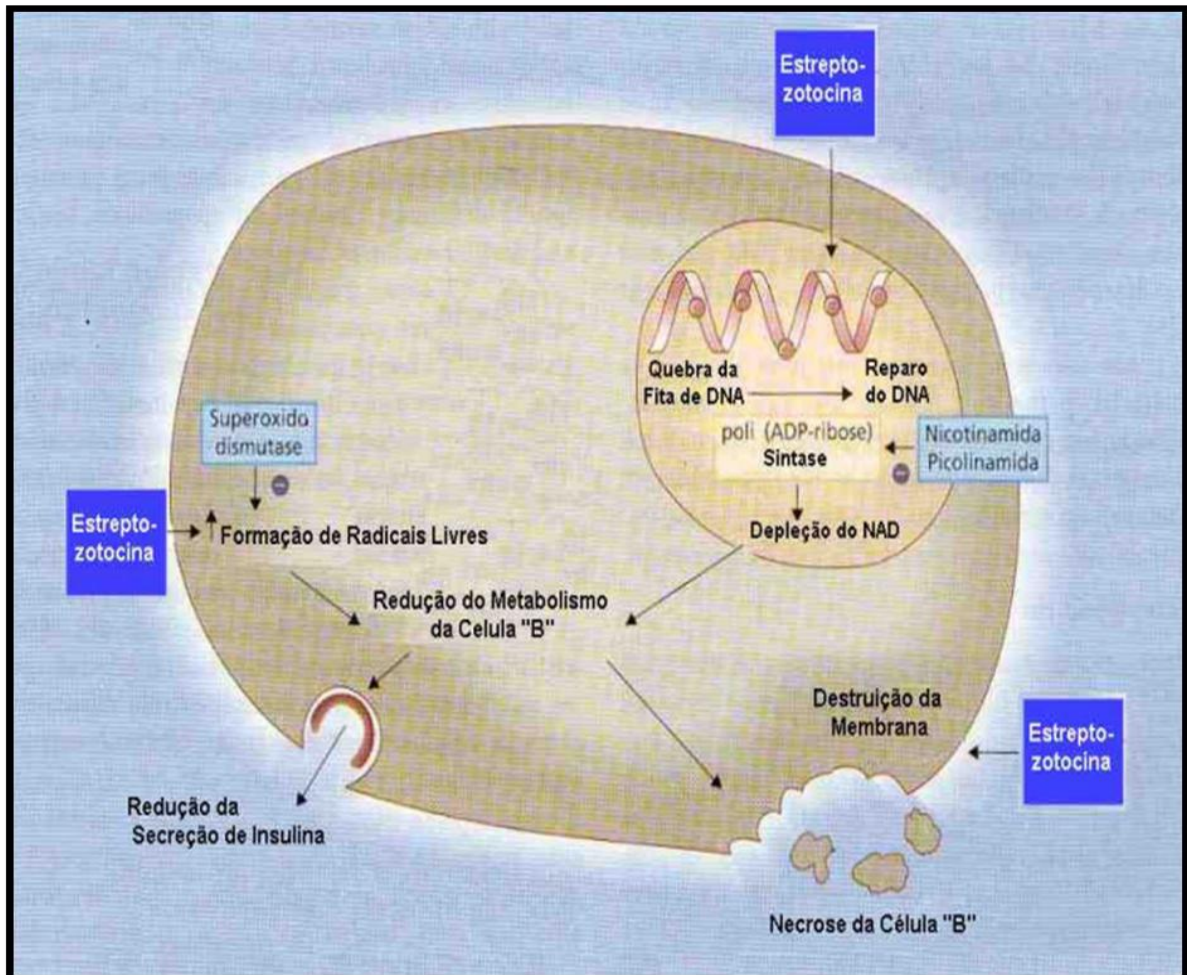


Figura 5: Atuação da estreptozotocina nas células beta pancreáticas.

Fonte: Adaptado de HOUNSOM & TOMLISOM, 1997.

### 3.4 Plantas Medicinais e Diabete *mellitus*

Os princípios ativos de plantas medicinais vêm sendo usado desde a antiguidade para o tratamento do DM. Nos últimos anos, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o propósito de comprovar a atividade de extratos e princípios ativos sobre o DM e suas complicações (LI et al, 2004). A maioria das plantas popularmente utilizadas como antidiabéticas, quando analisadas farmacologicamente, apresentam atividade hipoglicemiante. Algumas plantas



realmente apresentam potencial terapêutico farmacológico de regulação da glicemia, enquanto que outras produzem hipoglicemia como efeito colateral à sua toxicidade (BAE et al., 1999; LAMBA et al., 2000).

Na medicina chinesa tradicional, 82 plantas medicinais têm sido usadas como medicamentos naturais para o tratamento do DM e suas complicações (LI et al., 2004). A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas ao serem avaliadas farmacologicamente demonstraram ter atividade hipoglicemiante e possuir constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. Entretanto, as análises posteriores revelaram grande variedade de mecanismos de ação que podem levar ao efeito hipoglicemiante, nem todos terapeuticamente úteis (MARLES & FARNSWORTH, 1995; HUO et al., 2003; SAID et al., 2002).

O nível glicêmico de pacientes diabéticos e as complicações clínicas dessa patologia podem ser reduzidos por muitas substâncias extraídas de plantas, uma variedade de classes químicas estão identificadas na Tabela 2. Algumas destas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir além de hipoglicemia efeitos adversos, especialmente hepatotoxicidade (WANG, 1999; BAE et al., 1999; LAMBA et al., 2000).

Diversos fatores podem ser atribuídos como mecanismos de ação de plantas hipoglicemiantes, dentre eles, podemos citar a estimulação da liberação de insulina pelas células beta pancreáticas, resistência aos hormônios que aumentam os níveis séricos de glicose, aumento do número e da sensibilidade de sítios receptores de insulina, diminuição da perda de glicogênio, aumento do consumo de glicose nos tecidos, diminuição do estresse oxidativo entre outros (PRINCE, 1998; FERNANDES et al., 2010).

#### 3.4.1 Flavonóides

Os flavonoides são polifenóis, metabólitos secundários de plantas e definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanoma (C6-C3-C6) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares. São um grupo de pigmentos naturais, amplamente distribuídos no reino vegetal, estando presentes em frutas, vegetais, cereais, raízes, folhas e caules (BIRT, 2001).

Os flavonoides apresentam uma notável série de ações bioquímicas e farmacológicas que podem influenciar nas funções de vários sistemas celulares dos mamíferos (MIDDLETON et al., 2000). Estas atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que pode variar com as substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações, conforme mostram as Figuras 6 e 7 (MACHADO, 2005).

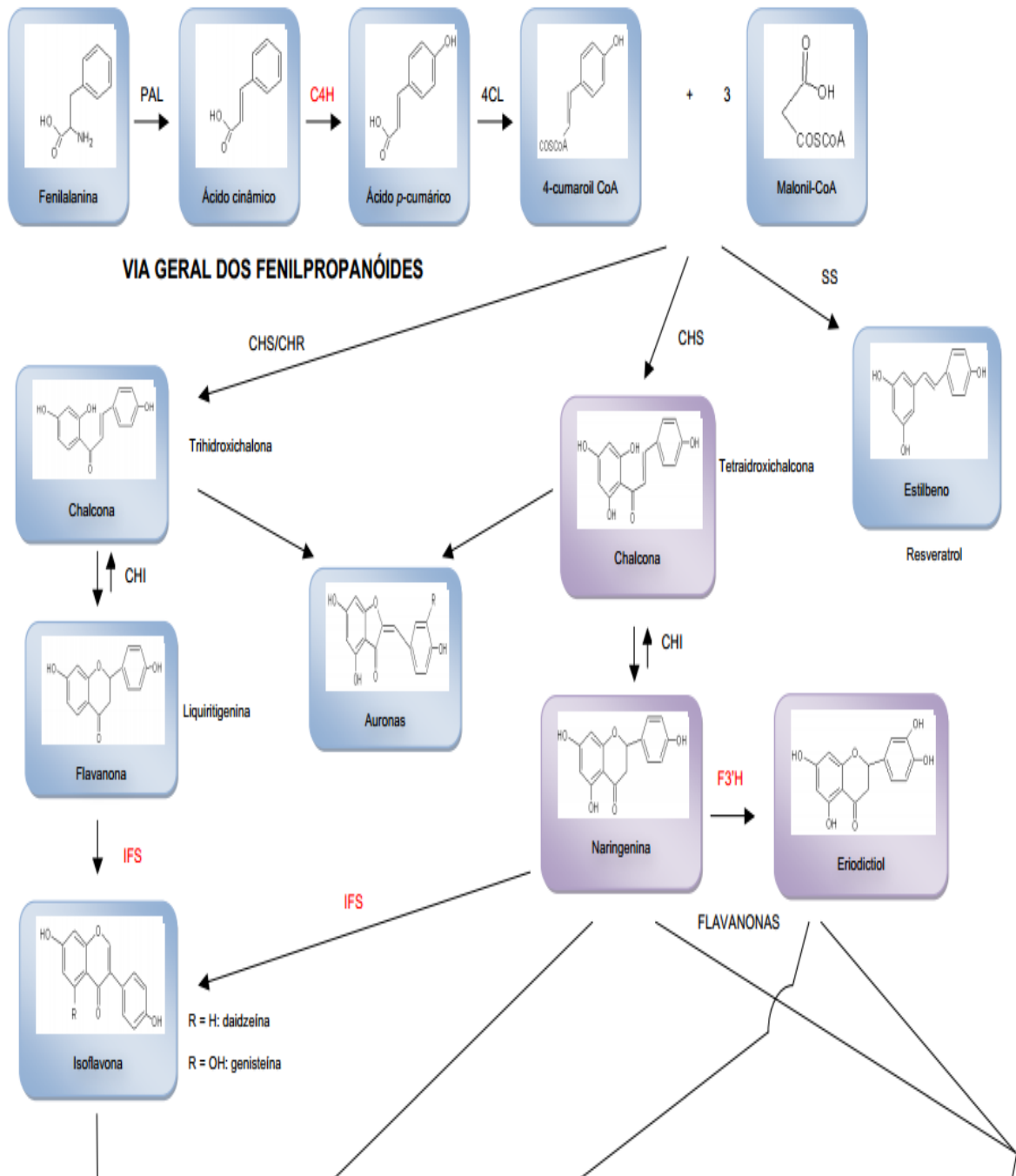


Figura 6: Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonoides.

Fonte: Adaptado de WINKEL-SHIRLEY, 2001.

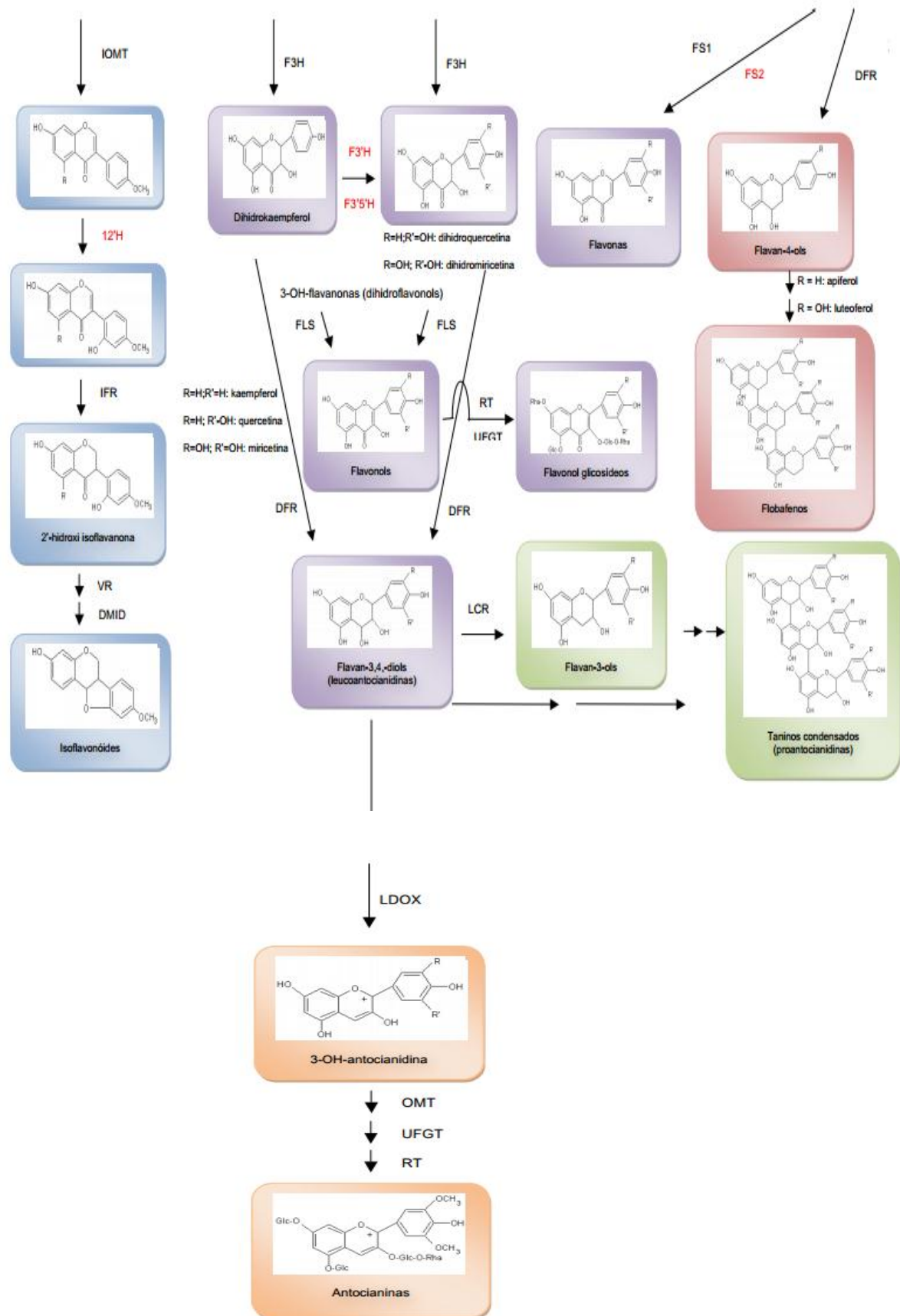


Figura 7: Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonoides.

Fonte: Adaptado de WINKEL-SHIRLEY, 2001.

Em 1936 Rusznyák e Albert Szent-Gyorgyi demonstraram pela primeira vez a atividade biológica dos flavonoides, onde misturaram duas flavonas as quais diminuíram a fragilidade e a permeabilidade capilar em humanos (PEDRIALI, 2005).

Na indústria as principais aplicações dos flavonoides são como corantes, aromatizantes e flavorizantes. Entre as propriedades farmacológicas podem ser citadas as atividades vasodilatadoras (DUART et al., 1993), anti-inflamatórias e antioxidantes (PATHAK et al., 1991), anticarcinogênicas, antivirais (MIDDLETON et al., 2000), cardioprotetoras (RICE-EVANS et al., 1995; PATHAK et al., 1991; HOLLMAN et al., 1996; MARTINEZ-FLOREZ et al., 2002). Também é atribuída atividade hipoglicemiante. Estudos indicam que alguns flavonoides aumentam a liberação de insulina das ilhotas de Langerhans de forma dependente de sua concentração (KOSHY & VIJAYSLAKSHMI et al., 2001).

Os flavonoides são muito interessantes por apresentarem uma gama de atividades farmacológicas, pois podem ser utilizados no tratamento de doenças tais como alergia (SHAIK et al., 2006), diabetes *mellitus* (HABIBUDDIN et al., 2008), câncer (MILLER et al., 2008), processos inflamatórios (CHARAMI *et al.*, 2008), além de atuar como antioxidantes (KAMALAKKANNAN & PRINCE, 2006). Dentre esses flavonoides destaca-se a rutina (RT) que tem sido intensamente pesquisada e os resultados estão interessando constantemente as indústrias farmacêuticas (PEDRIALI, 2005).

#### 3.4.2 Rutina

Em 1930, uma nova substância foi isolada de laranjas, sendo classificada no princípio como vitamina (Vitamina P), porém estudos posteriores demonstraram se tratar de um flavonoide, daí então denominado de RT (NIJVELT et al., 2001). A RT é um flavonol glicosídico extensamente encontrado na natureza, em frutas, vegetais e bebidas como chá e vinho (GUERRA et al., 2009).

A RT é formada por um anel pirano que apresenta um dissacarídeo (ramnose + glicose) ligado a sua posição 3. Esta estrutura apresenta afinidade pelas membranas das células epiteliais exercendo papel importante na absorção dos compostos lipofílicos, por outro lado, observa-se uma absorção mais lenta a nível intestinal em virtude dos açúcares ligados a molécula (MUROTA, 2003).

Griffith e colaboradores, 1955, identificaram a rutina como um pigmento amarelo no estado físico de cristais em agulha. Foi detectada primeiramente na *Ruta graveolens* em 1842 e isolada, posteriormente, da *Caparis spinosa* como ácido rutínico, denominação utilizada para este composto por se apresentar solúvel em soluções alcalinas. Em 1896, foi estabelecida a fórmula definitiva da rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>) conforme mostra a Figura 8, com a descoberta da ligação dos açúcares glicose e ramnose na molécula da quercetina. Demais fontes da rutina são: *Sophora japônica*, *Fagopyrum esculentum*, *Dimorphandra mollis* (COUCH, NAGHSKI e KREWSON, 1946; OOMAH & MAZZA, 1996; BARRETO, 2005; PEDRIALI, 2005).

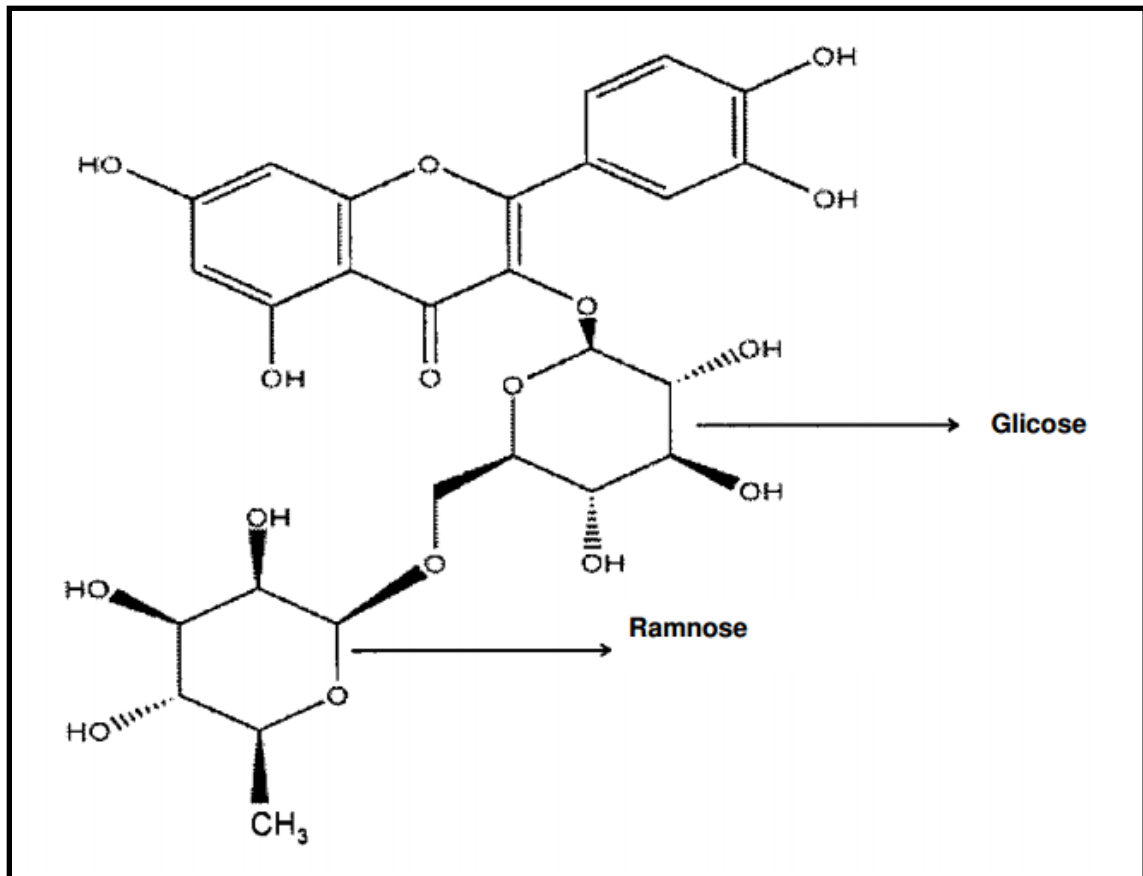


Figura 8: Estrutura da rutina.

Fonte: Pedriali, 2005.

A Figura 9 mostra a hidrólise da RT que ocorre completamente por ação de glicosidases produzidas por bactérias intestinais originando a Quercetina 3-glicosídica e a Quercetina aglicona (MANACH et al., 1997; WALLE et al., 2004). Posteriormente à hidrólise dos açúcares esta molécula é melhor absorvida, pois

passa a apresentar maior afinidade pelas membranas das células (BOKKENHEUSER; SHACKLETON; WINTER, 1987).

A RT têm se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas. Entre estas está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos, visto que seu potencial antioxidante impede a oxidação da adrenalina. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual (PATHAK et al., 1991).

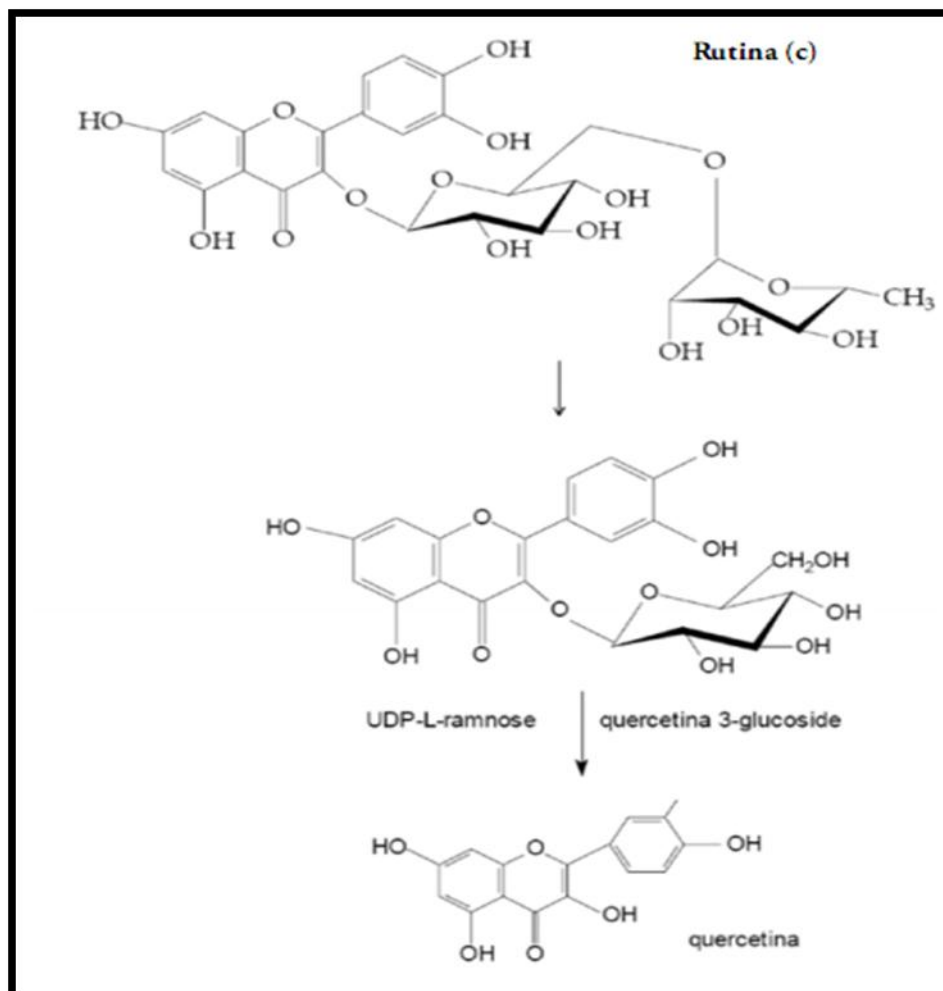


Figura 9: Hidrólise da Rutina.

Fonte: MANACH et al., 1997.

Segundo os estudos de AFANAS`EV e colaboradores (1989) que pesquisaram a atividade antioxidante da RT, este flavonoide têm uma ação terapêutica em patologias que produzem excessivamente radicais livres, pois promovem uma importante neutralização destes radicais, sem apresentar toxicidade. Diante disso, o flavonoide RT tem sido objeto de estudos em diversas especialidades sendo um promissor princípio ativo que poderá contribuir para o futuro tratamento de enfermidades e suas complicações dentre elas o DM.





Os métodos e resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. O manuscrito foi submetido para avaliação na revista Food and Chemical Toxicology (Anexo 1). Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no manuscrito.



**Rutin restores serum and liver Adenosine deaminase activity and improves glucose levels and hepatic markers in streptozotocin-induced diabetic rats**

*Eduardo Ottobelli Chielle<sup>a,c</sup>, Gabriela Bonfanti<sup>b</sup>, Karine Santos de Bona<sup>b</sup>, Lariane Oliveira Cargnelutti<sup>a</sup>, Paula Eliete Rodrigues Bitencourt<sup>a</sup>, Priscila Sabino da Silva<sup>a</sup>, Lediane Tomazzi<sup>b</sup>, Marli Matiko Campos<sup>a</sup>, Maria Beatriz Moretto,<sup>a,b\*</sup>*

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences

Department of Clinical and Toxicology Analysis

Center of Healthy Sciences

Federal University of Santa Maria (UFSM)

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Pharmacology- Center of Healthy Sciences

UFSM-Santa Maria-Brazil

<sup>c</sup>Center Healthy Sciences – University of West of Santa Catarina - UNOESC - São Miguel do Oeste - SC – Brazil

\*Correspondent author:

Maria Beatriz Moretto

[Beatriz@smail.ufsm.br](mailto:Beatriz@smail.ufsm.br)

Fax: +55 - 3220 8018

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

## ABSTRACT

Flavonoids are non-nutritive dietary components widely distributed in plants. Rutin (RT), a polyphenolic flavonoid, was investigated on the activity of Adenosine deaminase (ADA) in serum, liver, kidney and cerebral cortex in diabetic rats. Diabetes was induced in rats by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 55 mg/kg. RT (100 mg/kg/day) and glibenclamide (10mg/kg/day) were administered for 30 days, except for control groups (non diabetic and diabetic). Six groups of rats were used in the study and grouped based on fasting blood glucose levels after diabetes induction. Glucose level, ADA, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST),  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) activities, lipid profile and hepatic marker were analyzed. RT showed a hypoglycemic effect by the reduction of blood glucose level by 20.5% in diabetic rats. Also, it was observed that RT restores the enhanced ADA activity in serum and liver as well as ALT and  $\gamma$ -GT activities in diabetic rats. These results suggest that RT improves hyperglycemia, presents important hepatoprotective effects and is able to prevent the increase of the ADA activity in serum and liver in STZ-induced diabetic rats.

Keywords: Adenosine deaminase; Diabetic rats; Glucose; Liver; Rutin; Streptozotocin

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a complex metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulted from a lack of insulin production or insulin resistance that leads to disturbances of carbohydrate, protein and fat metabolism (ADA, 2006). The World Health Organization (WHO) estimates that more than 220 million people worldwide have diabetes, and this number is likely to double by 2030 (WHO, 2009). DM causes morbidity and mortality in the developed world, particularly vascular complications such as atherothrombosis in the coronary vessels and failure of various organs (Schalkwijk and Stehouwer, 2005).

Adenosine (ado) is a potent endogenous anti-inflammatory and immunosuppressive molecule that is released from cells into the extracellular space at sites of inflammation and tissue injury (Nemeth et al., 2007). There is a complex system of enzymes and transporters involved in adenosine metabolism (Wardas, 2002; Fredholm, 2007). One key enzyme that has an important biological role in the metabolism of purine nucleosides is Adenosine deaminase (ADA) (ADA, EC 3.5.4.4), which catalyzes irreversible hydrolytic deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine, respectively (Uz et al., 2005). ADA is essential for the proliferation and differentiation of lymphoid cells (Bota et al., 2001). Previous studies have reported that the highest ADA activity was observed in the lymphoid, fatty tissues, liver, skeletal muscle, and heart, although the activity was widely distributed in most organs (Rutkiewicz, 1990; Fredholm, 2007). Moreover, recent studies in our laboratory observed that the ADA activity was higher in patients with hyperglycemia and DM type 2 (Bopp et al., 2009, De Bona et al., 2010 e 2011, Bellé et al., 2011). When the ADA activity is suppressed, insulin sensitivity may be improved and cellular proliferation, inflammation, and T-cell activity, all associated with the pathophysiology of insulin resistance, can also be affected. However, this mechanisms are still not completely understood (Bota et al., 2001).

Plants constitute an important source of active natural products which differ widely in terms of structure and biological properties. They have a remarkable role in the traditional medicine in different countries. In recent years, the prevention and treatment of cancer, cardiovascular diseases and DM has been associated with the ingestion of fresh fruits, vegetables or plants rich in natural antioxidants (Bailey and Day, 1989; Virgili et al., 2001; Johnson et al., 2001; Argolo et al., 2004).

Among these substances, the natural flavonoids have displayed effects on physiological and pathological conditions as DM (Fedosova et al., 2004; Jung et al., 2004; Souza and Lopez 2004). The flavonoid rutin (RT) is a pharmacologically active phytochemical and natural antioxidant that has been investigated for its possible role on protection of pathologies. In fact, recent studies have shown a variety of pharmacological activities of RT such antitumor, anti-inflammatory, antidiarrhoeal, antimutagenic, myocardial protecting, immunomodulator and hepatoprotective activities (Kamalakkannan and Prince, 2006; Aherne and Brien, 2000; Schwedhelm et al., 2003). Moreover, RT is a common dietary flavonoid that is consumed in fruits, including tomatoes, vegetables, and plant-derived beverages such as tea and wine (Pashikanti et al., 2010).

Thus, taking into account: i) the significant properties and the growing use of natural flavonoids in the control of hyperglycemic state; ii) the search for active ingredients that help to normalize the glucose profile minimizing the severity of complications of diabetic patients; iii) the few studies about the important enzyme of the adenosine metabolism, ADA, in diabetic rats; and iv) the interest on the effects of RT on the ADA activity in serum and tissues under hyperglycemic conditions of an animal model with streptozotocin (STZ); the purpose of the present study was to evaluate the effect of RT on the ADA activity in serum, liver, kidney and brain tissues as well as the biochemical parameters of diabetic rats.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemicals**

Streptozotocin was purchased from Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA) and adenosine from Merck, Darmstadt, Germany. Rutin ( $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ ) and glibenclamide ( $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ ) were obtained from DEG Importação de Produtos Químicos LTDA, São Paulo – SP – Brasil. All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

## 2.2. Experimental Animals

Male Wistar rats weighing between 270 and 330g were obtained from the animal house of Federal University of Santa Maria (UFSM). They were grouped and housed in poly-acrylic cages and maintained under standard laboratory conditions (temperature  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative humidity 60-70% and 12-h light-dark cycles). Animals were fed with commercial rat feed (Presença Nutrição Animal, São Paulo, Brazil) and water, *ad libitum*. All the animals were acclimatized to laboratory conditions for 7 days before the commencement of the experiment. Experiments were carried out according to NIH guidelines and all procedures were approved by the Ethics of animal research at the Federal University of Santa Maria, under protocol number 23081.007418/2007-75.

## 2.3. Induction of diabetes

Diabetes was induced after a fasting period of 12 h, by a single intraperitoneal (ip) injection of STZ 55 mg/kg (1mL/kg) freshly diluted in cold sodium citrate buffer (0.01 M, pH 4.5) (Kumar et al., 2007). Control rats received an equivalent amount of sodium-citrate buffer. STZ-treated animals received 5% of glucose instead of water for 24 h after diabetes induction in order to reduce death due to hypoglycemic shock. Forty-eight hours after STZ injection, blood glucose was measured by glucometer (Accu-Chek Advantage-Roche) and the rats with blood glucose above 250 mg/dL were used for the study.

## 2.4. Experimental design

In the experiment, 48 rats (24 diabetic rats, 24 normal rats) divided into six groups of eight rats each were used. The treatment was started on the 3<sup>rd</sup> day after STZ-injection and this was considered as the 1<sup>st</sup> day of treatment. RT, glibenclamide and buffered saline were given once daily using an intragastric tube for 30 days to each group as follows:

Group I: Normal control rats received 0.9% saline.

Group II: Normal rats received glibenclamide 10 mg/kg.

Group III: Normal rats received rutin 100 mg/kg.

Group IV: diabetic control rats received 0.9% saline.

Group V: diabetic rats received rutin 100mg/kg.

Group VI: diabetic rats received glibenclamide 10 mg/kg

The doses of glibenclamide and rutin were according to Kamalakkannan and Prince (2006). At the end of the treatment, animals were fasted by 12 h, later anesthetized with ketamine 80mg/kg + xilaxin 8mg/kg before being submitted to euthanasia. Blood samples were drawn by cardiac puncture, and liver, brain and kidney were removed.

## 2.5. Biochemical parameters estimations

The fasting blood glucose and body weights were measured on day 0, 10, 20 and 30. On the day 30<sup>th</sup>, the animals were euthanized and blood was collected in a dry test tube and put to coagulate at ambient temperature for 30 min. Serum was separated by centrifugation at 2000 rpm for 10 min for the estimations of serum glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), total cholesterol, High-density lipoprotein (HDL-c), triglycerides, amylase, urea and creatinine by commercial kits (Labtest Diagnostic, MG, Brazil). Low-density lipoprotein (LDL-c) was estimated indirectly using Friedewald's formula (Friedewald et al., 1972). For measurement of ADA activity, liver, kidney and brain tissues were dissected out, washed with ice-cold saline immediately, and kept at 4°C. Tissues were homogenized in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 for 4 minutes, centrifuged at 14000xg for 30 minutes and the supernatant was used. ADA activities in serum and tissues were determined according to Giusti and Galanti (1984) based on the direct production of ammonia when ADA acts in excess of ado (Bertholet reaction). Results were expressed in U/L and in U/g protein for serum and tissue, respectively. The tissue protein content was determined according to Peterson (1977), using bovine serum albumin as standard.

## 2.6. Statistical analysis

All the grouped data were analyzed by two-way analysis of variance followed by Duncan's multiple range test using Statistica 6.0 software. Repeated ANOVA measurements followed by Duncan's post hoc test were performed to analyze



changes in blood glucose and body weight over time. The values are mean  $\pm$  S.E. for 8 rats in each group. P values  $\leq$  0.05 were considered as significant and included in the study.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of RT on hyperglycemia and on body weight

After 30 days of treatment with RT, we observed a maximum reduction of 20.5% in plasma blood glucose level in diabetic rats treated with this flavonoid ( $p < 0.05$ ) (Table 1). The significant reduction of glucose began on day 10 and persisted until the end of the treatment. In addition, Table 2 shows that in the STZ group there was a significant decrease in body weight ( $p < 0.0001$ ) after 30 days of treatment when compared to the normal control group. However, RT and glibenclamide did not have a significant effect on the body weight of the STZ groups.

#### 3.2. Effect of RT on biochemical parameters

Table 3 shows that total cholesterol and LDL-c in the serum of the diabetic group treated with RT (V) were significantly lower than in the diabetic control group (IV) ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively), being even more significantly reduced than in diabetic rats treated with glibenclamide group (VI). There were no significant changes in the concentrations of HDL-c and triglycerides when compared with other groups. The activity of ALT, AST and  $\gamma$ -GT in serum was significantly higher ( $p < 0.01$ ) in the diabetic groups (IV, V and VI) when compared with the normal groups (I, II and III). Diabetic rats treated with RT (group V) showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of the ALT and  $\gamma$ -GT activities when compared to the diabetic control group.

Creatinine values did not undergo significant changes in the groups analyzed. In contrast, serum concentrations of urea were significantly higher in the diabetic groups (IV, V, and VI) ( $p < 0.01$ ), whereas serum amylase levels were significantly reduced in these groups ( $p < 0.01$ ). The administration of RT did not change these biochemical parameters.

### 3.3. Effect of RT on the ADA activity in serum, liver, kidney and brain tissues

Fig. 1 (A, B) shows the effect of RT on the ADA activity in the serum and liver. We observed a significant increase of the ADA activity in serum and liver from the diabetic control group when compared to the normal control group ( $p < 0.01$ ). However, the administration of RT brought serum ADA activity near to normal at the end of the study ( $p < 0.01$ ), even more than glibenclamide (Fig. 1A). Despite the restoring effect of RT on liver there was no difference between RT and glibenclamide effect in this tissue (Fig. 1B). These effects were not observed in kidney and brain of the groups analyzed (Table 4).

## 4. Discussion

STZ-induced type 1 diabetes is a chemical model of experimental DM with the development of severe hyperglycemia and widely used nowadays in many studies of diabetes (Bolzán and Bianchi, 2002; Sarkhail et al., 2007). This model was used in our investigation to evaluate the effects of RT on hyperglycemia and some metabolic disorders related to DM.

The present study shows a decreased serum concentration of glucose in the diabetic group treated with RT. The significant reduction of glucose began on day 10 and persisted until the end of the treatment, as glibemclamide a sulfonylurea which stimulates  $\beta$ -cell function by increasing the release of insulin. Results suggest that this action on glucose metabolism could be due to the fact that flavonoids provide entry of glucose into the cells by stimulating glycogen enzymes, favoring the production of hepatic glycogen (Sarkhail et al., 2007) and reducing the inhibition of glycogen breakdown by the glucose-6-phosphatase in the liver thus decreasing the release of glucose into the bloodstream (Naik et al., 1999). On the other hand, other researchers suggest that RT exerts its hypoglycemic effect by extra pancreatic mechanisms possibly stimulating glucose utilization in extra hepatic tissues (Mezei et al., 2003; Pinent et al., 2004). Studies have also showed that RT may increase the release of insulin (Koshy & Vijayslakshmi et al., 2001). Since in our study we found a reduction of glucose only from day 10 after the induction of diabetes, it is possible to think that the hypoglycemic effect of RT would to be occurring as a result of all these actions.

Furthermore, the hypoglycemic effect of RT may be associated with its capacity to inhibit the ADA activity and interfere in the ado regulation. In fact, the increased ADA activity observed in serum and liver tissue of hyperglycemic rats would lead to a decrease in the level of ado. Ado is suggested to modulate the bioactivity of insulin (Rutkiewicz and Gorski, 1990). Of particular importance is that the increased ADA activity may be an important indicator in the immunopathogenesis of hyperglycemic disorders and the inhibition of the ADA activity caused by RT may be associated to ado metabolism in the immune system as well as on the glucose transport (Kawashima et al., 2000). The decrease of the ADA activity provoked by RT may contribute for the ado level control in hepatic cells. Also, ado may act as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system (Maggirwar et al., 1994). It is interesting to note that the ADA activity was changed mainly in liver in relation to all tissues analyzed, and RT was able to reverse this effect.

Ado is involved in regulating multiple physiological systems in the kidney and the neuromodulatory capacity of ADA in the central nervous system has been shown. In the present study we found no changes in the ADA activity in cerebral cortex and kidney of diabetic rats. It is possible that the period of treatment (30 days) has not been enough to alter the enzyme activity in these tissues, because kidney and neurological damage of DM take longer apper. Regarding the kidney, although the urea concentration was elevated, creatinine was not altered in diabetic rats reinforcing the idea that 30 days after the induction of diabetes was insufficient to promote the kidney damage. Any condition which reduces glomerular filtration promotes increases in serum urea, however creatinine requires a higher deterioration of renal function.

In our study we did not observe significant changes in serum HDL-c and triglycerides in diabetic groups compared with control non diabetic rats. However, the diabetic-treated RT group (V) when compared to the control diabetic group (IV) showed lower results of total cholesterol and LDL-c. Table 3 shows that the administration of RT significantly decreased the total cholesterol and LDL-c without lowering HDL-c levels. We consider this a valuable finding since LDL-c is a highly atherogenic molecule and other studies have shown that RT displays a potential to prevent the formation of atherosclerosis and coronary heart diseases, severe clinical complications of diabetes (Nigdikar et al.1998). RT is a potent inhibitor of HMG-CoA

reductase thus we can suggest that the administration of RT contributes beneficially to prevent the lipid disorders in DM (Bok et al., 1999).

The diabetic group treated with RT (V) showed a significant reduction in ALT and  $\gamma$ -GT activities showing improves hepatic function caused by treatment with RT, which can be partly explained by the improvement of glycogenesis and gluconeogenesis confirmed by the decreased serum glucose. Also, flavonoids are mostly antioxidants that contribute to reduce the hepatic enzyme activity in rats with diabetes induced by STZ (Imaeda et al., 2002). It is important to emphasize that animals that received RT presented better  $\gamma$ GT, ALT, AST, serum ADA activities as well as LDL-c and total cholesterol concentration than rats receiving glibenclamide. Hence, these findings demonstrate the importance of researching new hypoglycemic substances as parameters that influence the measurement of metabolic disorders present in DM. In fact, other studies also observed that the RT causes a reduction of triglycerides by the enzymatic activation of pancreatic lipase, since in DM the inefficiency or lack of insulin inhibits the activity of this enzyme (Lima et al., 1999). According Han and Liu (2009), the diabetes causes many metabolic aberrations in exocrine acinar cells that lead to a decrease in ATP and NADPH contents, that reduction of ATP decreases cyclic  $Ca^{2+}$  signals, leading to impaired amylase secretion, and reduced NADPH content makes the acinar cells more vulnerable to ROS damage, leading to cholecystokinin (CCK) receptor insensitivity, factors that rutin probably can not reverse.

In conclusion, our experimental data demonstrate that a promising flavonoid, RT, has shown hypoglycemic effect and avoided the increase of the ADA activity in liver and serum. Furthermore, the increase of the ADA activity observed in diabetic rats may be an important indicator in the immune-pathogenesis of hyperglycemic disorders. Also, RT reduced the ALT and  $\gamma$ -GT activities decreasing the liver damage in diabetic rats; however, it was not able to decrease cardiac injury because the AST activity was not reduced the at same level of ALT activity. All data showed the importance of RT in the regulation of the enzyme activities against immune and damage liver associated with diabetes.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Federal University of Santa Maria (UFSM), RS and University of West of Santa Catarina (UNOESC), SC, Brazil, for support in this study.

## Conflict of Interest

There are no conflicts of interest.

## References

- American Diabetes Association., 2006. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 29 Suppl. 1, Jan, 43-48.
- Aherne, S.A., Brien, N.M., 2000. Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA single-strand breaks in caco-2, hep G2, and V79 cells. *Nutr. Cancer*. 38, 106–115.
- Argolo, A.C.C., Sant'Ana, A.E.G., Pletsch, M., Coelho, L.C.B.B., 2004. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresour. Technol.* 95, 229–233.
- Bayle, C.J., Day, C., 1989. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes care*. 12, 553-564.
- Bok, S.H., Lee, S.H., Park, Y.B., 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extractor a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr.* 129, 1182–1185.
- Bolzan, A.D., Bianchi, M.S., 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat. Res.*, 512, 121–134.
- Bopp, A., De Bona, K.S., Bellé, L.P., Moresco, R.N., Moretto, M.B., 2009. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and resuces glucose levels in hyperglycemic patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23, 501-507.
- Bota, A. et al., 2001. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR 647). *Clinical Chimica. Acta*, 306, 79–89.

- Fedosova, N.F., Alisieovich, S.V., Lyadov, K.V., Romanova, E.P., Rudko, I.A., Kubatiev, A.A., 2004. Mechanisms underlying diquertin-mediated regulation of neutrophil function in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Bull Exp. Biol. Med.* 137, 143–146.
- Fredholm, B.B., 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Review. *Cell Death Differ.* 14, 1315–1323.
- Fridewald, W.T., Levy, R.I., Frederickson, D.S., 1972. Estimation of concentration low-density lipoprotein in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clinchem.* 18, 499-502.
- Guisti, G., Galanti, B., 1984. Colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 315–323.
- Imaeda, A., Kaneko, T., Kondo, Y., Nakamura, N., Nagase, H., 2002. Antioxidant effects of fluvastatin and its metabolites against DNA damage in streptozotocin treated mice. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1415-1422.
- Johnson, I.T., 2001. Antioxidants and antitumor properties, in: J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in Food*, Wood head Publishing Ltd., Cambridge, 100–123.
- Jung, U.J., Lee, M.K., Jeong, K.S., Choi, M.S., 2004. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/ Ksj-db/db mice. *J. Nutr.* 134, 2499–2503.
- Kamalakkannan, N., Prince, P.S., 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98, 97-103.
- Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kuno, Y., 2000. Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. *Pharm. Dev. Technol.*, New York, 5, 77-85.
- Koshy, A.S., Vijayalakshmi, R., 2001. Impact of certain flavonoids on lipid profiles. Potential action of *Garcinia cambogia* flavonoids. *Phytother. Res.*, 15, 395-400.
- Kumar, A., Kaundal, R.K., Iyer, S., Sharma, S.S., 2007. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sciences* 80 (13), 1236–1244.
- Lima, L.R.P., Oliveira, T.T., Oliveira, M.G.A., Nagem, T.T., Pinto, A.S., Gomes, S.M., Filho, J.T.S., 1999. Determinação da atividade de lipase na presença de

- morina, naringenina, naringina e rutina. *Ciênc Agrotec*, Lavras. 23(3), 626-631.
- Maggirwar, S.B., Dhanraj, D.N., Somani, S.M., Ramkumar, V., 1994. Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 201, 508–515.
- Mezei, O., Banz, W.J., Steger, R.W., Peluso, M.R., Winters, T.A. and Shay, N., 2003. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients*, 58, 1238-1243.
- Naik, S.R., Filho, J.M.B., Dhuley, J.N., Deshmukh, A., 1999. Probable mechanism of hypoglycaemic activity of bassic acid, a natural product isolated from *Bumeliasartorum*. *J. Ethnopharmacol.* 33, 37–44.
- Nemeth, Z.H., Bleich, D., Csoka, B., Pacher, P., Mabley, J.G., Himer, L., et al., 2007. Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *Faseb J.*, 21, 2379–2388.
- Nigdikar, S.V., Williams, N.R., Griffin, B.A., Howard, A., 1998. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J. Clin. Nur.* 68, 258–265.
- Pashikanti, S., De Alba, D.R., Boissonneault, G.A., Cervantes-Laurean, D., 2010. Rutin metabolites: novel inhibitors of nonoxidative advanced glycation end products. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 656–663.
- Peterson, G.L., 1977. A simplifications of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83, 346-356.
- Pinent, M., Blay, M., Bladé, M.C., Salvadó, M.J. and Arola, L., 2004. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*, 145, 4985-4990.
- Rutkiewicz, J., Gorski, J., 1990. On the role of insulin regulation of adenosine deaminase activity in rats tissues. *FEBS Lett.* 271, 79-80.
- Sarkhail, P., Rahmaipour, S., Fadyevatan, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Amin, G., 2007. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipidperoxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacol. Res.* 56, 261–266.

- Schalkwijk, G.C. and Stehouwer, D. A. 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical A Science* 143-159.
- Schwedhelm, E., Maas, R., Troots, R., Boger, R., 2003. Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 437–459.
- Souza, A.M.F., Lopez, J.A. 2004. Insulin or insulin-like studies on unicellular organisms: a review. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 47, 973–981.
- Uz, E., Oktem, F., Yilmaz, H.R., Uzar, E., Ozguner, F., 2005. The activities of purine catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Mol. Cell. Biochem.*,277, 165–170.
- Virgili, F., Scaccini, C., Packer, L., Rimbach, G., 2001. Cardiovascular disease and nutritional phenolics, in: J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in Food*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 87–99.
- Wardas, J., 2002. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol. J. Pharmacol.* 54, 313–326.
- World Health Organization, 2009. Prevalence data of diabetes world wide 33, 37–44.



## Legends

**Fig. 1A:** ADA activity in serum. Bars represent means  $\pm$  SE ( $n=8$ ); <sup>a</sup>  $p < 0.01$  compared with normal control group values; <sup>b</sup>  $p < 0.01$  compared with diabetic control group values; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  compared with normal control group and diabetic treated with glibenclamide group values.

**Fig. 1B:** ADA activity in liver tissue. Bars represent means  $\pm$  SE ( $n=8$ ); <sup>a</sup>  $p < 0.01$  compared with normal control group; <sup>b</sup>  $p < 0.01$  compared with diabetic control group.

**Tables:**

**Table 1:**  
Changes in serum glucose levels in mg/dL during treatment.

Treatment period (days)	Groups / Glucose					
	I	II	III	IV	V	VI
0	105.3±6.3	100.9±8.5	105.1±5.9	440.0±20.4 <sup>a</sup>	517.3±18.1 <sup>a</sup>	516,8±25.5 <sup>a</sup>
10	107.6±7.4	102.6±5.2	101.1±5.4	464.4±28.9	488.5±38.7	484,9±30.1
20	119.9±8.9	138.5±13.1	132.5±9.6	467.3±22.4	458.3±20.2 <sup>bc</sup>	359,5±15.1 <sup>bc</sup>
30	144.1±4.4	151.5±8.8	146.9±5.7	479.4±15.9	411.0±41.4 <sup>bcd</sup>	393,4±21.3 <sup>bcd</sup>

Values are expressed as means ± S.E.; ( $n=8$ ). Group I: Normal control; Group II: Normal treated with glibenclamide; Group III: Normal treated with rutin; Group IV: Diabetic control; Group V: Diabetic treated with rutin; Group VI: Diabetic treated with glibenclamide.

<sup>a</sup>  $p < 0.0001$  compared with normal control values.

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared with respective 0 day values.

<sup>c</sup>  $p < 0.001$  compared with 0 day values.

<sup>d</sup>  $p < 0.05$  compared with diabetic control values.

**Table 2:**  
Changes body weight in gramas during treatment.

Treatment period (days)	Groups / Weight					
	I	II	III	IV	V	VI
0	330.3±23.0	307.7±22.6	313.8±31.1	306.4±30.9	276.9±19.2	300,8±21.4
10	350.3±24.2	325.1±23.6	334.6±35.3	280.0±27.4	241.8±15.3	288.9±25.1
20	346.3±18.2	321.4±21.2	321.3±01.2	254.1±18.1	242.9±22.2	263.5±22.0
30	363,1±20.3	336.8±24.9	352.6±40.1	228.8±15.7 <sup>a</sup>	218.8±13.7 <sup>a</sup>	251.5±24.2 <sup>a</sup>

Values are expressed as means ±S.E.; ( $n=8$ ). Group I: Normal control; Group II: Normal treated with glibenclamide; Group III: Normal treated with rutin; Group IV: Diabetic control; Group V: Diabetic treated with rutin; Group VI: Diabetic treated with glibenclamide.

<sup>a</sup>  $p < 0.0001$  compared normal control group values.

**Table 3:**

Serum biochemical parameters of all experimental groups, after 30 days.

Biochemical Parameters	Groups					
	I	II	III	IV	V	VI
CT (mg/dL)	112,3±12.5	104,5±8.0	105±6.2	119,8±8.4 <sup>b</sup>	91±3.0 <sup>b</sup>	104,3±7.4 <sup>b</sup>
LDL-c (mg/dL)	38,67±9.0	41,00±9.1	31,25±6.5	42,13±4.9 <sup>a</sup>	13,75±2.0 <sup>a</sup>	24,63±5.7 <sup>a,b</sup>
HDL-c (mg/dL)	60,17±3.2	52,75±2.3	54,38±2.0	52,00±3.0	54,75±2.4	55,63±3.6
TG (mg/dL)	103,3±17.9	81±6.5	80,5±5.8	119±18.7	113,5±12.1	115,8±14.5
AST (U/L)	150,3±22.1	181,1±22.0	213,8±26.7	375±89.0 <sup>c</sup>	358,4±27.0 <sup>c</sup>	402,9±68.4 <sup>c</sup>
ALT (U/L)	52,75±3.5	66,63±3.0	60,38±5.9	436±53.1 <sup>cb</sup>	227,6±41.8 <sup>bc</sup>	351,6±56.4 <sup>c</sup>
γ-GT (U/L)	5,25±0,2	5,1±0.2	5,25±0.4	12,57±2.6 <sup>cb</sup>	8,25±1.0 <sup>bc</sup>	12,75±2.6 <sup>c</sup>
CRE (mg/dL)	0,78±0,02	0,75±0,02	0,77±0,03	0,8±0,04	0,81±0,03	0,78±0,03
Urea (mg/dL)	44,25±2.7	45,63±3.9	49,25±3.2	78,25±7.0 <sup>c</sup>	88,13±13.6 <sup>c</sup>	81,75±9.6 <sup>c</sup>
Amylase (U/L)	1124±53.6	1114±101.1	1072±77.6	636±97.1 <sup>c</sup>	536,3±63.5 <sup>c</sup>	605±137.3 <sup>c</sup>

Values are expressed as means ±S.E.; (n=8). Group I: Normal control; Group II: Normal treated with glibenclamide; Group III: Normal treated with rutin; Group IV: Diabetic control; Group V: Diabetic treated with rutin; Group VI: Diabetic treated with glibenclamide. CT: Cholesterol Total; LDL-c: LDL-cholesterol; HDL-c: HDL-cholesterol; TG: Triacylglycerols; AST: Aspartate Aminotransferase; ALT: Alanine Aminotransferase; γ-GT: Gamma Glutamyltransferase; CRE: Creatinine.

<sup>a</sup> p < 0.01 compared with diabetic control group.

<sup>b</sup> p < 0.05 compared with diabetic control group.

<sup>c</sup> p < 0.01 compared with normal control group.

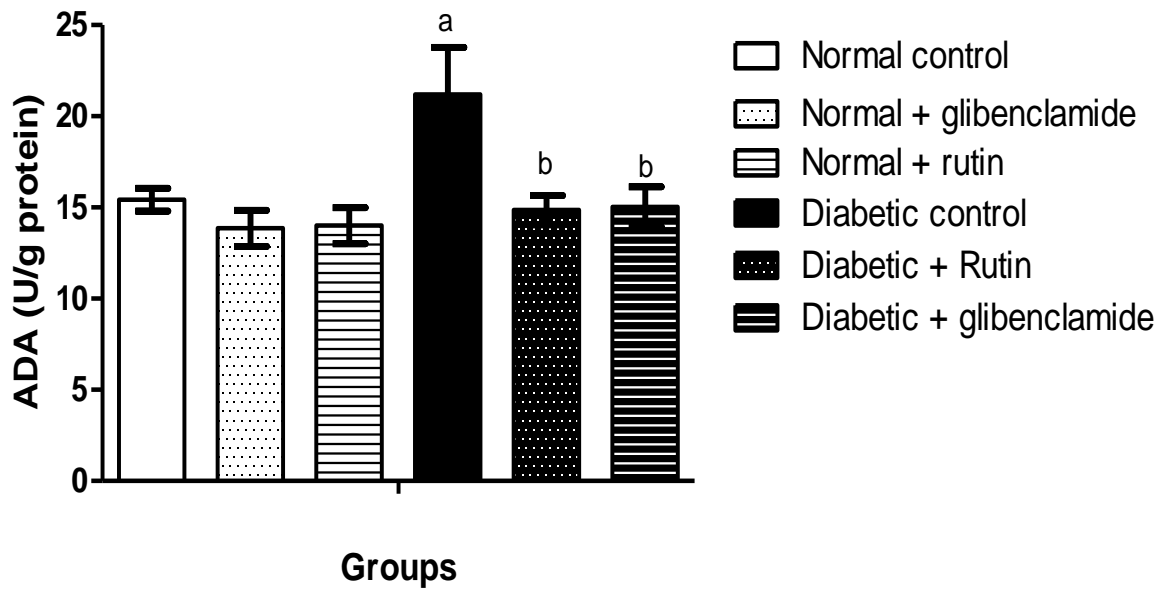
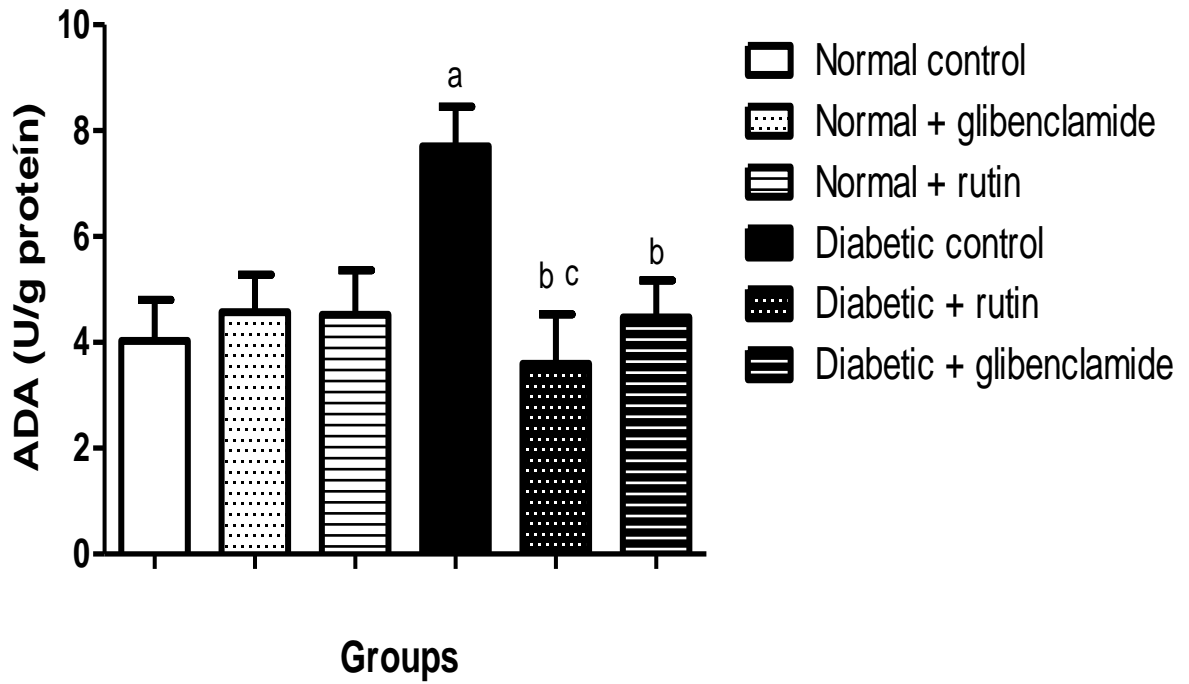
**Table 4:**

ADA activity in Kidney and brain tissue.

Tissue (U/g protein)	Groups					
	I	II	III	IV	V	VI
Kidney	49.58±7.8	40.59±7.4	52.4±57.1	48.06±5.4	46.36±5.6	46.38±7.1
Brain	4.85±0.5	5.83±1.2	5.55±0.5	5.41±0.5	5.28±0.9	4.45±0.5

Values are expressed as means ±S.E. (n=8). Group I: Normal control; Group II: Normal treated with glibenclamide; Group III: Normal treated with rutin; Group IV: Diabetic control; Group V: Diabetic treated with rutin; Group VI: Diabetic treated with glibenclamide.

Figures:





No presente estudo, avaliamos o efeito do flavonoide RT sobre a atividade da enzima ADA em soro e tecidos (hepático, renal e cerebral) em modelos animais de DM1. Ainda analisamos a influência deste fitoquímico sobre parâmetros bioquímicos.

As elevações das atividades da ADA sérica e hepática nos ratos diabéticos reforçam a ideia de que a atividade aumentada desta enzima exerce papel importante na fisiopatologia e nas complicações crônicas do DM1, uma vez que o aumento da atividade da ADA diminui as concentrações de ado que tem sido sugerido como um importante modulador da atividade da insulina (RUTKIEWICZ and GORSKI, 1990). No entanto, este trabalho evidenciou significativa diminuição da atividade da ADA no soro e no fígado de ratos diabéticos tratados com RT durante 30 dias, quando comparado com o controle diabético. Em parte este efeito pode ser explicado pela capacidade antioxidante deste flavonoide, visto que, a produção de espécies reativas foi mimetizada em tecidos de ratos tratados com RT, isto porque este flavonoide apresenta capacidade de transferir elétrons, neutralizar radicais livres e quelar metais catalizadores (FERRALI et al., 1997).

Observamos também que não houve aumento significativo da atividade da ADA no tecido cerebral e renal. É possível que o tempo do tratamento não tenha sido suficiente para causar alteração nestes tecidos, visto que as complicações renais e no sistema nervoso dos pacientes diabéticos ocorrem após alguns anos de desenvolvimento do DM.

Evidenciamos a diminuição das atividades das enzimas hepáticas ALT e  $\gamma$ -GT nos ratos tratados com este flavonoide, quando comparado com o grupo diabético não tratado, achado importante que sinaliza um efeito hepatoprotetor da RT. É possível que a capacidade antioxidante, a diminuição da peroxidação lipídica em ratos diabéticos (SARKHAIL et al., 2007), bem como a melhoria das enzimas da glicogênese e gliconeogênese possam ter contribuído para este resultado.

A atividade da AST não diminuiu significativamente depois do tratamento com RT o que pode sugerir uma participação importante de lesão cardíaca nos grupos diabéticos, visto que o tecido cardíaco tem uma participação significativa na produção desta enzima.

Neste estudo encontramos uma menor concentração sérica de glicose no grupo de diabéticos tratados com RT, também observamos que a redução significativa da glicose começa na terceira semana de tratamento e persiste durante a quarta semana. De acordo com MEZEI et al., (2003) e PINENT et al., (2004) a RT

proporciona uma redução de glicose no soro, na ausência de uma alteração significativa nas concentrações séricas de insulina, ao passo que esta redução envolve um mecanismo independente da insulina, assim, a RT exerceria o seu efeito hipoglicemiante por mecanismos extra pancreáticos possivelmente por estimular a utilização de glicose nos tecidos extra hepáticos. Por outro lado, estudos de KAMALAKKANNAN AND PRINCE (2006), mostram que a RT tem um papel protetor sobre as ilhotas pancreáticas e aumenta a secreção de insulina, além de melhorar o status antioxidante.

Em nosso estudo não detectamos alterações significativas nos níveis de colesterol sérico, LDL-c, HDL-c e triglicérides no grupo de animais diabéticos em comparação com os grupos saudáveis. No entanto, o grupo diabético tratado com RT mostrou resultados menores de LDL-c e colesterol total em comparação com o grupo diabético não tratado. De acordo com BOK et al., (1999), os flavonoides têm geralmente estas características, e a RT é um potente inibidor da HMG-CoA redutase. Assim, pode ser sugerido que a administração de RT contribui beneficemente para o metabolismo de ratos diabéticos, e poderia constituir um possível agente anti-aterogênico. Os ratos tratados com RT apresentaram redução LDL-c sem baixar os níveis de HDL-c. Este resultado pode indicar um papel preventivo da RT em relação a alterações do perfil lipídico de organismos diabéticos.





Os dados do presente estudo no permite concluir que:

- A atividade da ADA encontra-se aumentada no soro e no fígado no modelo experimental estudado, indicando que este pode ser um indicador importante das desordens imunes relacionadas a hiperglicemia.
- A RT promove redução da atividade da ADA no soro e no fígado nos animais diabéticos analisados, podendo auxiliar na manutenção dos níveis de ado e assim, influenciar os eventos inflamatórios locais e sistêmicos importantes no estado hiperglicêmico.
- A RT promove a diminuição da atividades das enzimas ALT e  $\gamma$ -GT nos ratos diabéticos, sugerindo um efeito hepatoprotetor deste flavonoide.
- A RT melhora o perfil lipídico e exerce efeito hipoglicêmico o qual parece estar relacionado a efeitos extra-pancreáticos, como a redução da atividade ADA, contribuindo dessa forma para a manutenção dos níveis de ado intra e extracelulares.



ADEGHATE, E.; ACHATNER, S.; DUNN, E. Update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1084, p. 1-29, 2006.

AFANAS'EV, J. B.; DOROZHKO, A. J.; BRODSKILL, A. V.; KOSTYUK, V. A.; PATAPOVITCH, A. I., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology, Amsterdam**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007 (Disponível em: <http://www.diabetes.org>).

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.29 Suppl 1, Jan, p.S43-8. 2006.

ANTONIADES, S.; TOUSOULIS, D.; MARINO, K., ET AL. Effects of insulin dependence on inflammatory process, thrombotic mechanisms and endothelial function, in patients with type 2 Diabetes Mellitus and coronary atherosclerosis. **Clin Cardiol** v. 30, p. 295-300, 2007.

BAE, E. A.; HAN, M. J.; LEE, K. T.; CHOI, J. W.; PARK, H. J.; KIM, D. H. Metabolism of 6'-O-xylosyltectoridin and tectoridin by human intestinal bacteria and their hypoglycemic and in vitro cytotoxic activities. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 22, p. 1314-1318, 1999.

BAGANHA, M. F. et al. Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic populations. **Chest**, v. 97, p. 605-610, 1990.

BARRETO, M. Causes and prevention of rutin (quercetina-3-O-rhamnoglucoside) crystal deposition in pickled asparagus (*Asparagus officinalis*). Arkansas, 2005. 124p. **Tese de Doutorado** – University of Arkansas.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W., Dietary Agents in Cancer Prevention: Flavonoids and Isoflavonoids. **Pharmacology Therapeut.** v. 90, p. 157-177, 2001.

BOKKENHEUSER, V. D.; SHACKLETON, C. H.; WINTER, J., Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. **Biochemical Journal**, v. 348, p. 953-956, 1987.

BOPP, A. et al. *Syzygium cumini* inhibits adenosine activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. **Fundam Clin Pharmacol**, v.23, p. 501-507, 2009.

BOTA, A. et al. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR 647). **Clinical Chimica. Acta**, v. 306, p. 79–89, 2001.  
BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature.**, v. 414(6865), p. 813-20, 2001.

COUCH, J. F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C. F., Buckwheat as source of rutin. **Science**, v. 103, p. 197-198, 1946.

CHARAMI, M.T. et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (*Lamiaceae*). **Phytother Res.** v.22, n.4, p.450-4, 2008.

CHAVES, M. M. F.; USBERTI, R., Prediction of *Dimorphandra mollis* bend (“faveiro”) seed longevity. **Revista Brasileira de Botânica, São Paulo**, v. 26, n. 4, p. 557-564, 2003.

COUCH, J.F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C.F. Buckwheat as a source of rutin. **Science**, Washington, v. 103, p. 197-198, 1946.

DA CUNHA, J. G. Adenosine deaminase. A pluridisciplinary enzyme. **Acta Méd. Port.**, v.4, p. 315–323, 1991.

DADDONA, P. E., Human adenosine deaminase. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 12496-501, 1981.

DE BONA, K. S. Efeito do extrato de *Syzygium cumini*, In Vitro, na atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e ésteres de colina e sobre o perfil oxidativo em pacientes com Diabetes *mellitus* tipo 2. **Dissertação de mestrado em Ciências farmacêuticas**, UFSM, Santa Maria, 2011.

DE BONA, K. S. *et al.*, *Syzygium cumini* Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5’Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients. **Cell Physiol Biochem**, v.26, p.729-738, 2010.

DE FRONZO, R. A.; BONNADONA, R. C.; FERRANINI, E., Pathogenesis of NIDDM – a balance overview. **Diabetes Care**. v. 15, n. 3, p. 318-68, 1992.

DIAMOND Project Group., Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999, v. 26, p. 857 – 866, 2006.

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

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 11 de maio de 2009. (Disponível em <http://lahad.wordpress.com/2009/05/11/diretrizes-da-sociedade-brasileira-de-diabetes/>).

DUART, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; TANARGO, J., Vasodilatador effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. **European Journal Pharmacology**, Amsterdam, v. 239, p. 1-7, 1993.

ERLICH, H.; VALDES, A. M.; NOBLE, J. et al., HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analyses of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, p. 57-1084, 2008.

FAN, M.; QIN, W.; MUSTAFA, S. J., Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, p. 1012- 1019, 2003.

FELDMAN J. M., JACKSON T. B., Specificity of nucleotide induced insulin secretion. **Endocrinology**, v. 94, p. 388–394, 1974.

FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI E, L. B.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P., DI MUZIO, B. P., GUMARÃES, J.F. C.; JUNIOR, A.F., Influence of Rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine&Pharmacotherapy**, 214-219, 2010.

FERRALI, M.; SIGNOFRINI, C.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, D.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M., Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, v. 416, p. 123–139, 1997.

FORMENTO, M. L.; BORSA, M.; ZONI, G., Steroidogenic effect of adenosine in the rat. **Pharmacol. Res. Commun**, v. 7, p. 247–257, 1975.

FRANCO, R. et al., Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunol Rev**, v. 161, p. 27-42, 1998.

GILLESPIE, K. M., Type 1: pathogenesis and a prevention. **CMAJ**, v. 175, p. 165 – 170, 2006.

GUERRA, M. O.; BECHO, J. R. M.; MACHADO, H., Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de estudos experimentais**, v.1, n.1, p. 21-25, 2009.

HABIBUDDIN, M. et al., Antidiabetic effect of alcoholic extract of *Caralluma sinaica* L. on streptozotocin-induced diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol**, v.8, n.117(2), p. 215-20, 2008.

HAJER, G. R.; VAN HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F.L.J., Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal**, v. 29, n. 24, p. 2959-71, 2008.

HOLLMAN, P. C.; VAN TRIPP, J.; BUYSMAN, M. N.; VAN DER GAAG, M. S.; MENGELERS, M. B., Relative Bioavailability of the flavonoid quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies letters**. n. 418, p. 152-156, 1995.

HOU, C. C.; LIN, S. J.; CHENG, J. T.; HSU, F. L. Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycoside from *Lactuca indica*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 625-629, 2003.

HOUNSOM, L.; TOMLISOM, D. R., Does neuropathy develop in animal models? **Clin. Neurosci**, v. 4, p.380-89, 1997.

ICHINOSE, Y.; NAITO, K.; ISHIGA, Y.; TOYODA, K.; SHIRAIISHI, T., N-terminal domain including conserved flg22 is required for flagellin-induced hypersensitive cell death in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of General Plant Pathology**. v. 73 (4), p. 281-285, 2007.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P.S., Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Basic Clin. Pharmacol Toxicol**, v. 98, p. 97-103, 2006.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global Burden of diabetes, 1995-2025. **Diabetes Care** 1998; 21: 1414-31.

KOSHY, A.S.; VIJAYALAKSHMI, R., Impact of certain flavonoids on lipid profiles. Potential action of *Garcinia cambogia* flavonoids. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 395-400, 2001.

KUKREJA, R. C. Role of KATP Channel in Heat Shock and Pharmacological Preconditioning. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 874, p. 211-221, 1999.

LAMBA, S. S.; BUCH, K.Y.; LEWIS, H.; LAMBA, H. J. Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, p. 457-495, 2000.

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

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N., Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J. Ethnopharmacol.**, v. 92, p. 1-21, 2004.

LIKE, A. A.; ROSINI, A. A., Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. **Science**. v. 193, p. 415-17, 1976.

LUPIDI, G. et al., Adenosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*: interaction with ground and transition state analogs. **Biochim Biophys Acta**, v. 1122, p. 311-316, 1992.

MACHADO, H., Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich "in vivo". 2006. 125f. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MALERBI, D. A.; L. J. FRANCO., Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**, v.15, n.11, Nov, p.1509-16. 1992.

MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNE, C.; TESIER, O.; REGERAT, F.; REMESY, C., Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 409, p. 12-16, 1997.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R., Antidiabetic plants and their active constituents. Review. **Phytomedicine**, v. 2, p. 137-189, 1995.

MARTÍNEZ-FLOREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J., Revisión: Los Flavonoids: propiedades acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral, Madrid**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MEIGS, J. B., Epidemiology of cardiovascular complications in type 2 diabetes. **Acta Diabetol**, v. 40, p. 358-361, 2003.

MEZEI, O.; BANZ, W.J.; STEGER, R.W.; PELUSO, M.R.; WINTERS, T.A.; SHAY, N., Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese zucker rats and murine RAW 264.7. cells. **Biochemical and Molecular Actions of Nutrients**, v. 58, p. 1238-1243, 2003.

MERZOUK, S.; HICHAMI, A.; SARI, A.; MADANI, S.; HABANE, S.N.; KHAN, N.A., Impaired oxidant/antioxidant status and LDL-fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of LDL in diabetic patients. **General Physiology and Biophysics**, v. 23, p. 387-399, 2004.

MCLANE, M. P.; BLACK, P. R.; LAW, W. R.; RAYMOND, R. M., Adenosine reversal of in vivo hepatic responsiveness to insulin. **Diabetes**, v. 39, p. 62-69, 1990.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 673-751, 2000.

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

MILLER, E.G. et al., Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. **Nutr Cancer**. v.60, n. 1, p.69-74, 2008.

MORRISH, N. J. et al., Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. **Diabetologia**, v. 44, p.14-21, 2001.

MUROTA, K.; TERAOKA, J., Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 417, p.12-17, 2003.



NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREM, K.; LEEUWEN, P. A. M., Flavonoids: a review of probable mechanisms action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition, USA**, v. 74, p. 418-25, 2001.

OLIVEIRA, D. M. Influência da Ingestão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo da glicose em ratos Wistar. USP; São Paulo. **Dissertação em Saúde Pública**; 2008.

OOMAH, B.D.; MAZZA, G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 44, n. 7, p. 1746-1750, 1996.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia, Amsterdam**, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.  
PEART, J. N.; GROSS, G. J., Cardioprotection following adenosine kinase inhibition in rat hearts. **Basic Res Cardiol**, v. 100, p. 328–336, 2005.

PEDRIALI, C. A., Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas**. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PICKUP J.C.; WILLIAMS G., Epidemiology of diabetes mellitus. In: Text book of diabetes, **Blackwell, Oxford**, v. 1 e 2 p 3.1–3.28 1997.

PINENT, M.; BLAY, M.; BLADÉ, M.C.; SALVADÓ, M.J.; AROLA, L., Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. **Endocrinology**, v. 145, p. 4985-4990, 2004.

PODGORSKA, M. et al., Prevalence of unidirectional Na<sup>+</sup>-dependent adenosine transport and altered potential for adenosine generation in diabetic cardiac myocytes. **Basic Res Cardiol**, v.101, p. 214 – 222, 2006.

PRINCE. P.; STANLE, Y. MAINZEN AND N. KAMALAKKANNAN., Rutin Improves Glucose Homeostasis in Streptozotocin Diabetic Tissues by Altering Glycolytic and Gluconeogenic Enzymes. **J Biochem molecular toxicology**; v.20; 2006.

REIS, J. S.; VELOSO, C.A.; MATTOS, R.T.; PURISH, S.; MACHADO, J.A.N., Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivo Brasileiro de endocrinologia e Metabologia**, v. 52, p. 1096-1105, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. B.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B., The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic favonoids. **Free Radical Research**, Basingstoke, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.

RODWELL, V. W. Estrutura, função e replicação das macromoléculas informacinais. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W., **Harper: Bioquímica**. 8 ed. Atheneu, São Paulo, 1998.

ROSALES, O. R.; EADES, B.; ASSALI, A. R., Cardiovascular drugs: adenosine role in coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. **Catheter Cardiovasc Interv**, v. 62, p.358–363, 2004.

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

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 251-265, 2002.

SARKHAIL, P. et al., Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. **Pharmacological research**, p. 261-266, 2007.

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

SHAIK, Y. B. et al., Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. **J Biol Regul Homeost Agents**. v.20, n. 3-4, p.47-52, 2006.  
SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 3° Ed, Itapevi – SP, 2009.

TITARENKO, O. T. et al., Adenosine deaminase in the complex diagnosis of different forms of extrapulmonary tuberculosis. **Probl Tuberk Bolezn Legk**. Review. v. 11, p.14-18, 2006.

THAI, A.; EINSENBARTH, S., The natural history of IDDM. **Diabetes Ver.** v. 1, n. 1, p. 1-14, 1993.

TODD, J. A.; BELL, J. I.; McDEVIN, H. O., HLA DQb gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature.** 1987,329-599.

UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H.; NAGAI, H.; OKAMOTO, H. Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. **Diabetes.** v. 32, p.316-18, 1983.

WALLE, T., Absorption and metabolism of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.** Orlando, v. 36, n. 7, p. 829-34, 2004.

WANG, H. X.; NG, T. B., Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antithrombotic and antithrombotic activities. **Life Science,** v. 65, p. 2663-2677, 1999.

WEIR, G.C.; KNOWLTON, S.D.; MARTIN, D.B., Nucleotide and nucleoside stimulation of glucagon secretion. **Endocrinology,** v. 97, p. 932–936, 1975.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H., Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care,** v. 27, p. 1047-53, 2004.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology,** v. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

WOLF, F., COOK G. H., Activation of steroidogenesis and adenylate cyclase by adenosine in adrenal and Leydig tumor cells. **J. Biol. Chem.** v. 252, p. 687–693. 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION., Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. **Geneva, World Health Organization,** p. 59, 1999.












YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H., Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. **Nature.** v. 294, p. 284-86, 1981.

## ANEXO

**Food and Chemical Toxicology**

Contact us   
Help ?

 [home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

+ Action 	Manuscript Number  	Title  	Initial Date Submitted  	Status Date  	Current Status  
<p style="text-align: center;"><a href="#">Action Links</a></p> <p><a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Artwork</a> <a href="#">Quality Results</a></p>		Rutin restores enhanced serum and liver Adenosine deaminase activity and improves glucose and hepatic markers in streptozotocin-induced diabetic rats	Jul 04, 2012	Jul 04, 2012	Submitted to Journal