



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

**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**

**Karine Santos De Bona**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

**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**

**Karine Santos De Bona**

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 obtenção do grau  
de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador (a): Profa. Dra. Maria Beatriz Moretto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**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 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**

elaborada por  
**Karine Santos De Bona**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Maria Beatriz Moretto, Dra.  
(Orientadora)**

**Cinthia Melazzo Mazzanti, Dra. (UFSM)**

**Rosélia Spanevello, Dra. (UFPEL)**

**Santa Maria, fevereiro, 2011.**

*Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e a minha irmã, pelo amor, carinho, apoio, compreensão e companheirismo, por sustentarem comigo cada minuto de dificuldade e alegria, e por proporcionarem plenas condições para que eu pudesse concretizar meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades que me proporcionou, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

A minha família, pais, irmãos, vó, cunhada e cunhado e afilhada linda, pelo amor, compreensão e carinho em todos os momentos. Obrigada por me apoiarem nas escolhas que fiz, pelos elogios e incentivos e por estarem ao meu lado e fazerem parte dos momentos mais felizes da minha vida.

Ao meu namorado e maior incentivador para que eu chegasse até aqui, agradeço pela paciência, convívio, carinho, compreensão e apoio nas horas mais difíceis.

As minhas amigas Karina, Gabriela, Aline Bopp, Aline Lima, Juliana, Jaqueline, Camila Gewehr, Camila Gobbato e Michele por estarem sempre presentes na minha vida, pelos momentos de descontração, jantinhas, festas, conversas, conselhos...enfim...por todos esses anos de convivência e amizade!!!!

As colegas do LAB 1207, Luziane, Paula e Lariane, e aos mais novos integrantes do grupo, Pricila e Tiago pelos momentos agradáveis durante o período de trabalho e companheirismo no laboratório.

Aos amigos que passaram pelo laboratório: Faída, Marcel, Franciele e Gisele, muito obrigada pelos momentos de convívio.

Aos queridos amigos Victor e Francielle: muito obrigada pela convivência, pela amizade, pela ajuda na realização deste trabalho, pelas palavras de apoio e incentivo...sinto muita saudade de vocês!!!!

A Gabriela Bonfanti, que se tornou além de colega de laboratório, uma grande amiga!! Obrigada pela ajuda de sempre, pelas conversas e momentos de descontração, és muito especial!!!!

Aos meus vizinhos de laboratório pelo convívio e pela aptidão em ajudar nas mais diversas situações.

Aos funcionários do DACT pela amizade, paciência e dedicação, por estarem sempre dispostos a ajudar e colaborar com a realização deste trabalho...muito obrigada!!

Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas que de alguma maneira contribuíram para a construção do meu conhecimento científico.

As professoras, Rosélia Spanevello e Cinthia Mazzanti e ao professor Ricardo Brandão por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

A CAPES, pela bolsa concedida!

Ao querido Paulo, funcionário do PPG, pela sua paciência, dedicação, por estar sempre disposto a ajudar e solucionar os problemas....o meu muitíssimo obrigada!!!!

As funcionárias do CEDAS que foram de extrema importância na realização deste trabalho, sempre me incentivando e ajudando nos momentos que mais precisei!!!!

A professora Maria Beatriz:

Não tenho palavras suficientes para dizer pelo tanto que tenho a agradecer ... muito obrigada pela sua paciência, dedicação e sabedoria...por ter me incentivado, compartilhando, se dedicando, vibrando e me encorajando SEMPRE!!!! A cada dia aprendi mais e mais contigo, e sei que muito ainda vou aprender!! “ Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida. Não é o que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas o que questiona e desperta para a realidade.” És uma grande professora, e mais do que isso, uma GRANDE AMIGA!!!! MUITO OBRIGADA!!!!

## RESUMO

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

### **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**

Autora: Karine Santos De Bona

Orientadora: Maria Beatriz Moretto

Data e Local de defesa: Santa Maria, 01 de fevereiro de 2011.

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), ecto-5' nucleotidase (5'NT) e acetilcolinesterase (AChE) são importantes enzimas responsáveis por regular os níveis de adenosina (ado) e acetilcolina (ACh), respectivamente, e alterações nas suas atividades têm sido demonstradas em várias doenças, incluindo o DM. O *Syzygium cumini* é uma das plantas mais utilizadas no tratamento do DM, apresenta propriedades hipoglicêmicas, antiinflamatórias, antipiréticas e antioxidantes. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do extrato aquoso das folhas de *Syzygium cumini* (ASc), nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, *in vitro*, sobre as enzimas 5'NT em plaquetas, ADA em eritrócitos e plaquetas e AChE em eritrócitos, bem como sobre parâmetros de estresse oxidativo em amostras de pacientes diabéticos Tipo 2. Os resultados demonstraram um aumento na atividade das enzimas ADA e 5'NT em plaquetas de diabéticos (n=30) em relação ao grupo controle (n=17), assim como nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). ASc, nas concentrações de 100 e 200 µg/mL foi capaz de reverter estes efeitos. Correlações entre a atividade da 5'NT e os níveis de triglicerídeos, bem como entre a atividade da ADA e os níveis de glicose também foram encontradas nesse trabalho. Um aumento na atividade das enzimas ADA e AChE em eritrócitos de pacientes com Diabetes tipo 2 (n=30) em relação ao grupo controle (n=20), além de alterações nos parâmetros de estresse oxidativo, como aumento nos níveis de TBARS e redução na atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) e nos níveis de grupamentos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) nessas células também foram observados. Igualmente, ASc reduziu a atividade das enzimas ADA e AChE e a lipoperoxidação, e reverteu o efeito dos parâmetros oxidantes avaliados. Ainda foram encontradas correlações positivas significativas entre os níveis de Vitamina C e grupamentos sulfidrílicos protéicos (P-SH), glicose plasmática e níveis de P-SH e NP-SH, níveis de P-SH e atividade da ADA, além de correlação negativa entre os níveis de TBARS e NP-SH. Portanto, é possível sugerir que o ASc foi capaz de promover uma resposta compensatória na função plaquetária, podendo atuar na manutenção dos níveis de adenosina e na vasodilatação e, assim, contribuindo para a manutenção da integridade vascular importante no estado hiperglicêmico, tendo em vista o papel cardioprotetor exercido pela mesma. Também é possível que ASc possa modular os níveis de ACh, interferindo no estresse oxidativo e/ou nos processos inflamatórios provenientes do estado diabético. Ao mesmo tempo esses resultados corroboram com as já conhecidas propriedades antioxidantes de *Syzygium cumini*, o que faz com que esse composto apresente efeitos significativos no metabolismo celular, bem como na redução e prevenção do risco de doença cardiovascular em diabéticos.

**Palavras chaves:** Acetilcolinesterase; Adenosina deaminase; Diabetes *mellitus*; Ecto- 5' Nucleotidase; Estresse Oxidativo; *Syzygium cumini*;

## ABSTRACT

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

### **EFFECT OF *SYZYGIUM CUMINI* EXTRACT, *IN VITRO*, ON THE ACTIVITY OF ENZYMES THAT DEGRADE ADENINE NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDES AND ESTERS OF CHOLINE AND ON THE OXIDATIVE PROFILE IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

Author: Karine Santos De Bona

Advisor: Maria Beatriz Moretto

Place and Date: Santa Maria, february 01, 2011.

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder of multiple etiology characterized by chronic hyperglycemia resulting from deficiency of production and / or insulin action. This state of hyperglycemia may cause a variety of cardiovascular, renal, neurological and eye complications. Adenosine deaminase (ADA), ecto-5' nucleotidase (5'NT) and Acetylcholinesterase (AChE) are important enzymes responsible for regulating the levels of adenosine (ado) and acetylcholine (ACh) respectively, and changes in their activities have been demonstrated in various diseases, including Diabetes. *Syzygium cumini* is a plant mostly used for the treatment of DM and presents hypoglycemic, anti-inflammatory, antipyretic and antioxidants properties. The aim of this study was to verify the effect of aqueous leaf extract of *Syzygium cumini* (ASc) in 100 and 200µg/mL concentrations, *in vitro*, on enzymes 5'NT in platelets, ADA in erythrocytes and platelets and AChE in erythrocytes, as well as on parameters of oxidative stress in samples of Type 2 diabetic patients. The results showed an increase in the activity of ADA and 5'NT in platelets from diabetic (n=30) compared to the control group (n=17), as well as in the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS). ASc at concentrations of 100 and 200 µg / mL was able to reverse these effects. Correlations between 5'NT activity and triglycerides levels, as well as between ADA activity and glucose levels were also found in this work. An increase in the activity of enzymes ADA and AChE in erythrocytes of patients with type 2 diabetes (n=30) compared to the control group (n=20), as well as changes in parameters of oxidative stress, such as increased levels of TBARS and decrease in superoxide dismutase (SOD) activity and levels of non-protein sulfhydryl groups (NP-SH) in these cells also were observed. Likewise, ASc reduced the ADA and AChE activities and lipid peroxidation, and reversed the effect of the evaluated oxidative parameters. Still, there were found significant positive correlations between levels of Vitamin C and protein sulfhydryl groups (P-SH), plasma glucose and levels of P-SH and NP-SH, levels of P-SH and ADA activity, besides a negative correlation between TBARS and NP-SH levels. Therefore, it is possible to suggest that the ASc was able to promote a compensatory response in the platelet function and may act in the maintenance of adenosine levels and vasodilatation and thereby, contributes to the maintenance of the vascular integrity which is important in the hyperglycemic state. It is also possible that ASc might modulate the levels of ACh, interfering with oxidative stress and / or inflammatory processes from the diabetic state. So far, these results confirm the already known antioxidants properties of *Syzygium cumini*, which makes this compound present significant effects on the cellular metabolism, as well as the reduction and prevention of cardiovascular disease risk in diabetics.

**Keywords:** Acetylcholinesterase; Adenosine deaminase; Diabetes *mellitus*; Ecto-5' Nucleotidase; Oxidative stress; *Syzygium cumini*;

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA- Ácido Ascórbico

ASc- Extrato aquoso de *Syzygium cumini*

ado- Adenosina

AChE- Acetilcolinesterase

ACh- Acetilcolina

ADA-Adenosina desaminase

ADP- Difosfato de adenosina

AIDS- Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

AMP- Monofosfato de adenosina

ATP- Trifosfato de adenosina

A1c- Hemoglobina glicada

BuChE- Butirilcolinesterase

ChAT- Colina acetiltransferase

ChT- Transportador de colina

CAT- Catalase

CMP- 5'- citidina monofosfato

dAdo- 2' Desoxiadenosina

DM- Diabetes mellitus

DPPIV- Dipeptidil Peptidase IV

Ecto-ADA- Ecto-adenosina desaminase

EHNA- Hidrocloroeto de eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil) adenina

ERNS- Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs- Espécies Reativas de Oxigênio

GPI- Glicosil fosfatidilinositol

GPx- Glutathione Peroxidase

GSH- Glutathione

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de Hidrogênio

HNO<sub>2</sub>- Ácido Nitroso

IDDM- Diabetes mellitus insulino-dependente

IMP- 5'- inosina monofosfato

LADA- Doença auto-imune latente em adultos

mAChR- Receptores de Ach muscarínicos

MDA- Malondialdeído

nAChR- Receptores de Ach nicotínicos

NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO<sup>•</sup> - Óxido Nítrico

NIDDM- Diabetes mellitus não insulino-dependente

N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Óxido Nitroso

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitritos

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Nitratos

RBC- red blood cells

·RO<sup>•</sup> - Peroxila

SAH- S adenosilhomocisteína

SH- grupos sulfidril

Sc – *Syzygium cumini*

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS- Espécies Reativas ao ácido tiobarbitúrico

TOTG- Teste oral de tolerância à glicose

$\cdot O_2^-$  - Superóxido

$\cdot OH^-$  - Hidroxila

UMP- 5'- uridina monofosfato

VACHT- Transportador de acetilcolina vesicular

5'NT- Ecto- 5' Nucleotidase

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1</b> - Vias de produção, metabolismo e transporte de adenosina .....	34
<b>Figura 2</b> - A) Estrutura da ecto-5' Nucleotidase ancorada à membrana; B) Estrutura cristalina da enzima ecto-5' Nucleotidase .....	35
<b>Figura 3</b> - 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 representadas em rosa e amarelo, respectivamente .....	37
<b>Figura 4</b> - Reações catalizadas pela ADA, tendo como substrato a adenosina (ado) e a 2'-desoxiadenosina (d-ado) .....	38
<b>Figura 5</b> - Produção e circulação da ACh como um dos principais moduladores vasculares.....	41
<b>Figura 6</b> - A) Estrutura da enzima AChE; B) Isoformas da enzima AChE.....	42
<b>Figura 7</b> - Célula sofrendo ação pelos radicais livres .....	45
<b>Figura 8</b> - Balanço entre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os diferentes tipos de sequestradores de radicais livres .....	45
<b>Figura 9</b> - Mecanismo enzimático antioxidante .....	47
<b>Figura 10</b> - Estrutura química da vitamina C.....	49
<b>Figura 11</b> - Autoxidação de monossacarídeos redutores.....	51
<b>Figura 12</b> - Processo de glicação não enzimática .....	52
<b>Figura 13</b> - Via do polióis ativada na hiperglicemia e espécies reativas.....	53
<b>Figura 14</b> - Representação de uma célula plaquetária .....	55
<b>Figura 15</b> - <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels (Scc) (sin. <i>Eugenia jambolana</i> Lam. <i>Syzygium jambolanum</i> DC).....	59

## ARTIGO

**Figura 1** - A. HPLC fingerprint of the *Syzygium cumini* aqueous leaves extract showing typical patterns of gallic acid (1), kaempferol(2), chlorogenic acid (3) and rutin (4) in the 257 nm.

B. Molecular structures of compounds found in the ASc.....67

**Figura 2** - *In vitro* exposure of platelets obtained from diabetics and control patients to ASc on 5'NT activity. ....68

**Figura 3** - A. Effect of ASc on ADA activity in platelets obtained from diabetics and control patients *in vitro*.

B. Effect of *in vitro* exposure of platelets obtained from type 2 DM patients to ASc and 100  $\mu$ M EHNA on ADA activity. ....68

**Figura 4** - Effect of *in vitro* exposure of platelets obtained from type 2 DM and control patients to ASc on TBARS levels.....69

**Figura 5** - A. Association between platelets 5'NT activities and triglycerides levels.

B. Association between platelets ADA activities and glucose levels.....69

## MANUSCRITO

**Figura 1** – Molecular structures of compounds found in the *Syzygium cumini* aqueous leaf extract.....96

**Figura 2** - Effect of ASc on ADA activity in ghosts obtained from diabetics and control patients *in vitro*.....97

**Figura 3** - *In vitro* exposure of erythrocytes obtained from diabetics and control patients to ASc on AChE activity.....97

**Figura 4** - Effect of *in vitro* exposure of ghosts obtained from type 2 DM and control patients to ASc on TBARS levels.....98

**Figura 5**- Effect of exposure of erythrocytes to ASc on NP-SH levels from type 2 DM and control patients, *in vitro*.....98

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1:** Antidiabéticos orais disponíveis comercialmente no Brasil.....32

### ARTIGO

**Table 1.** Biochemical and hematological parameters of the experimental groups....67

**Table 2.** Levels of antioxidants enzymes in platelets of different study groups.....69

### MANUSCRITO

**Table 1.** Clinical characteristics of the experimental groups.....94

**Table 2.** Levels of antioxidants in control group and patients with type 2 DM.....95

**Table 3.** Correlations between biochemical estimations in the Type 2 DM group....96

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> – Comprovante de submissão do artigo à revista European Journal of Pharmacology.....	131
<b>ANEXO B</b> – Produção bibliográfica .....	132

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	04
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	05
<b>RESUMO</b> .....	07
<b>ABSTRACT</b> .....	08
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	09
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	12
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	14
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	15
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	18
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	23
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	23
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>3.1 Diabetes <i>mellitus</i></b> .....	26
3.1.1 Histórico.....	26
3.1.2 Conceito e fisiopatologia.....	27
3.1.3 Epidemiologia.....	28
3.1.4 Classificação.....	28
3.1.5 Diagnóstico.....	30
3.1.6 Controle e tratamento do DM.....	31
<b>3.2 Sistema Purinérgico</b> .....	32
3.2.1 Adenosina.....	33
3.2.2 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina.....	34
3.2.2.1 Ecto-5' Nucleotidase.....	34
3.2.2.2 Adenosina desaminase.....	36
3.2.2.3 Isoformas da ADA.....	38
<b>3.3 Colinesterases</b> .....	40

3.3.1 Acetilcolinesterase.....	42
<b>3.4 Radicais Livres.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5 Estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidantes.....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Defesas antioxidantes enzimáticas.....	47
3.5.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas.....	48
<b>3.6 Peroxidação lipídica.....</b>	<b>50</b>
<b>3.7 Estresse oxidativo e Diabetes <i>mellitus</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>3.8 Plaquetas.....</b>	<b>53</b>
<b>3.9 Eritrócitos.....</b>	<b>55</b>
<b>3.10 Plantas medicinais e Diabetes <i>mellitus</i>.....</b>	<b>56</b>
3.10.1 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	57
<b>4. MÉTODOS E RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
4.1 Artigo.....	63
4.2 Manuscrito.....	75
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>107</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação foi escrita sob a forma de artigo publicado e manuscrito submetido à publicação. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigo e manuscrito e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o artigo e 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.

Os artigo e o manuscrito estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas na qual foram submetidos:

Artigo publicado: Cellular Physiology and Biochemistry

Manuscrito: European Journal of Pharmacology

---

## 1. INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia, que altera o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (KISS *et al.*, 2006), além de provocar uma série de complicações cardiovasculares, renais, neurológicas e oculares (MAHDI *et al.*, 2003). DM está situada entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais e, apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato as suas consequências letais (NORTHAM *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante endógena (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003), e tem sido implicado em várias doenças, dentre elas o DM (HALLIWELL, 1997). Modelos experimentais de estresse oxidativo demonstram aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos (BATNA & FUCHS, 1997; KONDO *et al.*, 1997; FERNANDEZ & FINK, 2000), e, conseqüentemente, a ocorrência de uma cascata de eventos que leva a oxidação de lipídios e proteínas (BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2000). Além disso, a morfologia e a função das plaquetas também podem estar alteradas em pacientes com DM (STRATMANN & TSCHOEPE, 2005), e vários estudos demonstram um aumento da reatividade plaquetária nestes pacientes (ROSOVE *et al.*, 1984; SOBOL & WATALA, 2000; CARR, 2001).

Os nucleotídeos de adenina, ATP (trifosfato de adenosina) e ADP (difosfato de adenosina), e o nucleosídeo correspondente adenosina (ado), representam uma importante classe de moléculas extracelulares que, ao interagirem com receptores específicos, sinalizam vias que são importantes para o funcionamento celular (SOSLAU & YOUNGPRAPAKORN, 1997; RATHBONE *et al.*, 1999).

A enzima ecto- 5' nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5, 5' NT) é uma enzima capaz de promover a hidrólise de AMP (monofosfato de adenosina; produzido a partir da hidrólise de ATP e ADP) a adenosina (ZIMMERMANN, 1996; COLGAN *et al.*, 2006). A Adenosina desaminase (EC 3.5.4.4, ADA) catalisa a hidrólise de adenosina para inosina, e está localizada no citosol e na membrana celular (IWAKI-EGAWA *et al.*, 2004; IBIS *et al.*, 2007). Dados recentes têm demonstrado alterações na atividade das enzimas 5'NT e ADA em pacientes hiperglicêmicos e com DM tipo 2 (BOPP *et al.*, 2009; DE BONA *et al.*, 2010) e em modelos experimentais de diabetes

(SCHMATZ *et al.*, 2009) indicando que a sinalização purinérgica pode estar alterada no estado diabético.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima regulatória capaz de provocar a rápida hidrólise e inativação da acetilcolina (ACh) (GRISARU *et al.*, 1999; SOREQ & SEIDMAN, 2001), e alterações na sua atividade têm sido relacionadas a patologias como o DM (SANCHEZ-CHAVEZ & SALCEDA, 2000; KUHAD *et al.*, 2008). A ACh provoca vasodilatação em artérias coronárias normais (COX *et al.*, 1989), além de facilitar a liberação de insulina em um modo dependente de glicose (GILON & HENQUIN, 2001).

O *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Sc) é uma das plantas mais utilizadas no tratamento do DM. É uma árvore originária da Índia, pertencente à família *Mirtaceae*, vulgarmente conhecido no Brasil como Jambolão (MAZZANTI *et al.*, 2004). O Sc apresenta propriedades hipoglicemiantes, antiinflamatórias, antipiréticas e antioxidantes (MORESCO *et al.*, 2007). No entanto, estudos objetivando avaliar os efeitos do *Syzygium cumini* sobre as enzimas 5'NT, ADA e AChE em plaquetas e eritrócitos de pacientes com DM tipo 2, *in vitro*, ainda são pouco documentados na literatura. Nesse contexto, considerando que o DM pode desencadear alterações nas principais enzimas envolvidas no metabolismo da adenosina, bem como na AChE e no perfil oxidativo, é de grande interesse clínico e científico verificar o efeito do Sc sobre estes parâmetros em pacientes diagnosticados como diabéticos Tipo 2.

---

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato aquoso das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (ASc) sobre a determinação da atividade das enzimas 5'NT, ADA e AChE, e sobre parâmetros de estresse oxidativo, *in vitro*, em amostras de pacientes portadores de Diabetes *mellitus* tipo 2.

## 2.2 Objetivos específicos

Em amostras de plaquetas:

- Determinar a atividade das enzimas 5'NT e ADA.
- Identificar as isoformas da ADA presentes nas plaquetas, utilizando Eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil) adenina (EHNA), um potente inibidor da ADA1.
- Determinar o nível de peroxidação lipídica, através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Determinar a atividade das enzimas do sistema antioxidante endógeno, tais como Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD).
- Avaliar a ação do extrato aquoso das folhas de *Syzygium cumini* sobre a atividade das enzimas 5'NT e ADA, e sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, *in vitro*.

Em amostras de eritrócitos:

- Determinar a atividade das enzimas ADA e AChE.
- Determinar o nível de peroxidação lipídica, através da medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

- Determinar a atividade das enzimas do sistema antioxidante endógeno, tais como CAT e SOD.
- Determinar os níveis sanguíneos de antioxidantes não enzimáticos como o SH (grupo sulfidril) proteico e não proteico.
- Avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas de *Syzygium cumini* sobre a atividade das enzimas ADA e AChE, e sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e níveis de SH não proteico, *in vitro*.

Em amostras de plasma:

- Determinar os níveis sanguíneos de antioxidantes não enzimáticos como o SH (grupo sulfidril) proteico e Vitamina C.
- Verificar possíveis correlações entre as variáveis, a partir dos resultados obtidos.

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3.1 Diabetes *mellitus*

#### 3.1.1 Histórico

O conhecimento do DM já data de vários séculos. Por volta do século XV antes de Cristo, já se descreviam sintomas que pareciam corresponder ao diabetes. Foi o médico Areteu da Capadócia quem, no século II da era cristã, deu a esta afecção o nome de diabetes, que em grego significa sifão, referindo-se ao símbolo mais chamativo que é a eliminação exagerada de água pelos rins, expressando que a água entrava e saía do organismo do diabético sem fixar-se nele. Após um longo intervalo foi Thomas Willis quem, em 1679, fez uma descrição magistral do diabetes, ficando desde então reconhecida por sua sintomatologia como entidade clínica. Foi ele quem, referindo-se ao sabor doce da urina, lhe deu o nome de diabetes *mellitus* (sabor de mel) (DINSMOOR, 1996).

Em 1775, Dopson identificou a presença de glicose na urina. Os primeirostrabalhos experimentais relacionados com o metabolismo dos glicídios foram realizados por Claude Bernard, o qual descobriu, em 1848, o glicogênio hepático e provocou a aparição de glicose na urina excitando os centros bulbares. Na metade do século XIX, o grande clínico francês Bouchardat assinalou a importância da obesidade e da vida sedentária na origem do diabetes e traçou as normas para o tratamento dietético, baseando-se na restrição dos glicídios e no baixo valor calórico da dieta (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

A busca do suposto hormônio produzido pelas ilhotas de Langerhans, células do pâncreas descritas em 1869 por Langerhans, iniciou-se de imediato, o qual foi conseguido pelos jovens canadenses Banting e Best, que isolaram, em 1921, a insulina e demonstraram seu efeito hipoglicêmico (MINKOWSKI, 1989). Esta descoberta significou uma das maiores conquistas médicas do século XX, porque transformou as expectativas e a vida dos diabéticos e ampliou horizontes no campo experimental e biológico para o estudo do diabetes e do metabolismo dos glicídios.

### 3.1.2 Conceito e fisiopatologia

O DM é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, decorrente da diminuição da secreção de insulina e/ou da perda da capacidade desse hormônio de exercer adequadamente seus efeitos. A resistência à insulina ou a falta absoluta da mesma, resulta no comprometimento do controle metabólico da glicemia, culminando com um quadro de hiperglicemia que é considerado o fator de risco clássico para o desenvolvimento das chamadas complicações do diabetes (TIWARI & RAO, 2002).

O DM é uma condição na qual o organismo perdeu, parcialmente, o poder de “queimar” os açúcares fornecidos pelos alimentos ingeridos. Como resultado, o açúcar que não é queimado acumula-se no sangue e não se transforma em energia (BENNETT, 1983; LIENHARD *et al.*, 1992). O excesso de açúcar não queimado no sangue, com a conseqüente falta de produção de energia, dará origem aos sintomas clássicos do diabetes, tais como sede e fome excessivas, fraqueza muscular, perda de peso e elevação do nível de glicose no sangue, o que resulta na excreção da glicose pela urina (SHOELSON, 1995; BERNE & GENUTH, 2000; GODOY, 2000; SAID *et al.*, 2002). No entanto, a ausência dos mesmos é comum em muitos pacientes e não descarta a possibilidade de que exista um grau de hiperglicemia suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas antes que o diagnóstico seja estabelecido (ATKINSON & EISENBARTH, 2001).

A hiperglicemia crônica do Diabetes está associada a um lento e progressivo dano a vários órgãos e tecidos, especialmente olhos, rins, coração, vasos sanguíneos, nervos periféricos e cérebro (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009), o que pode acarretar complicações que compreendem a nefropatia, retinopatia, neuropatia periférica e amputações. Além disso, pacientes diabéticos apresentam elevado risco de doença vascular aterosclerótica, como as doenças coronariana, arterial periférica e vascular cerebral, sendo estas consideradas as principais causas da redução da sobrevida e da mortalidade dos pacientes diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

### 3.1.3 Epidemiologia

O DM representa um dos mais importantes problemas de saúde pública, alcançando expressiva importância em virtude das suas repercussões sociais e econômicas, o que se traduz tanto por mortes prematuras e incapacidade para o trabalho, quanto por custos associados ao seu controle ou ao tratamento de suas complicações, principalmente as de natureza ocular, renal e vascular (BRASIL, 1993; BARCELÓ *et al.*, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o número de diabéticos no mundo é de 180 milhões, com projeção de aumentar para 380 milhões no ano de 2025 (WILD *et al.*, 2004; LEBECHE *et al.*, 2008), sendo que cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem nos países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade (WILD *et al.*, 2004). No Brasil existem aproximadamente 11 milhões de diabéticos correspondendo a cerca de 7,6% da população adulta entre 30 e 69 anos e 0,3% das gestantes, sendo que aproximadamente 50 % destes pacientes desconhecem o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, o DM é a sexta causa mais frequente de internação hospitalar e representa aproximadamente 40% dos pacientes que internam em Unidades Coronarianas Intensivas e 46% dos pacientes que ingressam em tratamento de diálise, além de ser responsável por 9% da mortalidade mundial total. Além disso, o DM é considerado a principal causa de amputações de membros inferiores e de cegueira adquirida devido a problemas de microvascularização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

### 3.1.4 Classificação

A classificação atual do DM toma como referência a etiologia dos distúrbios glicêmicos, definidos de acordo com defeitos ou processos específicos, sendo que a

grande maioria dos pacientes diabéticos pertence a uma das duas classes etiopatogênicas: Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM tipo 1), que compreende cerca de 10% do total de casos e Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM tipo2), que compreende cerca de 90% do total de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O DM tipo 1, que antigamente fora denominado de DM insulino dependente (IDDM), é caracterizado por uma severa ou total destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas que eventualmente leva ao estágio de deficiência absoluta de insulina (CNOP *et al.*, 2005). Fatores genéticos, ambientais e imunológicos são considerados os principais responsáveis pela gênese do processo de destruição das células  $\beta$  do pâncreas e, conseqüentemente, pela manifestação da doença. O traço clínico mais relevante é a tendência à hiperglicemia grave e cetoacidose. Em geral, o início é abrupto, acometendo, principalmente, crianças e adolescentes sem excesso de peso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O DM tipo 2, antigamente denominado de DM não-insulinodependente (NIDDM), é uma alteração metabólica, caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina, com predomínio de um ou outro componente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). O problema está na incapacidade de absorção das células musculares e adiposas, que, por muitas razões, não conseguem metabolizar a glicose suficiente da corrente sanguínea, caracterizando uma anomalia chamada de "resistência insulínica" (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

A idade de início do DM tipo 2 é variável, sendo mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência ao redor dos 60 anos. 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, além de fatores genéticos, ambientais e quadros de obesidade, que contribuem para o surgimento do DM tipo 2 e, como conseqüência os pacientes podem desenvolver complicações nos sistemas micro e macrovascular (VÉRICEL *et al.*, 2004). A cetoacidose é rara e, quando presente, é

acompanhada de infecção ou estresse muito grave. Pacientes com DM tipo 2 têm uma prevalência aumentada de anormalidades lipídicas que contribuem para taxas mais elevadas de doença arterial coronariana, e o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC) constituem atualmente as principais causas de morte dos pacientes com esta patologia (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).

### 3.1.5 Diagnóstico

Algumas vezes o diagnóstico do DM é feito a partir de complicações crônicas como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), porém, os testes diagnósticos mais comumente utilizados para suspeita de Diabetes ou regulação glicêmica alterada baseiam-se na glicose plasmática de jejum (8 horas), nos pontos de jejum e de 2h após sobrecarga oral de 75g de glicose (teste oral de tolerância à glicose – TOTG) e na medida da glicose plasmática casual (GROSS *et al.*, 2002). Segundo a AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2009), pacientes com glicemia de jejum inferior a 100 mg/dL e TOTG inferior a 140mg/dL, são considerados com glicemia normal, com glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL e TOTG entre 140 e 199 mg/dL, são caracterizados como pré-diabéticos ou intolerantes à glicose, sendo considerado diabético todo indivíduo que apresenta glicemia de jejum superior a 126 mg/dL e TOTG superior a 200 mg/dL.

### 3.1.6 Controle e tratamento do DM

Na prática clínica, a avaliação do controle glicêmico é feita através da utilização de dois recursos laboratoriais: os testes de glicemia e os testes de hemoglobina glicada (A1c), cada um com seu significado clínico específico. Os testes de glicemia refletem o nível glicêmico atual e instantâneo no momento exato do teste, enquanto os testes de A1C refletem a glicemia média pregressa dos últimos dois a quatro meses. Os testes de glicemia podem ser realizados por técnicas laboratoriais tradicionais em laboratórios clínicos ou, então, através da prática da automonitorização domiciliar, que, quando realizada de forma racional, pode proporcionar uma visão bastante realista do nível do controle glicêmico durante todo o dia (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2008).

Estudos clínicos, realizados em grandes centros foram capazes de demonstrar que a manutenção de A1c em valores o mais próximo possível do normal ou abaixo de 7% foi acompanhada de redução significativa do surgimento e da progressão das complicações micro e macro-vasculares, tanto em pessoas com diabetes do tipo 1, quanto do tipo 2 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Com frequência é indicada a prescrição de antidiabéticos orais (tabela 1) para pacientes com DM Tipo 2. A escolha deve levar em consideração aspectos individuais do paciente, como idade, peso, níveis da glicose sanguínea (jejum e pós-prandial) e aspectos clínicos indicativos de resistência ou deficiência insulínica como mecanismo fisiopatológico predominante (DEFRONZO, 1999). Se a glicemia de jejum estiver muito alta (acima de 270 mg/dL) e ou na presença de infecção, provavelmente o paciente necessitará de um tratamento com insulina. Isso poderá ser necessário por curto período de tempo, até atingir níveis de glicemia que possam ser controlados com os hipoglicemiantes orais, ou com o tratamento definitivo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Além do uso de antidiabéticos orais, recomendam-se mudanças no estilo de vida, como alimentação saudável, redução de peso, atividade física regular e abandono de vícios (fumo, álcool, entre outros).

Classes de antidiabéticos orais disponíveis comercialmente no Brasil		
Classes de drogas	Agente	Principal Ação
Sulfaniluréias	<i>Primeira geração</i> Clorpropamida <i>Segunda geração</i> Glibenclamida Gliclazida Glipizida Glimepirida	Secretagogo beta-pancreático de ação lenta
Glitinidas	Repaglinida Nateglinida	Secretagogos beta-pancreáticos de ação rápida
Biguanidas	Metformina	Diminui a produção hepática de glicose e aumenta a sensibilidade à insulina
Tiazolenedionas	Rosiglitazona Pioglitazona	Aumentam a sensibilidade à insulina e diminuem a produção hepática de glicose
Inibidores da alfa-glicosidase	Acarbose	Retarda a absorção intestinal de carboidratos

Tabela 1: Antidiabéticos orais disponíveis comercialmente no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2004).

### 3.2 Sistema purinérgico

O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, sendo considerado um sistema primitivo envolvido em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004). A sinalização purinérgica envolve três principais componentes: 1) os nucleotídeos de adenina, 2) os receptores através dos quais eles exercem seus efeitos e 3) as ectoenzimas, responsáveis pelo controle dos níveis destas moléculas no meio extracelular (ATKINSON *et al.*, 2006). Os nucleotídeos extracelulares de adenina, ATP e ADP, e o nucleosídeo adenosina são considerados, atualmente importantes moléculas sinalizadoras, mediando seus efeitos através dos receptores

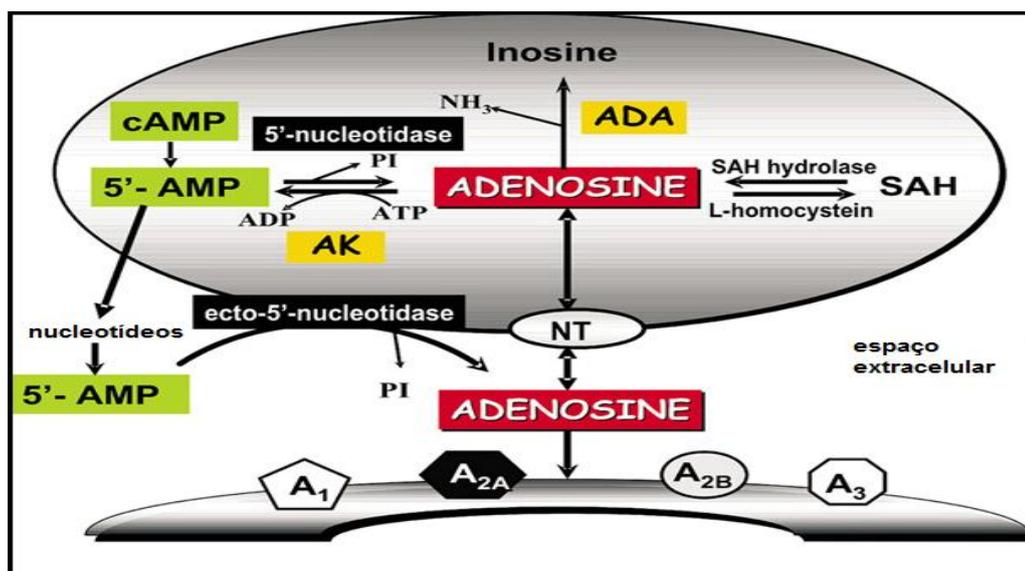
purinérgicos localizados na superfície celular (ILLES & RIBEIRO, 2004).

### 3.2.1 Adenosina

A adenosina é um importante nucleosídeo componente do sistema purinérgico. Está presente em todos os tecidos de vertebrados, onde atua modulando os diversos processos fisiológicos. No tecido cardíaco, a adenosina produz vasodilatação e diminuição da pressão cardíaca (SATO *et al.*, 2005). Em outros sistemas apresenta diversas funções como modulação da liberação de neurotransmissores (CUNHA, 2001) e de citocinas, inibição da lipólise, indução de broncoconstrição (BOUMA *et al.*, 1997; VAN DER GRAAF *et al.*, 1999; FAN *et al.*, 2003), além de exercer importante papel na modulação da ação da insulina no metabolismo da glicose em diferentes tecidos (RUTKIEWICZ & GORSKI, 1990). Outro aspecto que exemplifica o papel neuroprotetor da adenosina é o seu efeito na ativação das enzimas do sistema antioxidante como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (GPx) (MAGGIRWAR *et al.*, 1994).

A adenosina extracelular e os derivados da adenina são moduladores do tônus vascular e da função plaquetária (COADE & PEARSON, 1989). A adenosina também apresenta uma ação cardioprotetora em episódios de isquemia/reperfusão, como também na insuficiência cardíaca, atenuando a liberação de catecolaminas, aumentando o fluxo sanguíneo coronário e inibindo a ativação de plaquetas e leucócitos (KINUGAWA *et al.*, 2006).

A adenosina é produzida por diferentes vias e sua síntese ocorre tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular. No meio intracelular, a sua produção pode ocorrer a partir de 5'-AMP que, através da enzima 5'NT, é convertida em adenosina, sendo esta metabolizada em inosina pela enzima ADA (LATINI & PEDATA, 2001). Uma segunda via de síntese ocorre a partir da hidrólise de Sadenosilhomocisteína (SAH) pela S-adenosilhomocisteína hidrolase, entretanto, não é uma via de grande importância, sendo considerada como principal via a que envolve a atividade da 5'NT (Figura 1) (PAK *et al.*, 1994). Da mesma maneira que no meio intracelular, a adenosina pode ser metabolizada em inosina no meio extracelular pela ação da enzima ecto-Adenosina desaminase (ecto-ADA) (LATINI & PEDATA, 2001).



**Figura 1:** Vias de produção, metabolismo e transporte de adenosina (Disponível em : [www.bioscience.org](http://www.bioscience.org)).

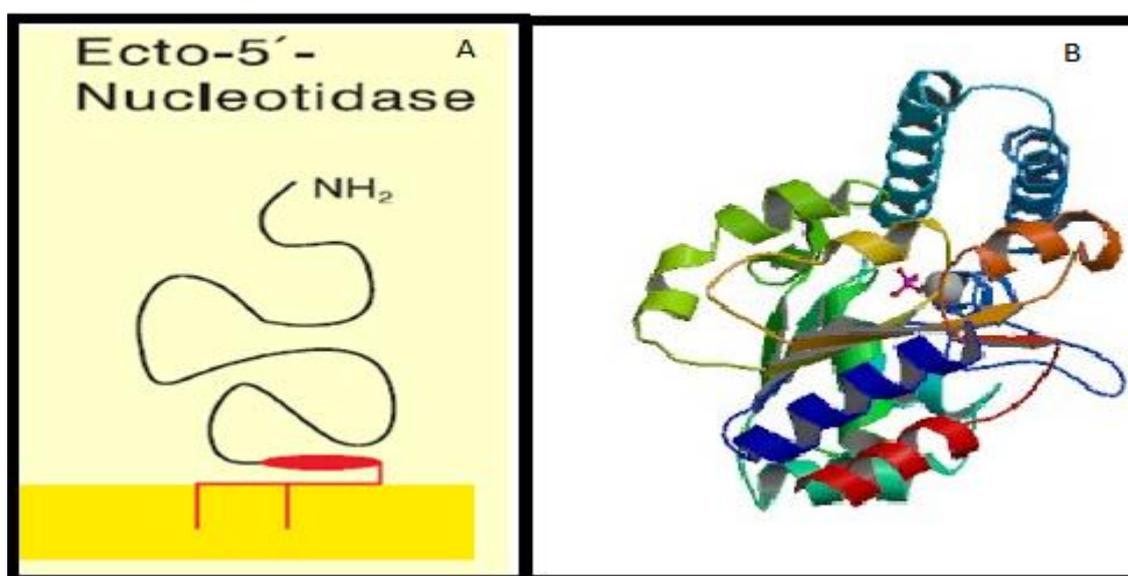
### 3.2.2 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina:

#### 3.2.2.1 Ecto-5' Nucleotidase

A ecto-5' Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73, 5'NT) é uma glicoproteína ligada à membrana via um glicosil fosfatidilinositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Figuras 2A e 2B), que catalisa a desfosforilação de vários nucleotídeos ecto-5'-monofosfatados como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP a seus respectivos nucleosídeos (ZIMMERMANN, 1996). No entanto, foi demonstrado que a 5'NT hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN, 1996). Ocorre na forma de dímero e seu peso molecular está na faixa de 62 a 74 Kd (ZIMMERMANN, 2001; HUNSUCKER *et al.*, 2005).

Essa enzima é encontrada em bactérias, animais e plantas (ZIMMERMANN, 1992), estando presente em inúmeros tecidos como o renal, o nervoso, o hepático, a placenta, o endotélio vascular e as plaquetas (BARMAN, 1696). Até o momento, 7

sub-tipos da enzima 5'NT foram isoladas e caracterizadas em humanos. Esses subtipos variam na localização subcelular, sendo 5 deles localizadas no citosol, um na matriz mitocondrial e um anexada a membrana plasmática externa (HUNSUCKER *et al.*, 2005).



**Figura 2** – A) Estrutura da ecto-5' Nucleotidase ancorada à membrana (Zimmermann, 2001-adaptado); B) Estrutura cristalina da enzima ecto-5' Nucleotidase (disponível em [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

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

Alguns estudos relacionam alterações da atividade da 5'NT a situações patológicas como isquemia (SCHETINGER *et al.*, 1994; FRASSETO *et al.*, 2000), e mais recentemente alterações em plaquetas de humanos foram observadas em pacientes com DM tipo 2 (LUNKES *et al.*, 2003, DE BONA *et al.*, 2010) e em ratos com diabetes induzido por aloxano (LUNKES *et al.*, 2004). Além disso, outros estudos relataram aumento da atividade da 5'NT em células cardíacas de ratos diabéticos (PODGORSKA *et al.*, 2006) e em linfócitos de pacientes diabéticos tipo 2 quando comparados ao grupo controle (STEFANOVIC *et al.*, 2006).

### 3.2.2.2 Adenosina desaminase

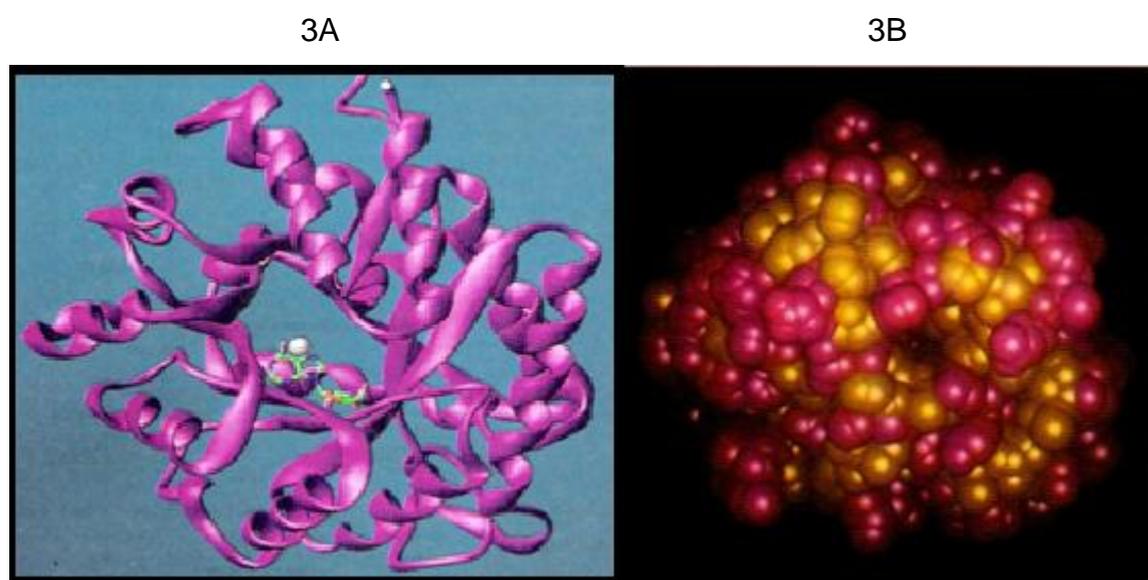
A Adenosina desaminase (ADA, adenosina aminohidrolase, EC 3.5.4.4) (Figura 3) é uma enzima polimórfica da rota metabólica das purinas (VAN DER WEYDEN & KELLEY, 1976; DADONNA & KELLEY, 1977), que está presente principalmente no citoplasma das células, mas aparece também na superfície celular como ecto-enzima (ecto-ADA), sendo assim objeto de considerável interesse devido ao seu papel na manutenção dos níveis de ado intra e extracelulares (FRANCO *et al.*, 1997).

A ADA catalisa irreversivelmente a clivagem hidrolítica da adenosina à inosina e 2'-desoxiadenosina (dado) em 2'-desoxinosina (Figura 4) (IWAKI-EGAWA *et al.*, 2004; IBIŞ *et al.*, 2007; POSPISILOVA & FREBORT, 2007). Está presente em plantas, bactérias (LUPIDI *et al.*, 1992), invertebrados (AIKAWA *et al.*, 1977), vertebrados (MA & FISHER, 1968), mamíferos (LUPIDI *et al.*, 1992), e humanos (DADDONA, 1981), onde 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).

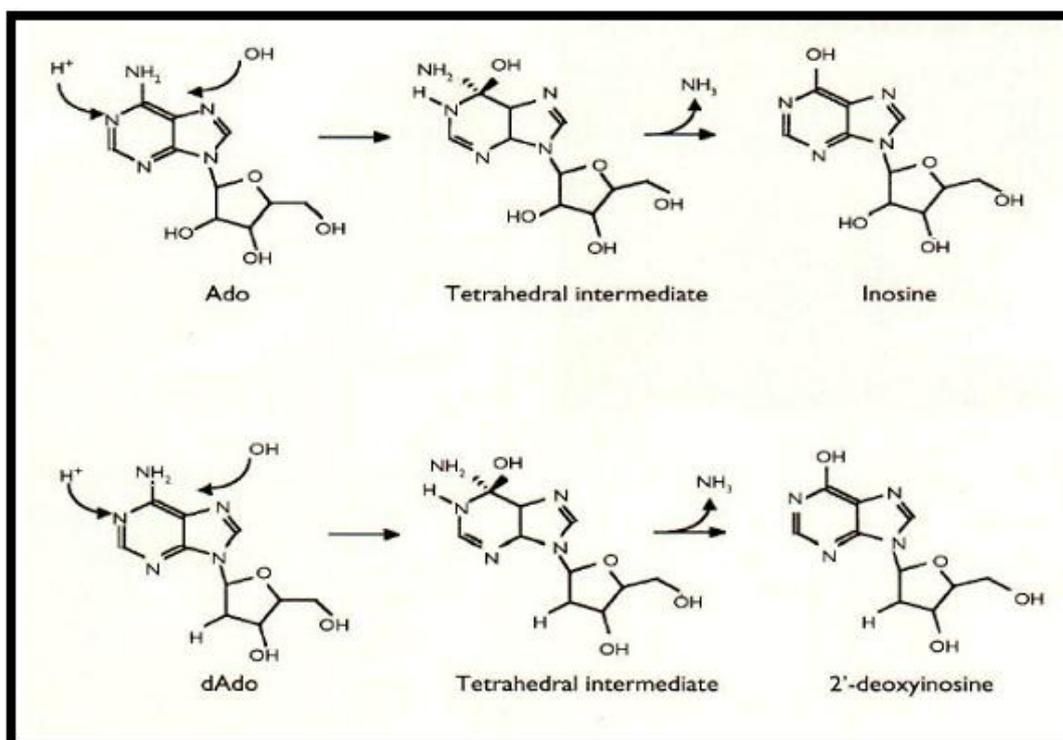
A ADA possui um importante papel biológico no metabolismo dos nucleotídeos púricos, é essencial para a proliferação e diferenciação de células linfóides, particularmente células T, e maturação de monócitos (BOTA *et al.*, 2001). A deficiência congênita de ADA causa Imunodeficiência Severa Combinada, que é caracterizada pela ausência de linfócitos B e T funcionais (HIRSCHORN, 1990) e, também, pela ausência da isoforma 1 da ADA em linfócitos, mas sem nenhum efeito na isoforma 2 (UNGERER *et al.*, 1992).

Por outro lado, um aumento na atividade da enzima em diferentes fluídos biológicos (líquidos pleural, pericárdico, peritoneal, intra-articular e fluidos cerebrospinais) tem sido utilizado para diagnóstico de tuberculose (BAGANHA *et al.*, 1990; DA CUNHA, 1991), peritonite infecciosa, mononucleose infecciosa, febre tifóide, sinusite, meningite e AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) (TITARENKO *et al.*, 2006).

Estudos mostram que pacientes com DM tipo 2 apresentam um aumento na atividade da ADA quando comparado a pacientes controles (KURTUL *et al.*, 2004). A partir de estudos realizados em nosso laboratório, observamos 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 adenosina. Por outro lado, 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 representadas em rosa e amarelo, respectivamente (FRANCO *et al.*, 1998).



**Figura 4** - Reações catalizadas pela ADA, tendo como substrato a adenosina (ado) e a 2'-desoxiadenosina (d-ado)(FRANCO *et al.*, 1998).

### 3.2.2.3 Isoformas da ADA

Em humanos a ADA existe em pelo menos três formas moleculares: ADA1 (forma pequena), a qual é um monômero com massa molecular de aproximadamente 35 KDa, a ADA1 + CP (forma grande), com massa molecular de aproximadamente 280 KDa a qual é formada por duas moléculas de ADA1 combinadas por uma proteína de ligação (CP) (ecto-ADA) e a ADA2 codificada por um gene separado de posição ainda desconhecida, e com massa molecular de aproximadamente 100 kDa (HIRSHHORN & RATECH, 1980). Estudos recentes reportam que as isoformas da ADA apresentam características cinéticas distintas, o que faz com que desempenhem funções diferentes no organismo (SHAROYAN *et al.*, 2006).

A isoenzima ADA1 é encontrada em todas as células, especialmente em linfócitos e monócitos (VAN DER WEYDEN & KELLEY, 1976). Nos eritrócitos, encontra-se somente a forma menor da isoenzima ADA1, e nos tecidos como fígado, rins e intestino encontram-se ambas as isoformas da enzima, ADA1 e a ADA2 (IWAKI-EGAWA *et al.*, 2004). Pesquisas realizadas a partir do nosso grupo de estudos demonstraram predomínio da isoenzima ADA1 em eritrócitos hiperglicêmicos (BOPP *et al.*, 2009) e em plaquetas de pacientes com DM tipo 2 (DE BONA *et al.*, 2010).

ADA2 está presente principalmente em monócitos, macrófagos (GOURGUNER *et al.*, 2000), e em pequenas quantidades no soro (POSPISILOVA & FREBORT, 2007) e no plasma (VAN DER WEYDEN & KELLEY, 1976; CRISTALLI *et al.*, 2001; IWAKI-EGAWA *et al.*, 2004), entretanto, a fonte celular e a função da ADA2 plasmática ainda não estão completamente esclarecidas (KOBAYASHI *et al.*, 1993). Dados recentes têm sugerido que ela pode ser secretada por monócitos ativados em processos inflamatórios (IWAKI-EGAWA *et al.*, 2006).

Defeitos genéticos no metabolismo das purinas em humanos resultam em sérias desordens metabólicas (BLACKBURN *et al.*, 1998). Aumento nos níveis, tanto de ADA1 quanto de ADA2 no soro/ plasma tem sido utilizado como marcador bioquímico para doenças infecciosas (GALANTI *et al.*, 1981; GAKIS *et al.*, 1989; CORRAL *et al.*, 2004).

A ecto-ADA (ADA1 + CP) é responsável por controlar os níveis de adenosina extracelulares (FRANCO *et al.*, 1997). Evidências demonstram que esta proteína de ligação é uma glicoproteína multifuncional do tipo II, conhecida como CD26 ou Dipeptidil Peptidase IV (DPPIV), a qual pode ser encontrada na forma solúvel ou integrada à membrana (GORRELL, 2005).

ADA1 é completamente inibida por 100  $\mu$ M de EHNA, enquanto a ADA2 é resistente a essa inibição (UNGERER *et al.*, 1992 e 1994). O EHNA apresenta um mecanismo particular de inibição. De acordo com o mecanismo proposto de interação da ADA com o EHNA, a ligação de derivados do EHNA ao complexo enzima-DPPIV resulta em um rearranjo conformacional mais pronunciado próximo ao centro ativo da enzima, levando a formação de um complexo enzima-inibidor mais estável. Provavelmente, se a ADA está ligada à DPPIV, sua porção hidrofóbica

de ligação torna-se mais exposta e se liga a fração hidrofóbica de derivados do EHNA mais fortemente (MARDANYAN *et al.*, 2001).

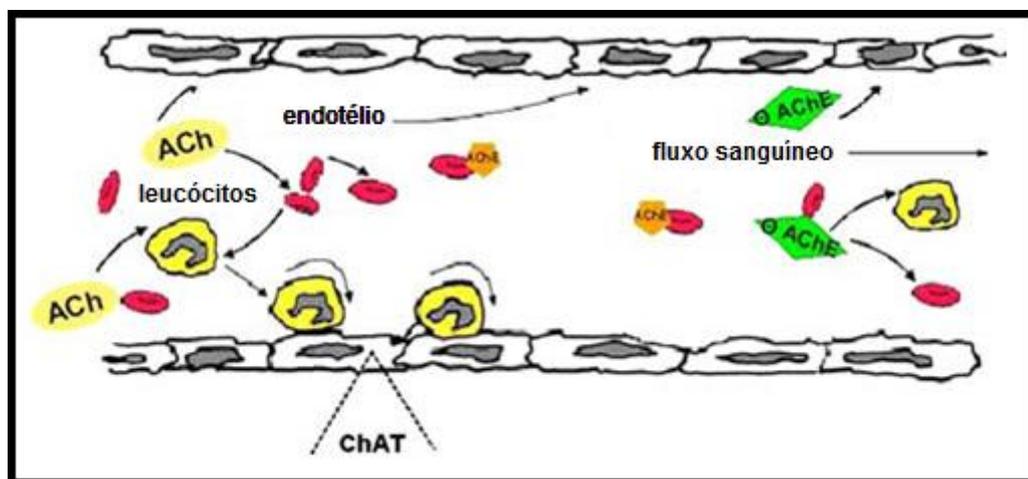
Além disso, muitos constituintes das plantas podem exercer efeitos biológicos através da inibição da ADA, entre eles os flavonóides, que apresentam interessantes propriedades biológicas, e já existem estudos demonstrando moderada inibição da enzima por esses compostos (KOCH *et al.*, 1992; MELZIG, 1996). A inibição competitiva realizada por derivados fenólicos de plantas e a subsequente acumulação de ado endógena pode explicar alguns dos efeitos farmacológicos destes compostos (CRISTALLI *et al.*, 2001).

### 3.3 Colinesterases

A ACh foi a primeira substância encontrada e definida como neurotransmissor. É sintetizada pela acetiltransferase a partir da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta, e acetil CoA, um produto do metabolismo celular (PRADO *et al.*, 2002), e é carregada até as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular da ACh onde fica armazenada até sua liberação (RAND, 2007). Sua ação é finalizada através de hidrólise realizada pela enzima AChE.

A ACh desempenha um papel fundamental no SNC e está longe de ser exclusivamente um neurotransmissor, fazendo assim, muito mais do que apenas mediar uma rápida comunicação entre os neurônios e células efectoras. A ACh tem se mostrado presente na circulação humana, sendo produzida por linfócitos T e endotélio vascular (WESSLER *et al.*, 2007; WESSLER & KIRKPATRICK, 2008) (Figura 5). Atua na proliferação celular, organização cortical do movimento (MESULAM *et al.*, 2002; MORETTO *et al.*, 2004), provoca vasodilatação em artérias coronárias normais, a partir da liberação de óxido nítrico, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo (COX *et al.*, 1989), além de facilitar a liberação de insulina em um modo dependente de glicose, através da ativação de receptores muscarínicos localizados nas células  $\beta$  pancreáticas (GILON & HENQUIN, 2001). Tem sido demonstrado também que a ACh apresenta ações anti-inflamatórias e inibe a

produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral e interleucina 1 (RAO *et al.*, 2007).



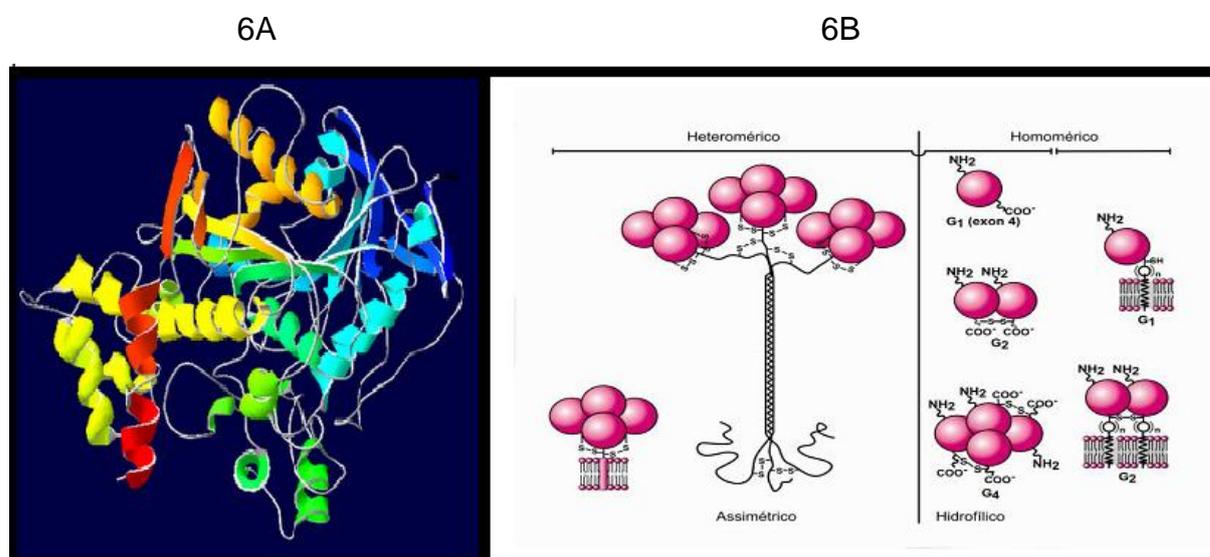
**Figura 5:** Produção e circulação da ACh como um dos principais moduladores vasculares (DE ALMEIDA & SALDANHA, 2010).

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de serem utilizadas como marcadoras de inflamação sistêmica de baixo grau, como na Doença de Alzheimer e DM (RAO *et al.*, 2007).

Existem dois tipos de colinesterases, classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ *et al.*, 1993): a acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a ACh) e é predominantemente encontrada em cérebro, junção neuromuscular e eritrócitos (COKUGRAS, 2003) e a butirilcolinesterase (BuChE, E.C.3.1.8) ou pseudocolinesterase que hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina, sendo principalmente encontrada em plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita que a AChE (MESULAM *et al.*, 2002).

### 3.3.1 Acetilcolinesterase

A AChE (Figura 6A) é uma enzima amplamente distribuída no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo também encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (SILVA, 1988). A AChE apresenta diferentes formas moleculares, três formas globulares (G1, G2 e G4) e três formas assimétricas (A4, A8 e A12). O SNC contém, principalmente, as formas globulares, que podem ser solúveis ou ancoradas à membrana por sequências de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto outras formas são ligadas à membrana através de glicofosfolípeidos (TALESA, 2001). As formas assimétricas são encontradas principalmente no sistema nervoso periférico (SNP) e músculo (RAKONCZAY *et al.*, 2005) (Figura 6B). Os eritrócitos mostram um predomínio da forma globular dimérica (G2), encontrada em até 98% das células como foi demonstrado por RAKONCZAY e colaboradores (2005).



**Figura 6:** A) Estrutura da enzima AChE ( disponível em: [www.neuromed88.com](http://www.neuromed88.com)). B) Isoformas da enzima AChE ( disponível em : [http://www.chemistry.emory.edu/ach\\_inactivation.htm](http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm).)

A AChE é uma importante enzima regulatória que controla a transmissão do impulso nervoso através da sinapse colinérgica pela rápida hidrólise e inativação da ACh modulando a concentração desse neurotransmissor nas sinapses (GRISARU *et*

*al.*, 1999; SOREQ & SEIDMAN, 2001). Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica, a AChE tem sido implicada em várias ações não colinérgicas (SOREQ & SEIDMAN, 2001; DAY & GREENFIELD, 2002; CHACÓN *et al.*, 2003). Assim uma inibição ou ativação desta enzima pode ter consequências devastadoras no cérebro e outros órgãos (MESULAN *et al.*, 2002).

Os eritrócitos são os elementos do sangue com o maior conteúdo de AChE (NEUMANN *et al.*, 2007). Também é interessante ressaltar que a AChE nos eritrócitos tem demonstrado propriedades funcionais e estruturais similares àquelas da AChE do cérebro (THIERMANN *et al.*, 2005) e pode atuar como um bom marcador de integridade e estado funcional da membrana de células sanguíneas (SZELÉNYI *et al.*, 1987).

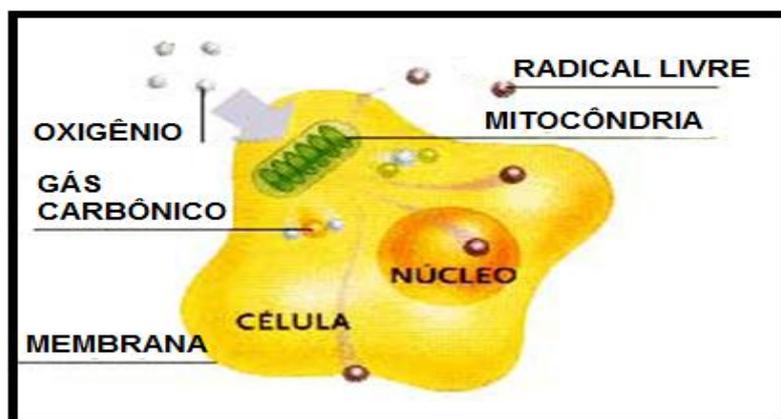
Estudos em humanos e modelos experimentais de diabetes tem encontrado alterações na atividade da AChE (SANCHEZ-CHAVEZ & SALCEDA, 2000; KUHAD *et al.*, 2008; SCHMATZ *et al.*, 2009). Um aumento na atividade da AChE leva a redução nos níveis de ACh, e, conseqüentemente, a diminuição das ações anti-inflamatórias exercidas pela mesma (RAO *et al.*, 2007). Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado que há um aumento no risco de falência cardíaca em diabéticos e que tratamentos eletivos com inibidores da AChE parecem ser benéficos nestes casos (BAUTERS *et al.*, 2003).

SUHAIL e RIZVI (1989) relataram uma diminuição na atividade da AChE em membrana de eritrócitos de pacientes com DM tipo 1. Este resultado pode ser explicado em parte, pelas alterações nas características de fluidez da membrana em resposta aos baixos níveis de insulina em condições diabéticas. Em outro estudo, ratos diabéticos induzidos por streptozotocina apresentaram aumento na atividade da enzima no córtex cerebral e soro, e diminuição de 30-40% em eritrócitos. Estes resultados sugerem que o diabetes pode influenciar em um subconjunto específico de células e isoformas das colinesterases e afetar as propriedades cinéticas das mesmas, levando às alterações que estão associadas às complicações diabéticas (KHANDKAR *et al.*, 1995; SANCHEZ-CHAVEZ & SALCEDA, 2000 & 2001).

### 3.4 Radicais livres

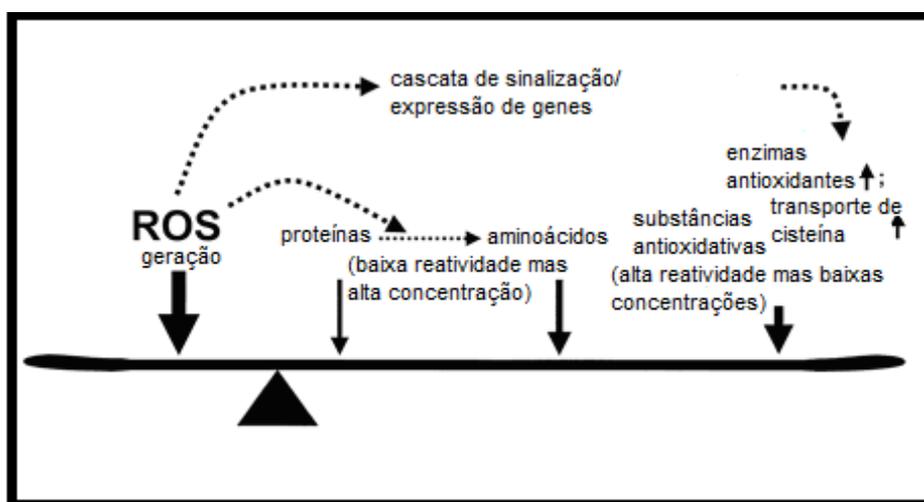
Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos, apresentam em sua órbita mais externa, um ou mais elétrons não pareados e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (MÉNDEZ FILHO & RODRÍGUEZ, 1997), sendo que o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (YU & ANDERSON, 1997).

Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (PIETTA, 2000; VISIOLI, 2000), respectivamente. As principais EROs são: hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peroxila ( $\cdot\text{ROO}^-$ ) e alcoxila ( $\cdot\text{RO}$ ), oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso. O  $\cdot\text{O}_2^-$  apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o  $\cdot\text{OH}$  mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas, como mostra a Figura 7 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos (ONOO).



**Figura 7-** Célula sofrendo ação pelos radicais livres (disponível em: <http://química.fe.usp.br/global/ca8/radica.htm>, acesso em 10 de novembro de 2010).

A concentração destes radicais é mantida pelo balanço entre sua produção e sua depuração por antioxidantes (DRÖDGE, 2002). O aumentado nível de oxidantes associado a alterações nos níveis de antioxidantes desenvolve o processo denominado estresse oxidativo (Figura 8), que pode causar redução na resistência celular e consequente dano oxidativo às proteínas, aos lipídios e à molécula de DNA (MATÉS & SANCHEZ-JIMENEZ, 1999; MATES *et al.*, 1999), além de ser o processo final de lesão celular da grande maioria dos fatores de risco cardiovascular (GRIENGLING & FITZGERALD, 2003). O alvo primário do estresse oxidativo depende do tipo de célula, da natureza do estresse imposto, do sítio de geração, da proximidade das EROs de um alvo específico e da gravidade do estresse produzido (DALLE-DONNE *et al.*, 2006).

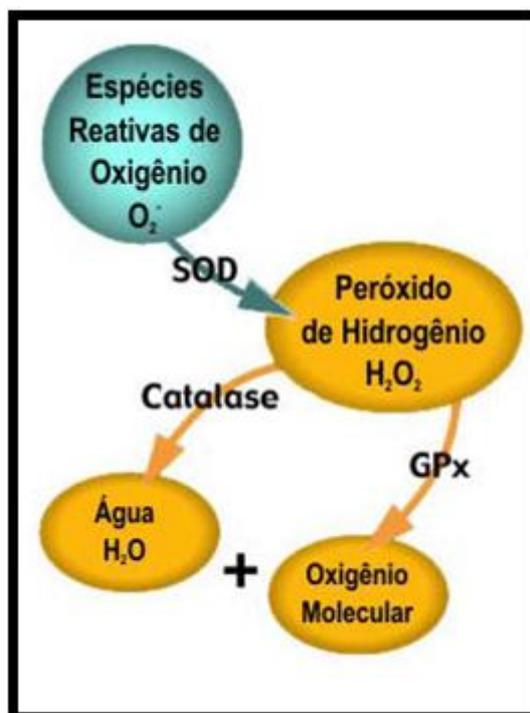


**Figura 8 -** Balanço entre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os diferentes tipos de sequestradores de radicais livres (Adaptado de DROGE, 2002).

### 3.5 Estresse Oxidativo e sistemas de defesa antioxidantes

O estresse oxidativo foi definido em 1991 como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/oxidante em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial” (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Assim, a diminuição dos sistemas de defesa antioxidante, ou, o aumento da geração de espécies oxidantes, radicalares ou não, pode resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (DHALA *et al.*, 2000). Devido a isso, o estresse oxidativo tem sido implicado em várias doenças como DM (HALLIWELL, 1997), doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, bem como no processo de envelhecimento (KOVACIC & JACINTHO, 2001; VALKO *et al.*, 2007).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com HALLIWELL (2000), "Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo". Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente (Figura 9), a exemplo da Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD) ou, não enzimaticamente a exemplo de Glutathione reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina “E”),  $\beta$ -caroteno (provitamina “A”), ácido ascórbico (vitamina “C”), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (HALLIWELL, 1995).



**Figura 9-** Mecanismo enzimático antioxidante (NORDBERG & ARNER, 2001).

### 3.5.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

#### - Catalase

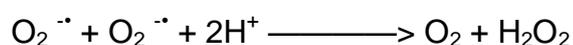
A catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) é uma hemeoproteína citoplasmática responsável pela degradação do  $H_2O_2$  em altas concentrações, conduzindo a formação de água e oxigênio (CHAUDIÉRE & FERRARI-ILIOU, 1999; MATÉS & SANCHEZ-JIMÉNEZ, 1999; MATES *et al.*, 1999). É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (MAYES, 1990).



Se não neutralizado, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interage com cátions de ferro (ou cobre), originando o íon hidroxila e o radical livre hidroxila. Além de seu papel como ERO e, portanto, causador de estresse oxidativo, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio na célula, o que pode estar envolvido no desenvolvimento de diversas patologias (WIEACKER *et al.*, 1980).

#### - Superóxido Dismutase

A Superóxido Dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como co-fator em seu sítio catalítico, mas todas elas agem basicamente de acordo com a mesma reação descrita por McCord e Fridovich em 1969:



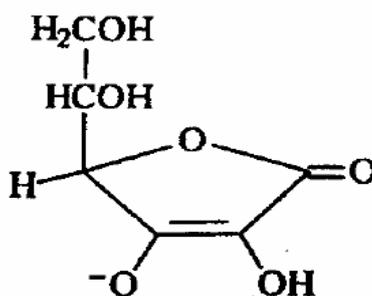
As SOD que contêm cobre e zinco (CuZnSOD) são estáveis e estão presentes em quase todas as células eucarióticas (plantas ou animais) (HALLIWEELL & GUTTERIDGE, 1985). Já as SOD dependentes de manganês (MnSOD) apresentam estabilidade de acordo com os tecidos e espécies onde atuam. A remoção do Mn dos sítios ativos causa perda da atividade catalítica, não podendo ser repostado por nenhum íon de transição, pois perde a sua atividade funcional (HALLIWEELL & GUTTERIDGE, 1989).

#### 3.5.2 Defesas Antioxidantes Não enzimáticas:

##### - Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (AA) ou vitamina C (Figura 10) é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato. É uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, essencial para o organismo humano, pois participa de diversos processos metabólicos e fisiológicos, dentre eles a regeneração do  $\alpha$ -tocoferol, a formação do colágeno, síntese de epinefrina, corticosteróides e ácidos biliares.

O AA é um dos antioxidantes mais importantes em tecidos de mamíferos (BANHEGYI *et al.*, 1997), com a capacidade de neutralizar radicais como o  $O_2^{\cdot-}$  e o  $OH^{\cdot}$  (NAMIKI, 1990). Além de suas propriedades antioxidantes, o ascorbato pode participar de reações opostas, as oxidações, sendo um potente indutor de radicais livres, agindo como um pró oxidante (HALLIWELLI, 1990). A concentração e a localização intracelular da vitamina C pode ser um fator decisivo na atividade desta vitamina como oxidante ou antioxidante (BASU & DONALDSON, 2003).



**Figura 10** : Estrutura química da vitamina C (MAY, 1999).

#### - Glutationa (GSH)

Os tióis não-protéicos têm uma importante função na defesa contra as EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MASSELA *et al.*, 2005). A Glutationa reduzida é o tiol não-protéico mais abundante nas células animais e é considerada a defesa antioxidante primária e o maior tampão redox intracelular, sendo um bom indicativo do estado redox da célula (VALKO *et al.*, 2006). O seu potencial antioxidante está intimamente ligado à presença de seu grupo sulfidril (SH), uma vez que este grupo tem um grande papel no caráter doador de elétrons da glutaciona (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). À medida que os elétrons são perdidos a molécula da GSH se torna oxidada (GSSG) (KIDD, 1997; GUL *et al.*, 2000).

A glutatona apresenta muitas funções biológicas e a diminuição do conteúdo de GSH pode predispor a célula a uma menor defesa contra o estresse oxidativo durante o DM (COLEMAN & RUSTIOM, 1999). Mantém componentes diversos da célula em estado reduzido, especialmente proteínas e íons  $\text{Fe}^{++}$  de grupos heme, além de atuar como um nucleófilo, com reatividade para se combinar com várias drogas, gerando metabólitos que facilitam a excreção urinária ou biliar desses xenobióticos (ESTEVEZ et al., 1994).

### 3.6 Peroxidação Lipídica

Quando um radical livre é produzido em excesso, ele pode reagir com ácidos graxos poliinsaturados, presentes na membrana, processo este denominado de peroxidação lipídica (SLATER, 1984; VALKO *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007). Esse processo frequentemente causa danos à estrutura da membrana, podendo resultar em modificações na permeabilidade e perda de seletividade da mesma, fazendo com que ocorra a entrada ou saída de moléculas importantes (SLATER, 1984; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007).

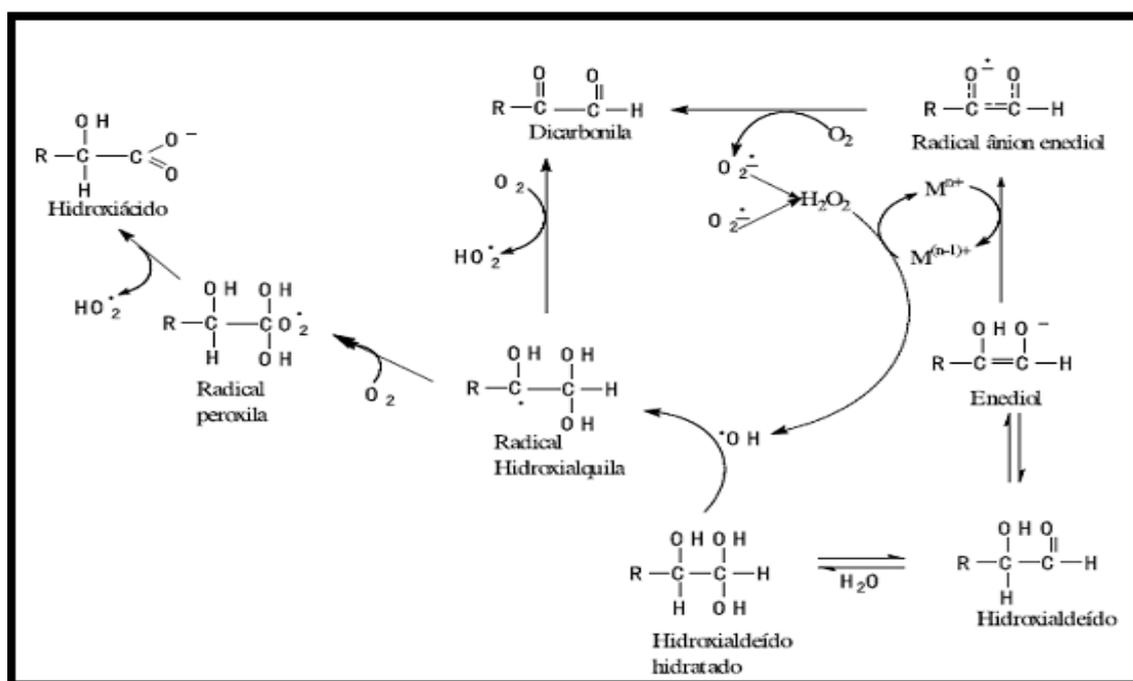
Um dos mais conhecidos produtos da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA) (ALEXANDROVA & BOCHEV, 2005; CHERUBINI *et al.*, 2005), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da lipoperoxidação (KASHYAP *et al.*, 2005), apresentando, assim, papel fundamental na patogênese de várias doenças e processos antiinflamatórios (SOVIC *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2002). A literatura demonstra a relação entre os níveis de malondialdeído (MDA), ou da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e DM, sendo que na maior parte dos trabalhos pode-se evidenciar um aumento nos níveis de TBARS ou MDA na circulação desses pacientes (RIZVI *et al.*, 2005; RAMAKRISHNA & JAIKHANI, 2008; RAMKUMAR *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009).

### 3.7 Estresse oxidativo e Diabetes mellitus

O estresse oxidativo e os danos teciduais resultantes são marcas de doenças crônicas e o diabetes não é exceção (PFAFFLY, 2001). O aumento na produção de radicais livres tem importante papel na peroxidação lipídica e oxidação proteica de estruturas celulares, causando injúria celular e complicações vasculares em pacientes diabéticos (HALLIWELL, 1997; TIWARI, 2004).

A hiperglicemia resulta na geração de EROs e aumento do estresse oxidativo por vários mecanismos, incluindo:

- autooxidação da glicose – ocorre quando os açúcares redutores sofrem enolização e reduzem a molécula de oxigênio (Figura 11), em condições fisiológicas, na presença de metais de transição, resultando em intermediários oxidantes, tais como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $\cdot OH$  e acetoaldeídos (reagem ainda mais facilmente com as proteínas). Estes podem causar danos a biomoléculas como lipídeos, DNA e proteínas e, ainda, podem destruir as células  $\beta$ -pancreáticas (HUNT *et al.*, 1990, ZYZAK *et al.*, 1995, ELGAWISH *et al.*, 1996);



**Figura 11:** Autooxidação de monossacarídeos redutores. AGE: produtos finais de glicação não enzimática avançada (ROCHA *et al.*, 2006).

- glicação proteica não enzimática – é o processo pelo qual a glicose une-se quimicamente com proteínas, sem a ajuda de enzimas. No processo de glicação ocorre formação de ligações cruzadas entre proteínas e fragmentação das mesmas, além da formação de espécies mais reativas (Figura 12). Tanto as bases de Schiff, quanto os produtos de Amadori, são compostos intermediários quimicamente reversíveis chamados de produtos iniciais de glicosilação não enzimática. A partir de reações sofridas pelos produtos de Amadori é que se formam produtos irreversíveis, chamados produtos terminais de glicosilação avançada ou AGE's (MOHAMED *et al.*, 1999).

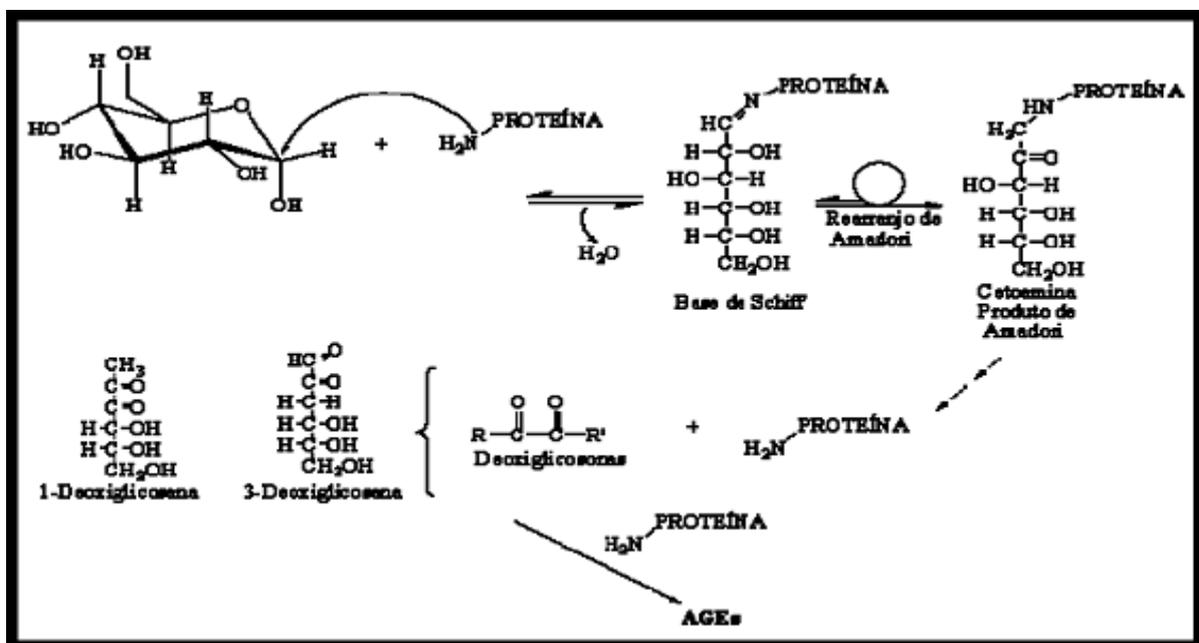
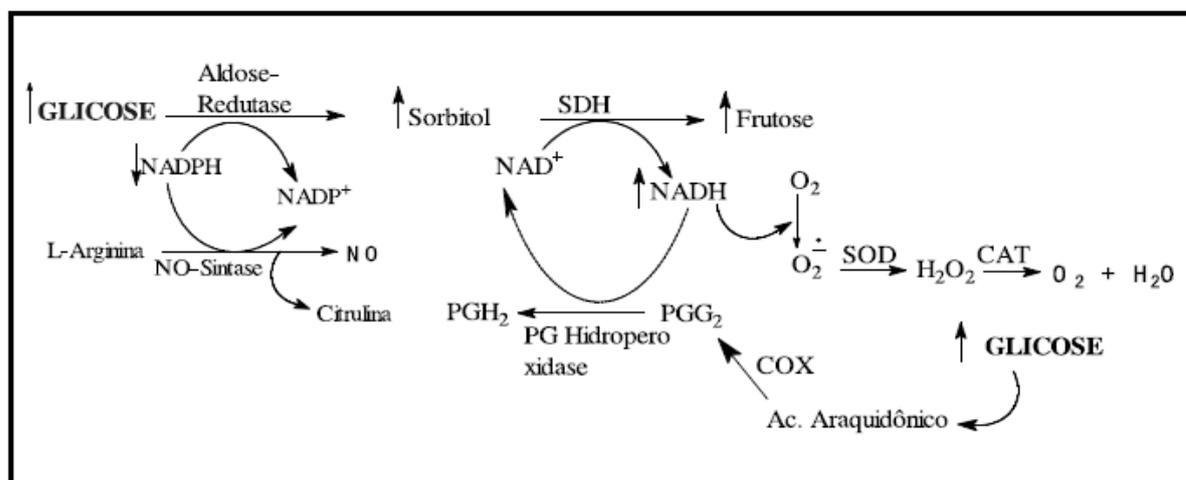


Figura 12: Processo de glicação não enzimática (ROCHA *et al.*, 2006).

- ativação da via dos polióis - o aumento nos níveis de glicose leva a um aumento da atividade das enzimas aldose-redutase e sorbitol-desidrogenase e, conseqüentemente, a um acúmulo intracelular de sorbitol e frutose, além de uma diminuição na relação NADPH/NADP<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e um aumento na relação NADH/NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo) (Figura 13) (SCHMIDT & STERN, 2000; PFAFFLY, 2001; ZHAO, 2001).



**Figura 13:** Via dos polióis ativada na hiperglicemia e espécies reativas (ROCHA *et al.*, 2006).

Além disso, pacientes diabéticos também apresentam um declínio nos mecanismos de defesa antioxidante, levando ao dano de organelas celulares e enzimas e resistência à insulina (ZHAO, 2001). Por essa razão, vários pesquisadores têm usado modelos de animais diabéticos, pacientes diabéticos e cultura de células vasculares para avaliar o efeito de antioxidantes clássicos, como as vitaminas C e E, o beta-caroteno, o ácido lipóico, entre outros, na prevenção e no tratamento das complicações do diabetes (NISHIKAWA *et al.*, 2000; ZHAO, 2001; INOBUCHI *et al.*, 2003).

### 3.8 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea (ITALIANO & HARTWIG, 2002; LEVIN, 2002). Do total das plaquetas presentes no organismo humano, 70% estão presentes na circulação e 30% no baço, permanecendo na circulação durante uma média de dez dias, quando são retiradas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (ITALIANO & HARTWIG, 2002; ANDREWS & BERNDT, 2004; SCHULZE & SHIVDASANI, 2005). O seu citoplasma possui moléculas e organelas, tais como: moléculas de miosina, actina, e trombostenina; resíduos de retículo

endoplasmático e aparato de Golgi, que sintetizam várias enzimas e armazenam íons cálcio; mitocôndrias e sistemas enzimáticos, que sintetizam ADP, ATP e prostaglandinas, um fator estabilizador da fibrina e o fator de crescimento (LEE *et al.*, 1998) (Figura 14).

As plaquetas são componentes essenciais do equilíbrio hemostático fisiológico e constituem a primeira linha de defesa contra a perda da integridade do endotélio. Estão diretamente envolvidas em diversas patologias importantes, sejam estas síndromes ou quadros trombóticos graves como a trombose arterial (GREGG & GLODSCHIMIDT-CLERMONT, 2003).

A morfologia e a função das plaquetas podem estar alteradas em pacientes com DM (STRATMANN & TSCHOEPE., 2005), e vários estudos demonstram um aumento da atividade plaquetária nestes pacientes (ROSOVE *et al.*, 1984; SOBOL & WATALA, 2000; CARR, 2001; ANGIOLLOLI *et al.*, 2007) e, em consequência, um risco maior de complicações cardiovasculares de etiologia aterosclerótica (MEDINA *et al.*, 2001). Segundo VIBERTI (2003), o DM é um importante fator de risco cardiovascular, ocasionado, em grande parte, por danos vasculares que predispõem a uma aceleração da instalação da aterosclerose.

A presença de hiperatividade plaquetária em pacientes diabéticos com glicemia controlada e sem complicações está associada ao aumento no estresse oxidativo e com um deficiente sistema antioxidante (VÉRICEL *et al.*, 2004). A glicação não enzimática de proteínas é um dos mecanismos-chave na patogênese das complicações diabéticas e pode ser significativa na aterotrombose diabética, uma vez que a maioria das proteínas de membrana das plaquetas, após sofrerem glicação, podem ser incorporadas aos trombos (CHAPPEY *et al.*, 1997; YAMAGISHI *et al.*, 2005).

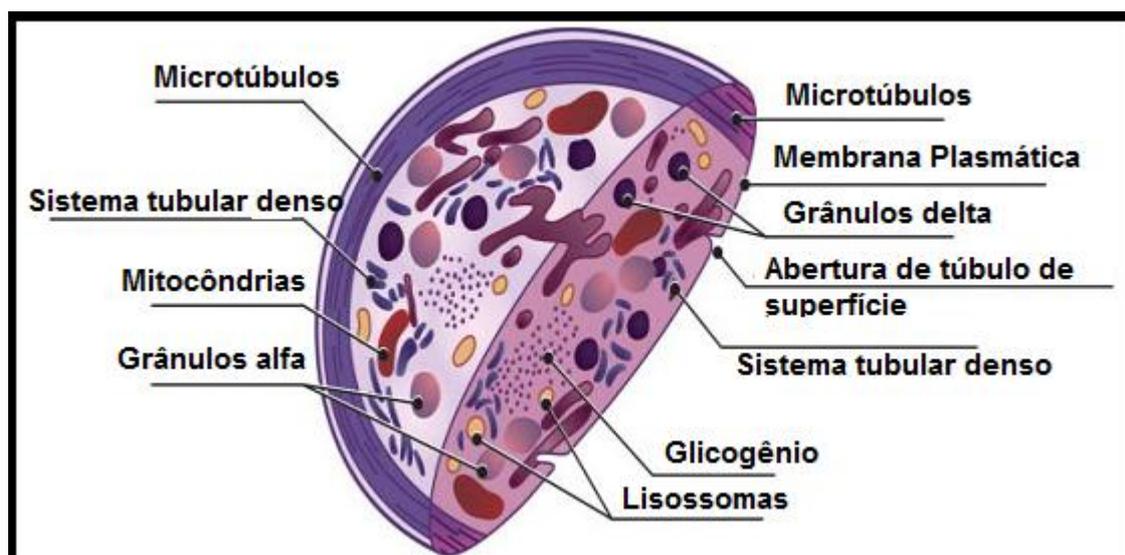


Figura 14: Representação de uma célula plaquetária.

### 3.9 Eritrócitos

O eritrócito humano maduro é uma célula simples, que vive aproximadamente 120 dias na circulação periférica, com flexibilidade fisiológica notável. Os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio através da hemoglobina e estão constantemente expostos às EROs (JOZWIK *et al.*, 1997; TIANO *et al.*, 2000), sendo que diversos parâmetros da integridade e funcionalidade das células vermelhas são negativamente afetados pelo aumento do estresse oxidativo (FERNANDEZ & FINK, 2000). Deste modo, os eritrócitos se apresentam como marcadores biológicos das agressões tóxicas e oxidantes em diferentes órgãos e sistemas.

A membrana dos eritrócitos tem um papel chave na manutenção da sua forma, sendo constituída por 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. A oxidação dos eritrócitos tem sido estudada extensivamente como um modelo de dano oxidativo de biomembranas, e tem sido mostrado que as EROs atacam a membrana dos eritrócitos causando a oxidação de lipídios e proteínas e eventualmente causam hemólise (KONDO *et al.*, 1997; RACEK *et al.*, 2001).

Estudos demonstram que os eritrócitos fazem parte de um sistema refinado de distribuição de glicose aos tecidos em diferentes condições fisiológicas ou

patológicas tais como estresse, atividade física e DM e podem participar efetivamente da regulação glicêmica (SILVA, 1997; SILVA *et al.*, 2005).

### 3.10 Plantas Medicinais e Diabetes *mellitus*

As plantas medicinais com seus vários princípios ativos e propriedades têm sido usadas desde os tempos remotos para o tratamento do DM. Várias pesquisas sobre a atuação de produtos naturais nos diversos mecanismos da fisiopatologia do DM têm sido realizadas nas últimas décadas. Na medicina chinesa tradicional, 82 plantas medicinais têm sido usadas como medicamentos naturais para o tratamento do diabetes 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. Algumas destas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir hipoglicemia como efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (BAE *et al.*, 1999; WANG & NG, 1999; LAMBA *et al.*, 2000; PÉREZ GUTIÉRREZ, 2002).

O mecanismo de ação pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células  $\beta$ -pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação de lipídeos e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (MARLES & FARNSWORTH, 1995; SAID *et al.*, 2002; VOLPATO *et al.*, 2002; HUO *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004).

### 3.10.1 *Syzygium cumini* (L.) Skeels

O *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Sc) (sin. *Eugenia jambolana* Lam. *Syzygium jambolanum* DC) (Figura 15) é uma planta originária da Índia, pertencente a família *Mirtaceae* e conhecida popularmente como Jambolão, que pode ser encontrado em diversos estados do Brasil, incluindo Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (BRAGANÇA, 1996).

O Sc possui em seus constituintes os flavonóides, as saponinas, os ácidos graxos, o tanino, o eugenol, a antimielina e os triterpenos. Todas as partes da planta são utilizadas para fins medicinais e têm grande tradição na medicina alternativa (SIANI *et al.*, 2000). A casca, o fruto, a semente e a folha dessa planta, são frequentemente utilizados no tratamento do diabetes e administrados na forma de diferentes preparados como o extrato aquoso ou decocção, extrato etanólico ou o suco da planta crua (PEPATO *et al.*, 2001). Apresenta propriedades hipoglicêmicas, antiinflamatórias (BRAGA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2007), antipiréticas, hipolipidêmicas e antioxidantes (STANLEY *et al.*, 2003), além de ação antiviral e anticarcinogênciã (ONG & KHOO, 2000) e há uma variedade de relatos indicando a atividade antidiabética do Sc com diferentes modelos de estudos (SHARMA *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação dos componentes do Sc, bem como suas possíveis interações ainda não estão bem esclarecidos. Contudo, PRINCE e colaboradores (1998) demonstraram que a planta possui propriedades antioxidantes por elevar a atividade das enzimas removedoras de radicais livres no fígado, rim e coração de ratos diabéticos induzidos com aloxano e, desta forma, proteger esses tecidos do estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia diabética (HUNT *et al.*, 1988). Estudos também mostraram que o extrato aquoso das sementes de Sc aumentou a atividade da hexoquinase e reduziu a atividade de glicose-6-fosfatase no fígado de ratos com diabetes induzido por aloxano, controlando assim a concentração de glicose sanguínea, sendo os resultados da ação do extrato melhores do que os da utilização de glibenclamida no controle dos níveis de glicemia dos animais experimentais (PRINCE *et al.*, 1997).

Às substâncias das folhas do jambolão é atribuída ação anti-diabética (PEPATO *et al.*, 2001), exercendo a função hipoglicemiante, mimetizando as ações da insulina, regulando os níveis glicêmicos e influenciando no metabolismo e estoque de glicogênio hepático (ONG & KHOO, 2000), além de se mostrarem eficientes na redução dos sinais clínicos da patologia, como polifagia e polidipsia (SOARES *et al.*, 2000; SHAFI *et al.*, 2002). Entretanto, estudos mostraram controvérsias com relação aos efeitos hipoglicemiantes do Sc. Segundo TEIXEIRA e colaboradores (2000), o tratamento com extrato cru preparado das folhas em DM induzido por streptozotocina não apresentou ação antihiper-glicemiante. A decocção das folhas não apresentou atividade antidiabética em ratos (TEIXEIRA *et al.*, 1997, TEIXEIRA *et al.*, 2000 e PEPATO *et al.*, 2001) nem alterou os testes de tolerância à glicose em humanos não diabéticos (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Esta discordância entre autores quanto à atividade hipoglicemiante do jambolão pode estar relacionada à influência dos fatores edáfico-climático na síntese dos seus compostos bioativos, além de que, embora a decocção seja amplamente utilizada pela população, sua preparação pode inativar substâncias com atividade farmacológica e ter contribuído à falta de efeito nestes estudos relatados.

Além disso, estudos relataram efeito inibitório do extrato da casca de Sc na atividade da enzima AChE quando associado à indução de diabetes com Aloxano, indicando que essa planta pode induzir alterações na funcionalidade do sistema colinérgico (MAZZANTI *et al.*, 2004) e vascular, bem como em processos inflamatórios. Entretanto, outros estudos utilizando doses semelhantes não conseguiram demonstrar este efeito (MAZZANTI *et al.*, 2003; SCHOSSLER *et al.*, 2004), mostrando ainda haver controvérsias em relação às propriedades medicinais do jambolão.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram efeito do extrato aquoso das folhas de *Syzygium cumini* (ASc) sobre a atividade da enzima ADA em eritrócitos e soros hiperglicêmicos (BOPP *et al.*, 2009) e na atividade das enzimas ADA e 5'NT em plaquetas de pacientes com DM tipo 2 (DE BONA *et al.*, 2010). Baseado nestes resultados, pode-se sugerir que o Sc seja capaz de auxiliar na manutenção da integridade vascular, prevenindo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.



**Figura 15** - *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Sc) (sin. *Eugenia jambolana* Lam. *Syzygium jambolanum* DC) (LORENZI et al., 2003).

---

## 4. MÉTODOS E RESULTADOS

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

**4.1 Artigo:** *Syzygium cumini* Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients

**4.2 Manuscrito:** Erythrocytic Enzymes and Antioxidant Status in Patients with Type 2 Diabetes: Ameliorating Effect of *Syzygium cumini* Leaf Extract



print  
ISSN 1015-8987

Cell Physiol Biochem  
26(4- 5) 495-798 (2010)

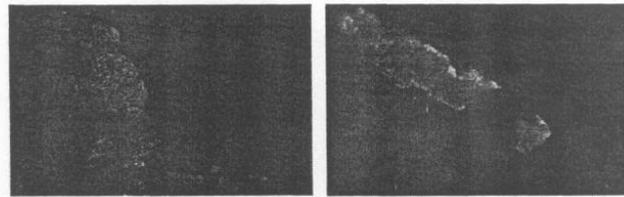
26 4- 5 10

online  
ISSN 1421-9778

[www.karger.com/cp](http://www.karger.com/cp)

# Cellular Physiology and Biochemistry

International Journal of  
Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology



Staining: Cy3-labelled anti-Ceramide

S. Karger  
Medical and Scientific Publishers  
Basel · Freiburg · Paris ·  
London · New York ·  
Bangalore · Bangkok ·  
Singapore · Tokyo · Sydney

**KARGER**

## Original Paper

Cellular Physiology  
and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2010;26:729-738

Accepted: September 14, 2010

**Syzygium cumini Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients**Karine S. De Bona<sup>1</sup>, Luziane P. Bellé<sup>2</sup>, Marcel H. Sari<sup>1</sup>, Gustavo Thomé<sup>3</sup>, Maria R.C. Schetinger<sup>3</sup>, Vera M. Morsch<sup>3</sup>, Aline Boligon<sup>1</sup>, Margareth L. Athayde<sup>1</sup>, Aline S. Pigatto<sup>4</sup> and Maria B. Moretto<sup>1</sup><sup>1</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Centre, Federal University of Santa Maria (UFSM), <sup>2</sup>Postgraduate Program in Pharmacology- UFSM -Santa Maria, <sup>3</sup>Department of Chemistry - UFSM -Santa Maria, <sup>4</sup>Franciscan University Center-UNIFRA-Santa Maria**Key Words**Adenosine deaminase • Diabetes mellitus • 5'Nucleotidase • Oxidative stress • Platelets • *Syzygium cumini* leaves extract**Abstract**

Diabetes mellitus, a chronic metabolic disorder, has assumed epidemic proportions and its long-term complications can have devastating consequences. The oxidative stress in diabetes was greatly increased due to prolonged exposure to hyperglycemia and impairment of oxidant/antioxidant equilibrium. *Syzygium cumini* is being widely used to treat diabetes by the traditional practitioners over many centuries. Adenosine deaminase (ADA) and 5'-Nucleotidase (5'NT) are enzymes of purine nucleoside metabolism that play an important role in the regulation of adenosine (Ado) levels. In this study, we investigated the effect of *Syzygium cumini* aqueous leaves extract (ASc) on ADA and 5'NT activities and on parameters of oxidative stress under *in vitro* conditions, using platelets of patients with Type 2 diabetes mellitus. Platelet-Rich Plasma (PRP) was assayed by ADA, 5'NT, Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD) activities and Thiobarbituric acid reactive substances

(TBARS) levels. We observed that ADA, 5'NT activities and TBARS levels were significantly higher when compared to the control group, and ASc (100 and 200 µg/mL) prevented these effects. Our study demonstrates that ASc was able to remove oxidant species generated in diabetic conditions and modulates in the Ado levels. Then, ASc may promote a compensatory response in platelet function, improving the susceptibility-induced by the diabetes mellitus.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

**Introduction**

Diabetes mellitus (DM) is a worldwide health problem predisposing to markedly increased cardiovascular mortality and morbidity [1, 2]. The prevalence of type 2 DM continues to increase globally and brings a parallel increase in complications associated with cardiovascular disease [3-5]. Indeed, individuals with type 2 DM have a 2- to 4-fold higher risk of developing atherosclerotic cardiovascular disease [6]. Given the myriad perturbations of endothelial dysfunction,

**KARGER**Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com© 2010 S. Karger AG, Basel  
1015-8987/10/0265-0729\$26.00/0Accessible online at:  
www.karger.com/cpbMaria Beatriz Moretto  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Health Science Centre, Federal University of Santa Maria (UFSM)  
97105-900 - Santa Maria, RS (Brazil)  
Fax +55-3220 8018, E-Mail Beatriz@smail.ufsm.br

inflammation, thrombosis, oxidative stress, dyslipidaemia associated with DM, platelet function plays an important role in the long-term development of vascular disease in these patients.

Platelets are responsible for maintaining vascular integrity [7]. Vascular disease associated with altered vascular reactivity is a major complication of DM [8]. Platelets from diabetic patients show greater adhesion and aggregation [9]. Also, blood platelets generate reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) that can be involved in regulation and modulation of their function [10-12]. Moreover, increased free radical activity is suggested to play an important role in lipid peroxidation and protein oxidation of cellular structures causing cell injury and is implicated in the pathogenesis of vascular disease in type 2 DM [13-15]. Platelets are also a very good model for the study of oxidative stress. Oxidative stress reflects an unfavorable imbalance between potentially harmful oxidants and protective antioxidants leading to altered cellular redox state [16]. ROS/RNS have been reported to modulate and, as second messengers, regulate the physiological response of blood platelets (which are involved in hemostasis) to different stimuli [17, 12]. Intracellular sources of ROS in activated platelets are the arachidonic acid pathway (via cyclooxygenase or 12-lipoxygenase) stimulated by different agonists, the GSH cycle [18, 11], and metabolism of phosphoinositides [12].

Platelets express several enzymes on their surface, which constitute a highly organized enzymatic cascade. These enzymes are able to regulate the extracellular concentrations of adenine nucleotides and nucleosides and play an important role in the maintenance of normal hemostasis and thrombogenesis, mainly by regulating the platelet aggregation status [19-21]. One of these enzymes is Adenosine deaminase (Adenosine aminohydrolase, EC 3.5.4.4, ADA) that is one of the key enzymes of purine nucleoside metabolism, participating in the conversion of adenosine (Ado) to inosine and 2'-deoxyadenosine (dAdo) [22]. Two different isoenzymes of ADA designated as ADA1 and ADA2 have been found in mammals and in lower vertebrates. The ADA1 isoenzyme is found in all cells, with the highest activity in lymphocytes and monocytes, whereas ADA2 is the predominant isoenzyme in the serum of normal subjects [23]. ADA is suggested to be an important enzyme for modulating the bioactivity of insulin [24] and in the acute and protracted inflammatory responses [25, 26].

Recent studies have shown that ADA activity was higher in the brains of young rats, when compared to the

60-day-old adult rats [27]. Furthermore, observed an increase in the activity of ADA in the cerebral cortex of rats eight days after neonatal Hypoxia Ischemia [28] and the administration of Methotrexate (MTX) induced a significant decrease in the ADA activity in the cerebral cortex, kidney and liver tissues of young rats [29]. Besides, ADA activity is decreased in plasma of rats exposed to aged and diluted sidestream smoke [30], and in lymphocytes and platelets of patients with multiple sclerosis [31, 32].

The enzyme ecto-5'-Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73, 5'NT) is located in the platelet membrane and promotes the hydrolysis of AMP to its nucleoside, adenosine, in the extracellular medium [33, 34]. Recent studies report that 5'NT is altered in type 2 DM and hypertensive patients probably related with the thromboregulation process [35, 36]. The product of 5'NT, adenosine, is an important modulator of vascular tone, and it is a well-known inhibitor of platelet aggregation [37, 38].

Plant infusions and decoctions have been used as popular medicines in several underdeveloped and developing countries as an alternative treatment for various conditions, including DM [39]. Among these medicinal plants, *Syzygium cumini* (L.) Skeels (sin.: *Eugenia jambolana* Lam., *Syzygium jambolanum* DC) of family Myrtaceae has been intensively studied as an antidiabetic agent and is often recommended as an adjuvant for treatment of type 2 DM. Most of the people prepared an infusion or decoction of dry leaves in an average dilution of 2.5 g/L (0.2-6.9) for *Syzygium cumini* [40]. In other studies, each patient received 2.0 g/day of dry leaf to prepare 1 L of tea [41]. It has been demonstrated that the bark, fruits, seeds or leaves of this plant collected from various regions of the world and administered in different pharmaceutical preparations (e.g. tinctures and aqueous extracts) decrease blood glucose levels in diabetic animals [42] and that polyphenolic compounds, including flavonoids and phenolic acids have various physiological functions, such as antioxidant, antihyperglycemic and antihypertensive properties [43].

Previous findings have reported alterations in 5'NT and ADA activity in platelets from Streptozotocin-induced diabetic rats [21]. Recently, we demonstrated that ADA activities were higher in serum and erythrocytes of hyperglycemic subjects than in control subjects [44]. Both enzymes modulate the concentration of adenosine that can affect the platelets function and contribute for the pathogenesis of the vascular complications. Also, we observed that *Syzygium cumini* leaves extract (ASc)

inhibited ADA activity and reduced glucose levels in hyperglycemic patients [44]. In this regard, due to the significant properties in the hyperglycemic conditions and the meaning of enzymes that hydrolyzes adenine nucleotides in the mechanism of thromboregulation, the present study was undertaken to evaluate the effect of ASc on ADA and 5'NT activities and oxidative stress parameters in platelets from type 2 diabetics under *in vitro* conditions. Finally, we to aim to identify the isoforms of ADA present in these platelets, using the Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA), the well-establishment inhibitor of ADA 1.

## Materials and Methods

### Chemicals

Adenosine was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The substrate AMP was obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) and bovine serum albumin from Reagen (Paraná, Brazil). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

### Plant material and aqueous leaves extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (ASc) preparation

Leaves of *Syzygium cumini* were freshly locally collected, cleaned, dried, and powdered. They were identified by the Laboratory of Botanic and Pharmacognosy of the Franciscan University Center – UNIFRA - Santa Maria, RS, Brazil. The leaves were dried in a greenhouse / (renewal of air) at 40°C for approximately 48 h. Then, they were smashed in the knife mill. The products were submitted to extraction with ethanol 80% in a Soxhlet apparatus until exhaustion. After extraction, the solvent was evaporated by a rotavapor, supplying the crude extract. The mother solution 1% was made from the crude extract dissolving 1g of this extract in 100ml of 0.9% NaCl solution [45].

### High-performance liquid chromatography (HPLC) characterization of the extract

Chromatographic analyses were carried out in isocratic conditions using RP-C<sub>18</sub> column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase was methanol-acetonitrile-water (40:15:45, v/v/v) containing 1.0% acetic acid. The flow rate was 0.8 mL/min, injection volume 20 µl and the wavelength 257 nm. The mobile phase was filtered through a membrane filter 0.45 µm and then degassed by an ultrasonic sound before use. The solutions of standards (rutin, kaempferol, chlorogenic acid and caffeic acid) were prepared in the same mobile phase of HPLC to the standard curve in the concentration range of 0.0125 to 0.200 mg/ml. The chromatographic peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and quantification was performed by peak integration using the

external standard method. The calibration curve for chlorogenic acid was:  $Y = 30153x - 214576$  ( $r = 0.9998$ ), the curve of gallic acid was:  $Y = 16324x - 661582$  ( $r = 0.9967$ ), and the curve of rutin was:  $Y = 19217x - 16949$  ( $r = 1$ ). All chromatographic operations were performed at room temperature and in triplicate [46].

### Sample collection and preparation

The study was in accordance with the guidelines of the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria which approved the experimental protocol (23081.004068-76). Blood samples were taken from 30 patients (19 men and 11 women) with type 2 DM who have done routine tests at the Center of Diagnosis and Secondary Support (Centro de Diagnóstico e Apoio Secundário - CEDAS - Santa Maria - RS/ Brazil). The mean ( $\pm$  SE) age of the patients was  $56.83 \pm 2.13$  years old and fasting glucose levels were  $169.9 (\pm 10.26)$  mg/dL. Data such as age, medication use, presence of malignancy or other status were obtained through the requirements brought by patients at the time of the blood collection. These patients did not use Non steroidal anti inflammatory drug (NSAID) and antiplatelet drugs. Alcoholic subjects, pregnant women, and people with cancer were excluded from the study. The control group consisted of 17 healthy subjects (11 men and 6 women).

Platelet-Rich Plasma (PRP) was prepared by the method of Pilla [31] with the following minor modifications. Total blood was collected with 0.120 M sodium citrate as anticoagulant. The total blood-citrate system was centrifuged at 160 xg during 15 min. Next, the PRP was centrifuged at 1400 xg for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. Platelet pellets were resuspended in HEPES buffer and used to determine enzymatic activities. Biochemical and hematological parameters were determined using routine clinical chemical assays.

### 5'-NT from platelet assay

The ASc was added to the incubation medium at the following concentrations 100 and 200 µg/mL. Enzymatic assay was carried out in a reaction medium containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at a final volume of 200 µl as described by Lunke [35]. Twenty microliters of the enzyme preparation (8–10 µg of protein) was added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of AMP at a final concentration of 2.0 mM, and the time of incubation was 60 min. The reaction was stopped by the addition of 200 µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to provide a final concentration of 5%. After this, the inorganic phosphate released by AMP hydrolysis was determined in triplicate by the method of Chan [47] using KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as standard. The same process was carried out on the control tubes to exclude non enzymatic hydrolysis, by adding twenty microliters of protein to the reaction medium after TCA. The results were expressed as nmol inorganic phosphate released/ minute/ milligram of protein (nmol Pi released/ min/ mg protein).

### ADA activity

ADA activities were measured spectrophotometrically in platelets using the method of Giusti and Gakis [48]. ASc was

	Control	type 2 DM
Age (years)	53.94 ± 3.2	56.83 ± 2.13
♂/♀	11 / 6	19 / 11
HbA1c (g%)	5.98 ± 0.21	**8.06 ± 0.43
Glucose (mg/dL)	91.84 ± 1.81	***169.9 ± 10.26
Urea (mg/dL)	38.2 ± 2.41	36.5 ± 2.5
Creatinine(mg/dL)	0.95 ± 0.06	0.9 ± 0.03
Triglycerides (mg/dL)	128.1 ± 12.15	**252.6 ± 32.7
Total Cholesterol(mg/dL)	204.6 ± 9.4	209.9 ± 10.34
HDL-C (Mg/dL)	47.16 ± 4.6	46.47 ± 1.6
Hemoglobin (g/dL)	14.30 ± 0.5	14.0 ± 0.3
Hematocrit (%)	43.28 ± 1.32	42.05 ± 0.72
Platelets (n/mm <sup>3</sup> )	223.200 ± 12.31	251.300 ± 11.86

**Table 1.** Biochemical and hematological parameters of the experimental groups: Data are presented as mean ± SEM. HbA1c= glycosylated hemoglobin; HDL-C=high density lipoprotein cholesterol. Statistically significant differences from controls, as determined by Student's t-test (\*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

added to the incubation medium at the concentrations cited above during the experimental procedure for 60 min. The activities of total ADA in the presence and absence of EHNA were measured. Platelets were treated with 100 µM EHNA, a potent ADA1 inhibitor. ADA1 activities were calculated by subtracting the activity of ADA2 (measured in the presence of EHNA) from that of total ADA. The combinations of EHNA plus ASc (100 and 200 µg/mL) were tested in platelets to better evaluate the inhibition of EHNA alone and EHNA plus ASc on ADA activities. The protein content used for the platelet experiment was adjusted to between 0.7 and 0.9 mg/mL. Results were expressed in units per liter (U/L).

#### TBARS levels

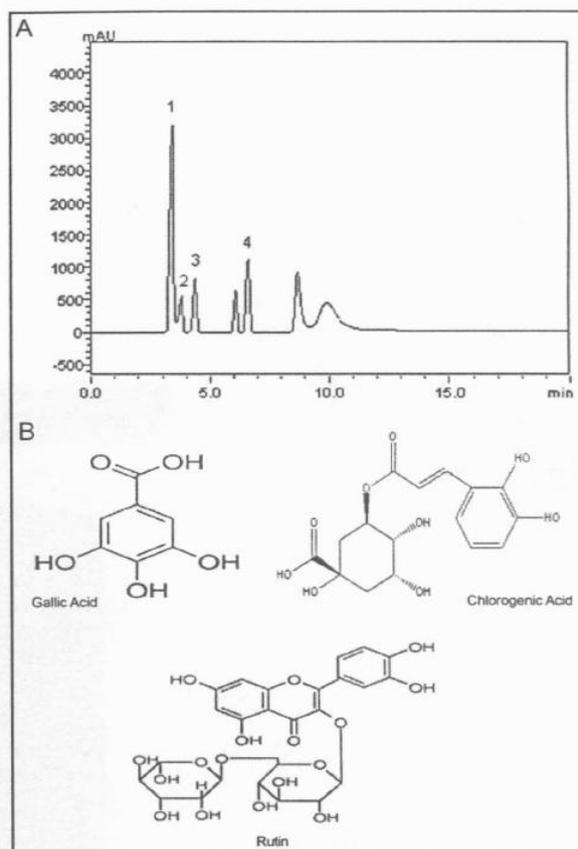
The samples of platelet suspensions were incubated with ASc at 100 µg/mL and 200 µg/mL concentrations for 15 min. Then, they were mixed with an equal volume of 15% (w/v) cold trichloroacetic acid in 0.25 M HCl and with an equal volume of 0.37% (w/v) thiobarbituric acid in 0.25 M HCl. Next, the samples were immersed in a boiling water bath for 10 min. After cooling and centrifugation, absorbance at 535 nm was measured, and results were expressed as nanomoles of MDA/mg protein [16].

#### CAT assay

CAT activity was measured by the method of Aebi [49]. 20 µL of platelets sample was added to a cuvette and the reaction was started by the addition of freshly prepared 0,5 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in phosphate buffer (50mM, pH 7.0). The rate of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) decomposition was measured spectrophotometrically at 240nm during 120 seconds. The activity of catalase was expressed as µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/ ml platelets.

#### SOD assay

SOD (E.C.1.15.1.1) activity in tests was assayed spectrophotometrically as described by McCord and Fridovich [50]. This method is based on the capacity of SOD to inhibit



**Fig. 1.** A. HPLC fingerprint of the Syzygium cumini aqueous leaves extract ; A) showing typical patterns of gallic acid (1), kaempferol(2), chlorogenic acid (3) and rutin (4) in the 257 nm. B. Molecular structures of compounds found in the ASc.

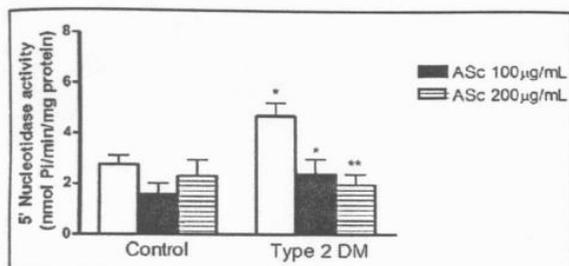
autoxidation of adrenaline to adrenochrome. The color reaction was measured at 480nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26°C.

#### Protein determination

Protein content was determined according to Bradford [51], using bovine serum albumin as standard.

#### Statistical analysis

Statistical differences among groups were analyzed by Student's t-test and one-way analysis of variance, followed by Tukey's multiple range test, when appropriate. The correlations were assessed by Pearson rank correlation coefficient. Differences were considered statistically significant when p<0.05.



**Fig. 2.** *In vitro* exposure of platelets obtained from diabetics and control patients to ASc on 5'NT activity. All samples were run in triplicate. Data are reported as mean  $\pm$  SEM and expressed as nmol Pi/min/mg protein. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* $p < 0.05$  compared with control group; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  compared with type 2 DM group).

## Results

### Biochemical and hematological characteristics of experimental groups

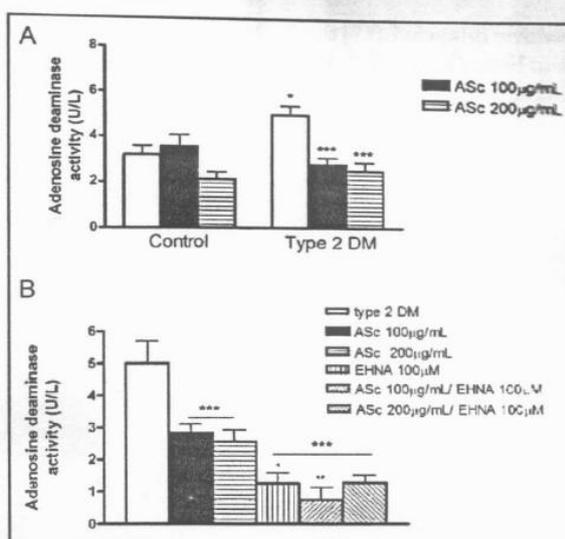
Biochemical and hematological parameters of the study subjects, type 2 DM and healthy controls are depicted in Table 1. Plasma glucose, serum triglyceride levels, and HbA1C levels in the group of diabetic patients were higher than in the healthy group (85.00%, 97.2%, and 34.78% respectively). Total cholesterol, HDL-C, creatinine, hemoglobin, hematocrit and platelets count of type 2 DM patients did not differ significantly from values in healthy subjects.

### Chemical characterization of the extract

HPLC fingerprinting of the aqueous leaf extract showed an elution diagram when the peaks were grouped into three regions based on the UV absorption profile. These regions showed typical patterns of UV absorption, supporting the presence of gallic acid (1), kaempferol (2), chlorogenic acid (3) and rutin (4) in ASc (Fig. 1A), in the concentrations of 0,729% (1), 0,0093% (3) and 0,0304% (4), respectively. Molecular structures are shown in Fig. 1B. Therefore, HPLC analysis revealed that hydrolyzable tannins (galic), flavonoids (rutin) and phenolic are the major components of the extract. The results are similar to other studies [52-57].

### Effect of ASc on 5'NT activity in platelets of type 2 DM subjects and healthy controls

5'NT activity in platelets of type 2 DM subjects were significantly higher than [mean 4.7 ( $\pm 0.52$ )] that observed

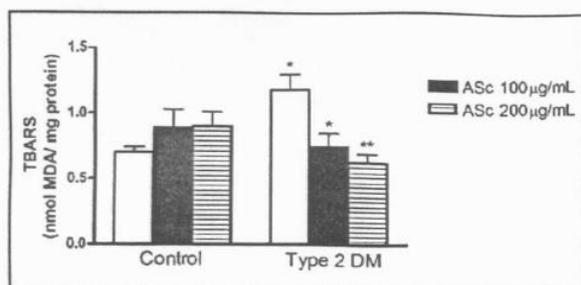


**Fig. 3.** A. Effect of ASc on ADA activity in platelets obtained from diabetics and control patients *in vitro*. All samples were run in triplicate. Data are reported as mean  $\pm$  SEM and expressed as U/L. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group, as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* $p < 0.05$  compared with control group; \*\*\* $p < 0.001$  compared with type 2 DM group). B. Effect of *in vitro* exposure of platelets obtained from type 2 DM patients to ASc and 100  $\mu$ M EHNA on ADA activity. All samples were run in triplicate. Data are reported as mean  $\pm$  SEM and expressed as U/L. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group, as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* $p < 0.05$  compared with ASc 100  $\mu$ g/mL and 200  $\mu$ g/mL; \*\* $p < 0.01$  compared with ASc 100  $\mu$ g/mL; \*\*\* $p < 0.001$  compared with type 2 DM group).

in the control group [mean 2.77 ( $\pm 0.37$ )  $p < 0.05$ ]. When platelets of diabetic patients were incubated with ASc (100 and 200  $\mu$ g/mL) we observed 51.28% and 41.91% of 5'NT activity, respectively (Fig. 2). In the control group, however, no significant difference was found. We also observed a significant positive correlation between 5'NT activity and triglycerides levels of diabetic patients, as shown in Fig. 5A.

### Effect of ASc on ADA activity in platelets of type 2 DM subjects and healthy controls

As illustrated in Fig. 3A, ADA activity in platelets of diabetic subjects were significantly higher than [mean 5.00 U/L ( $\pm 0.4$ )] observed in controls [mean 3.18 ( $\pm 0.4$ ) U/L,  $p < 0.05$ ]. Also, we evaluated the effects of ASc on the ADA activity. Experimental data demonstrated that ADA activity in platelets of diabetic subjects in the presence of



**Fig. 4.** Effect of *in vitro* exposure of platelets obtained from type 2 DM and control patients to ASc on TBARS levels. Data are reported as mean ± SEM. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* p<0.05 compared with control group; \* p<0.05; \*\*p< 0.01 compared with type 2 DM group).

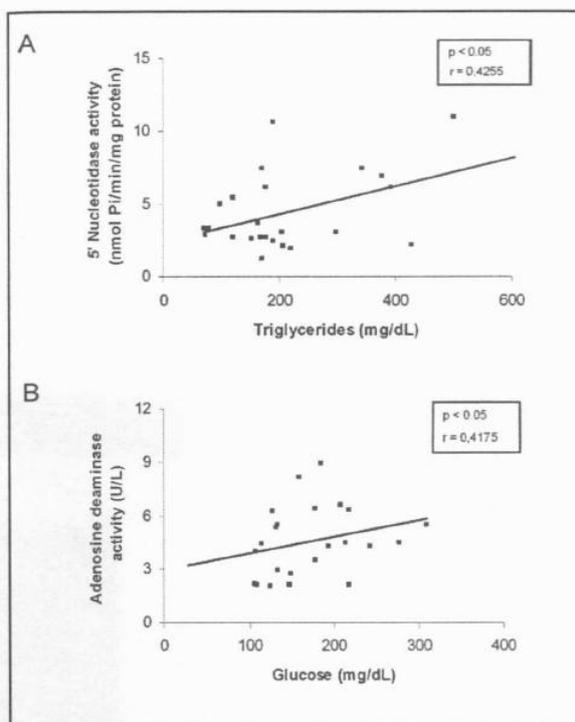
100 and 200 µg/mL of ASc was 57.7% and 52.03%, respectively. However, in the control group ASc did not present any effect. When ASc (100 and 200 µg/mL) was incubated with EHNA we observed 15.03 % and 26.015% of ADA2 activity. These findings indicate that in the presence of ASc (100 and 200 µg/mL), ADA1 activity was 42.66 % and 26.015 % in platelets of type 2 DM subjects (Fig. 3B). We also observed a significant positive correlation between ADA activities and blood glucose levels, as shown in Fig. 5B.

*TBARS levels and antioxidant enzymes*

We observed that there was a significant increase in TBARS levels in platelets of type 2 DM subjects (1.18 ± 0.12) when compared to the control group [(0.7 ± 0.04), p<0.05] (Fig. 4). However, after the samples were incubated with ASc, we verified a significant reduction in TBARS levels to 0.74 (±0.10) and 0.62 (±0.07) at 100 µg/mL and 200 µg/mL, respectively, in diabetic subjects. As shown in Table 2, no significant difference was found between the SOD and CAT activities in the subjects studied.

**Discussion**

Many pathological alterations, such as vascular disease, increased platelet reactivity, and altered platelet morphology have been reported in patients with DM [58-60]. Platelets are an important source of purine signaling molecules for blood, such as ATP and ADP, which are related to several physiological events. Of particular



**Fig. 5.** A. Association between platelets 5'NT activities and triglycerides levels. There was observed a significant positive correlation (r = 0,4255, p<0.05). 5'NT activities are expressed in nmol Pi/min/mg protein, and triglycerides levels are expressed in mg/dL. B. Association between platelets ADA activities and glucose levels. There was observed a significant positive correlation (r = 0,4175, p<0.05). ADA activities are expressed in U/L, and glucose levels are expressed in mg/dL.

	Control	type 2 DM
SOD (U SOD/ ml platelets)	97.46 ± 3.17	95.04 ± 4.01
CATALASE (umol H2O2/min/ml platelets)	146.2 ± 18.52	123.9 ± 12.44

**Table 2.** Levels of antioxidants enzymes in platelets of different study groups: SOD and CAT activities in the platelets of type 2 DM subjects and control group (data are expressed as mean ± SEM). There were no significant differences, as determined by Student's t-test.

interest, the metabolism of extracellular nucleotides plays an important regulatory role in the control of adequate hemostasis, mainly by regulating platelet coagulant status [61]. In the present study, we observed an increase of 5'NT activity in diabetic platelets (Fig. 2) would lead to an increase in the level of Ado. In fact, Ado, is an

important modulator of vascular tone, and it is a well-known inhibitor of platelet aggregation both *in vitro* and *in vivo* [62-64]. Recent studies have indicated a significant increase in 5'NT activities in platelets from diabetic type 2, hypertensive and diabetic type 2/hypertensive patients [35] and in platelets of Alloxan-treated rats [65].

Likewise, ADA activity was increased in platelets of diabetics (Fig. 3A). Corroborating with these results, Rutkiewicz and Górski [24] also found a significant elevation in ADA activity in tissues of diabetic rats induced with Streptozotocin (STZ), leading reduction Ado levels. Ado acts directly to stimulate or increase sensitivity to insulin [66] and to induce vasodilatation. Studies have suggested that the insulin is involved in the regulation of ADA activity in diabetes, and insulin administration is capable of decreasing the elevated activity of this enzyme in these tissues [67, 68]. Consequently, these effects would affect the development of vascular complications observed in the diabetic state, since Ado has an important role in preventing the thrombotic process. In fact, platelet activation, shape change, alterations in platelet cell membrane are implicated in different cellular signaling pathways in diabetic state [9].

We observed that ASc decreased significantly the 5'NT and ADA activities (Fig. 2 and Fig. 3A) in the platelets of subjects with type 2 DM. Based on our findings, we may suggest that ASc is able to maintain a level of Ado in the extracellular environment, which promotes vasodilatation and has an important protective role under pathophysiological conditions caused by the hyperglycemic state. Furthermore, studies showed that the thrombosis is inhibited by polyphenolic compounds which are present in ASc. These compounds can act through mechanisms like platelet activation associated to signal transduction and attenuation of generation of reactive oxygen species [69]. In addition, the inhibition of ADA can have protective effects on the ischemic tissues by preventing free radical-mediated injury and this is related to the improvement of cardiovascular activity [70]. In this regard, we can suggest that ASc may help in maintaining vascular integrity important in the hyperglycemic state. Further studies in the understanding of effect of ASc are currently under investigation by our group.

The diabetic state increased the production of levels of thiobarbituric acid in the circulation (Fig. 4). The hyperglycaemia can generate oxidative stress which has been suggested to play a primary role which may mediate tissue injury in Diabetes [71, 72]. In DM free radical over-production is not only specifically involved to the

development of the complications [73], but is also involved in generating endothelial dysfunction and is linked to an increased risk of cardiovascular disease [74]. Not only in resting blood platelets but also during platelet activation that different reactive oxygen species are generated [10, 12].

Similarly, ASc reduced significantly TBARS levels (Fig. 4) in diabetic subjects. The main compounds present in the ASc (gallic acid, chlorogenic acid and rutin) can be responsible for these effects, since they have been known by their antioxidant capacity. The protection effect of ASc observed in the present study is consistent with the beneficial results found by Stanley [75], Moresco [76] and Bopp [44].

Controversies about activities of SOD and CAT have been reported in diabetics [77-79]. However, no significant difference was found in our study (Table 2). These controversial results may be due to a compensation mechanism of the body. Moreover, Hartnett [80] found a strong association between reduced SOD activity and diabetes, and considered their results to be unexpected in a disease with elevated oxidative compounds. Interestingly, we observed a moderate positive correlation between ADA activity and glucose levels (Fig. 5B) in diabetic subjects. Studies have been shown that a decrease in the level of Ado in circulation may be associated with a decrease in insulin-stimulated glucose uptake [81, 82]. Adenosine directly stimulates insulin activity via several processes, such as glucose transport, lipid synthesis, pyruvate dehydrogenase activity, leucine oxidation and cyclic nucleotide phosphodiesterase activity [24, 83, 84]. Then, the increase in ADA activity may reflect the decrease in adenosine circulation, leading the declining of sensitivity by insulin and consequently the increase of glucose.

Also, we observed a positive correlation between triglycerides levels and 5'NT activity (Fig 5A). The level of serum lipids is usually raised in diabetes and seems to be associated with an increase in the risk of vascular disease. Significant disorders of lipid metabolism occur in the course of diabetes, manifested by total cholesterol level increase and changes in proportions and levels of serum lipid fractions [85]. There is evidence that adenosine can regulate several aspects of adipose tissue function including lipolysis [86, 87]. It is also pertinent that insulin administration *in vivo* decreases blood flow in rat white adipose tissue, and it has been hypothesized that this is achieved by decreased production of adenosine [88]. Furthermore, ADA1 activity was higher in platelets of type 2 DM subjects, corroborating with our previous

findings observed in erythrocytes of hyperglycemic samples [44].

In conclusion, ADA and 5'NT activities were higher in platelets of diabetics than control subjects, as well as TBARS levels. These oxidative phenomena were prevented by co-incubation with ASc. As a further confirmation of our hypothesis, in this paper we show that hyperglycemia is the prominent cause for the production of free radicals and modulation of enzymatic activities and platelet homeostasis, since these enzymes have a substantial function in the regulation of platelet aggregation. Moreover, the effects of ASc may be associated with the presence of gallic acid, chlorogenic acid and rutin. Thus, we can suggest that ASc could promote a compensatory response in platelet function, once that maintains levels of adenosine and contributes

to the vasodilatation and inhibition of platelet aggregation beyond present antioxidant properties that play an important role in the prevention of various cardiovascular diseases.

### Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Karine is scholar of CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). We wish to thank the Programa Especial de Incentivo às Publicações Internacionais (PRPGP/UFSM) and the Centro de Diagnóstico e Apoio Secundário (CEDAS).

### References

- Zimmet PZ, Mccarty DJ, De Couten MP: The global epidemiology of non insulin dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J Diabetes Complications* 1997;11:60-68.
- Dobrin JS, Lebeche D: Diabetic cardiomyopathy: signaling defects and therapeutic approaches. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010;8:373-391.
- Roffi M, Chew DP, Mukherjee D, Bhatt DL, White JA, Heeschen C, Hamm CW, Moliterno DJ, Califf RM, White HD, Kleiman NS, Théroux P, Topol EJ: Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors reduce mortality in diabetic patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:2767-2771.
- 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* 2004;27:1047-1053.
- Mathewkutty S, McGuire DK: Platelet perturbations in diabetes: implications for cardiovascular disease risk and treatment. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2009;7:541-549.
- Natarajan A, Marshall SM, Worthley SQ, Badimon JJ, Zaman AG: The presence of coronary artery disease increases platelet-dependent thrombosis in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost* 2008;6:2210-2213.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C: Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ectonucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:9-16.
- Sprague RS, Stephenson AH, Bowles EA, Stumpf MS, Lonigro AJ: Reduced expression of G(i) in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release. *Diabetes* 2006;55:3588-3593.
- El Haouari M, Rosado JA: Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:119-23.
- Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Praticò D, Violi F: Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:999-1006.
- Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F: Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998;91:484-490.
- Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczyński A: Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002;13:175-182.
- Halliwell B: Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 1997;55:44-52.
- Matkovic A: An overview of free radical research. *Acta Biol Szegediensis* 2003;47:93-99.
- Tiwari AK: Antioxidants: new generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Curr Sci* 2004;86:1092-1102.
- Olas B, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B: D-glucaro 1,4-lactone and resveratrol as antioxidants in blood platelets. *Cell Biol Toxicol* 2008;24:189-199.
- Olas B, Wachowicz B: Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets* 2007;18:555-65.
- Jahn B, Hansch GM: Oxygen radical generation in human platelets: dependence on 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;93:73-79.
- Fürstenau CR, Trentin DdaS, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ: Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 2006;17:84-91.
- Yegutkin GG: Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:673-694.

- 21 Schmatz R, Schetinger MR, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PA, Gutierrez J, Corrêa Mde C, Giroto E, Moretto MB, Morsch VM: Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2009;84:345-350.
- 22 Ratech H, Martiniuk F, Borer WZ, Rappaport H: Differential expression of adenosine deaminase isozymes in acute leukemia. *Blood* 1988;72:1627-1632.
- 23 Ungerer JP, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJ: Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin Chem* 1992;38:1322-1326.
- 24 Rutkiewicz J, Górski J: On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. *FEBS Letters* 1990;271:79-80.
- 25 Conlon BA, Law W R: Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin Exp Immunol* 2004;138:14-20.
- 26 Desrosiers MD, Cembrola KM, Fakir MJ, Stephens LA, Jama FM, Shameli A, Mehal WZ, Santamaria P, Shi Y: Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. *J Immunol* 2007;179:1884-1892.
- 27 Bellé LP, De Bona KS, Abdalla FH, Pimentel VC, Pigatto AS, Moretto MB: Comparative evaluation of adenosine deaminase activity in cerebral cortex and hippocampus of young and adult rats: effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on their susceptibility to heavy metal exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;104:408-413.
- 28 Pimentel VC, Bellé LP, Pinheiro FV, De Bona KS, Da Luz SC, Moretto MB: Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia. *Int J Dev Neurosci* 2009;27:857-62.
- 29 Pinheiro FV, Pimentel VC, De Bona KS, Scola G, Salvador M, Funchal C, Moretto MB: Decrease of adenosine deaminase activity and increase of the lipid peroxidation after acute methotrexate treatment in young rats: protective effects of grape seed extract. *Cell Biochem Funct* 2010;28:89-94.
- 30 Thomé GR, Mazzanti CM, Ahmed M, Corrêa M, Spanevello RM, Maldonado PA, Luchese C, Cargnelutti D, Morsch VM, Duarte MM, Fiorenza AM, Nogueira CW, De Bona KS, Moretto MB, Da Luz SC, Mazzanti A, Schetinger MR: Activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase in rats exposed to cigarette smoke. *Inhal Toxicol* 2009;21:906-912.
- 31 Spanevello RM, Mazzanti CM, Bagatini M, Correa M, Schmatz R, Stefanello N, Thomé G, Morsch VM, Becker L, Bellé L, de Oliveira L, Schetinger MR: Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2010;257:24-30.
- 32 Spanevello RM, Mazzanti CM, Schmatz R, Thomé G, Bagatini M, Correa M, Rosa C, Stefanello N, Bellé LP, Moretto MB, Oliveira L, Morsch VM, Schetinger MR: The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Chim Acta* 2010;411:210-4.
- 33 Pilla C, Emanuelli T, Frassetto SS, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JF: ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 1996;7:225-230.
- 34 Frassetto SS, Schetinger MRC, Schierholt R, Webber A, Bonan CD, Wyse AT, Dias RD, Netto CA, Sarkis JJ: Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:1369-1377.
- 35 Lunkes GI, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch VM, Mazzanti CM, Schetinger MR: Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res* 2003;109:189-194.
- 36 Miron VR, Bauermann L, Morsch AL, Zanin RF, Corrêa M, da Silva AC, Mazzanti C, Morsch VM, Lunkes GI, Schetinger MR: Enhanced NTPDase and 5'-nucleotidase activities in diabetes mellitus and iron-overload model. *Mol Cell Biochem* 2007;298:101-107.
- 37 Kitakaze M, Hori M, Sato H, Takashima S, Inoue M, Kitabatake A, Kamada T: Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circ Res* 1991;69:1402-1408.
- 38 Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H: Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 2000;96:2157-2162.
- 39 Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS: Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 2006;104:367-373.
- 40 Teixeira CC, Fuchs FD: The efficacy of herbal medicines in clinical models: the case of jambolan. *J Ethnopharmacol* 2006;108:16-19.
- 41 Teixeira CC, Weinert LS, Barbosa DC, Ricken C, Esteves JF, Fuchs FD: *Syzygium cumini* (L.) Skeels in the treatment of type 2 diabetes: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled trial. *Diabetes Care* 2004;27:3019-20.
- 42 Pandey M, Khan A: Hypoglycaemic effect of defatted seeds and water soluble fibre from the seeds of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels in alloxan diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 2002;40:1178-1182.
- 43 Ushida Y, Matsui T, Tanaka M, Matsumoto K, Hosoyama H, Mitomi A, Sagesaka Y, Kakuda T: Endothelium-dependent vasorelaxation effect of rutin-free tartary buckwheat extract in isolated rat thoracic aorta. *J Nutr Biochem* 2008;19:700-707.
- 44 Bopp A, De Bona KS, Bellé LP, Moresco RN, Moretto MB: *Syzygium cumini* inhibits adenosine activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. *Fundam Clin Pharmacol* 2009;23:501-507.
- 45 Eidi A, Eidi M, Esmaili E: Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 2006;13:624-629.
- 46 Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C: Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:714-719.
- 47 Chan K, Delfert D, Junger KD: A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986;157:375-378.
- 48 Giusti G, Gakis C: Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 1971;12:417-425.
- 49 Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-127.
- 50 McCord J, Fridovich I: Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.
- 51 Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-254.
- 52 Alberton JR, Ribeiro A, Sacramento LVS, Franco SL: Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). *Rev Bras Farmacogn* 2001;11:37-50.
- 53 Mahmoud II, Marzouk MAS, Maharram FA, El-Gindi MR, Hassan AMK: Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* 2001;58:1239-1244.
- 54 Damasceno L, Ventura R, Cardoso J, Segura J: Diagnostic evidence for the presence of beta-agonists using two consecutive derivatization procedures and gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;780:61-71.

- 55 Timbola AK, Szpoganicz AB, Monache FD, Pizzolatti MG: A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitoterapia* 2002;73:174-176.
- 56 Migliato KF, Baby AR, Zague V, Velasco MVR, Corrêa MA, Sacramento LVS, Salgado HRN: Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Acta Farm Bonaerense* 2006;25:310-304.
- 57 Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS, Dev G: Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol* 2003;85:201-206.
- 58 Srivastava S, Joshi CS, Sethi PP, Agrawal AK, Srivastava SK, Sethi PK: Altered platelet functions in non-insulindependent diabetes mellitus (NIDDM). *Thromb Res* 1994;76:451-461.
- 59 Ouvinã SO, La Greca RD, Zanaro NL, Palmer L, Sassetti B: Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res* 2001;102:107-114.
- 60 Hekimsoy Z, Payzin B, Ornek T, Kandogan G: Mean platelet volume in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complicat* 2002;18:173-176.
- 61 Kas-Deelen AM, Bakker WW, Olinga P, Visser J, de Maar EF, van Son WJ, The TH, Harmsen MC: Cytomegalovirus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) on endothelial cells. *FEBS Lett* 2001;491:21-25.
- 62 Soslau G, Youngprapakorn D: A possible dual physiological role of extracellular ATP in modulation of platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1997;1355:131-140.
- 63 Sun B, Le SN, Lin S, Fong M, Guertin M, Liu Y, Tandon NN, Yoshitake M, Kambayashi J: New mechanism of action for cilostazol: interplay between adenosine and cilostazol in inhibiting platelet activation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:577-85.
- 64 Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Skladanowski AC: Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica* 2006;53:269-278.
- 65 Lunkes GI, Lunkes D, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch A, Miron VR, Schetinger MR: NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2004;65:1-6.
- 66 Jamal Z, Saggerson ED: Enzymes involved in adenosine metabolism in rat white and brown adipocytes. Effects of streptozotocin-diabetes, hypothyroidism, age and sex differences. *Biochem J* 1987;245:881-886.
- 67 Kurtul N, Pence S, karsu E, Kocoglu H, Aksoy Y, Aksoy H: Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Medica* 2004;47:33-35.
- 68 Prakash MS, Chennaiah S, Murthy YSR, Anjaiah E, Rao SA, Suresh C: Altered adenosine deaminase activity in type 2 diabetes mellitus. *JACM* 2006;7:114-117.
- 69 Wright B, Moraes LA, Kemp CF, Mullen W, Crozier A, Lovegrove JA, Gibbins JM: Structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *Br J Pharmacol* 2010;159:1312-1325.
- 70 Xia Y, Khatchikian G, Zweier JL: Adenosine deaminase inhibition prevents free radical-mediated injury in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1996;271:10096-100102.
- 71 Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-412.
- 72 Pfaffly JR: Diabetic complications, hyperglycemia & free radicals. *Free Radic Biol Med* 2001;77:222.
- 73 Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820.
- 74 Pennathur S, Heinecke JW: Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:955-969.
- 75 Stanley Mainzen Prince P, Kamalakkannan N, Menon PV: *Syzygium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. *J Ethnopharmacol* 2003;84:205-209.
- 76 Moresco RN, Sperotto RL, Bernardi AS, Cardoso RF, Gomes P: Effect of the aqueous extract of *Syzygium cumini* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 2007;21:793-795.
- 77 Sundaran RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Vishwanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR: Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996;90:255-260.
- 78 Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V: Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1996;13:715-719.
- 79 Ayidin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahir G, Isimer A: Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2001;34:65-70.
- 80 Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D: Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2000;23:234-240.
- 81 Kuroda M, Honnor RC, Cushman SW, Londo C, Simpson IA: Regulation of insulin-stimulated glucose transport in the isolated rat adipocyte. *J Biol Chem* 1987;262:245-253.
- 82 Wyatt DA, Edmunds MC, Rubio R, Berne RM, Lasley RD, Mentzer RM Jr: Adenosine stimulates glycolytic flux in isolated perfused rat hearts by A1- adenosine receptors. *Am J Physiol* 1989;257:952-957.
- 83 McLane MP, Black PR, Law WR, Raymond RM: Adenosine reversal of in vivo hepatic responsiveness to insulin. *Diabetes* 1990;39:62-69.
- 84 Hoshino T, Yamada K, Masuoka K, Tsuboi I, Itoh K, Nonaka K, Oizumi, K: Elevated adenosine deaminase activity in the serum of patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1994;25:97-102.
- 85 Dunn FL: Management of dyslipidemia in people with type 2 diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11:41-51.
- 86 Schwabe U, Schönhöfer PS, Ebert R: Facilitation by adenosine of the action of insulin on the accumulation of adenosine 3':5'-monophosphate, lipolysis, and glucose oxidation in isolated fat cells. *Eur J Biochem* 1974;46:537-545.
- 87 Fredholm BB: Local regulation of lipolysis in adipose tissue by fatty acids, prostaglandins and adenosine. *Med Biol* 1978;56:249-261.
- 88 Madsen J, Malchow-Moller A: Effects of glucose, insulin and nicotinic acid on adipose tissue blood flow in rats. *Acta Physiol Scand* 1983;118:175-180.



**Erythrocytic Enzymes and Antioxidant Status in Patients with Type 2 Diabetes:  
Ameliorating Effect of *Syzygium cumini* Leaf Extract**

Karine Santos De Bona<sup>a</sup>, Luziane Potrich Bellé<sup>b</sup>, Paula Eliete Rodrigues Bittencourt<sup>a</sup>,  
Gabriela Bonfanti<sup>b</sup>, Victor Camera Pimentel<sup>c</sup>, Amanda Roggia Ruviaro<sup>d</sup>, Maria Rosa  
Chitolina Schetinger<sup>c</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>d</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>a</sup>

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

Health Science Centre

Federal University of Santa Maria (UFSM)

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Pharmacology- UFSM -Santa Maria - Brazil

<sup>c</sup>Department of Chemistry - UFSM -Santa Maria – Brazil

<sup>d</sup>Department of Technology and Food Science – UFSM- Santa Maria- Brazil

**Correspondent author:**

Maria Beatriz Moretto

Beatriz@smail.ufsm.br

Fax: +55 - 3220 8018

## ABSTRACT

Type 2 Diabetes *mellitus* (DM) is a complex metabolic disease that involves numerous biochemical abnormalities. The function and integrity of erythrocyte are affected by increased oxidative stress and by changes in membrane fluidity caused by hyperglycemic conditions. In view of the hypoglycemic effects of *Syzygium cumini* (Sc), the aim of the present study was to investigate the effects of aqueous *Syzygium cumini* leaf extract (ASc) at 100 µg/mL and 200 µg/mL on Adenosine deaminase (ADA) activity, important in the regulation of adenosine (Ado) levels, on Acetylcholinesterase (AChE) activity, important for many vital functions, and on oxidative stress parameters under *in vitro* conditions using erythrocytes and plasma of patients with type 2 DM. The results demonstrated that ADA and AChE activities, and Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS) levels were significantly higher in erythrocytes of diabetic group, while SOD activity and Non protein thiol groups (NP-SH) levels were decreased in type 2 diabetics when compared to control group. ASc, *in vitro*, reduced the increase of ADA and AChE activities and provided some protection against stress oxidative. Furthermore, we observed significant correlations between Vitamin C (VIT C) and Protein thiol groups (P-SH), fasting glucose and P-SH and (NP-SH) levels, P-SH levels and ADA activity, as well as NP-SH and TBARS levels in the diabetic group. The results suggest that ASc is able to favor the reduction of erythrocyte membrane fluidity, the inflammation and the oxidative stress, and exerted a beneficial action against changes occurring in the patients studied, once the parameters evaluated play an important role in DM.

*Keywords:* Acetylcholinesterase; Adenosine deaminase; Diabetes *mellitus*; Oxidative stress; *Syzygium cumini*;

## 1. Introduction

Diabetes *mellitus* (DM) is characterized by insulin resistance with significant metabolic dysfunction and abnormal endothelial function (Hsueh et al., 2004). Many *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that several parameters of erythrocyte function and integrity, including changes in membrane fluidity, enzymatic properties of membrane bound enzymes, increase in lipid peroxidation, have all been described following the exposure of oxidative stress to erythrocytes (Halliwell and Gutteridge, 1986; Rohn et al., 1998).

Adenosine plays an important role in the regulation of many metabolic processes, including modulation of blood flow, adipocyte tissue metabolism and glycogen turnover in the liver (Sands and Palmer, 2005; Uluoglu et al., 2008). DM may affect the metabolism of adenosine by changing the activities of the principal enzymes involved in nucleoside production and degradation (Pawelczyk et al., 2000). Adenosine deaminase (EC 3.5.4.4, ADA) is present in all mammalian cells. It catalyses the irreversible deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine into inosine and 2'-deoxyinosine, respectively (Bax et al., 2000). In the human erythrocyte, about 30 per cent of the total ADA activity is membrane associated (Bielat and Tritsch, 1989).

In the same way, another enzyme, Acetylcholinesterase (AChE), which promotes the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine, has an essential role in regulating many vital functions, and responds to various insults including oxidative stress, an important event that has been related to the pathogenesis and progression of DM (Silman and Sussman, 2005; Mazzanti et al., 2006; Kuhad et al., 2008).

Many traditionally used medicinally important plants have been proved for their antidiabetic potential (Grover et al., 2002; Sabu and Kuttan, 2002). Among these medicinal plants, *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Sc) of the Myrtaceae family has been intensively studied as an antidiabetic agent and has often been recommended as an adjuvant for the treatment of DM. Experimental data revealed the potential hypoglycemic activity of Sc leaf extract (Prince et al., 2003; Villasenõr and Lamadrid, 2006). Also, it has been shown that both seed and bark extracts of Sc can decrease

blood glucose levels of diabetic and normal rabbits (Ratsimamanga et al., 1973; Kedar and Chakrabarti, 1983).

Recently, we demonstrated that ADA activity was higher in erythrocytes obtained from hyperglycemic patients than in the control group (Bopp et al., 2009) and that aqueous *Syzygium cumini* leaf extract (ASc) inhibited the increase of ADA activity in erythrocytes and platelets (Bopp et al., 2009; De Bona et al., 2010). Thus, since erythrocytes are the blood elements with the highest content of AChE and contain large quantities of ADA (Willis et al., 1987; Geiger et al., 1991; Neumann et al., 2007) and in view of the protective effects of ASc in diabetic patients, the present study was carried out to evaluate the effect of ASc on ADA and AChE activities and oxidative stress parameters in erythrocytes (RBC) from diabetics, under *in vitro* conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Adenosine was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Acetylthiocholine iodide and 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

### 2.2. Plant material and aqueous leaves extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (ASc) preparation

Leaves of Sc were freshly locally collected, cleaned, dried, and powdered. They were identified by the Laboratory of Botanic and Pharmacognosy of the Franciscan University Center – UNIFRA - Santa Maria, RS, Brazil. The leaves were dried in a greenhouse / (renewal of air) at 40°C for approximately 48 h. Then, they were smashed in the knife mill. The products were submitted to extraction with ethanol 80% in a Soxhlet apparatus until exhaustion. After extraction, the solvent was

evaporated by a rotavapor, supplying the crude extract. The mother solution 1% was made from the crude extract dissolving 1g of this extract in 100ml of 0.9% NaCl solution (Eidi et al., 2006). The chemical characterization of the extract was determined in recent study. HPLC analysis revealed that hydrolyzable tannins (galic), flavonoids (rutin) and phenolic are the major components of the extract (De Bona et al., 2010). Molecular structures are shown in Fig. 1.

### *2.3. Sample collection and preparation*

The study was in accordance with the guidelines of the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria which approved the experimental protocol (23081.004068-76) and with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association. All subjects were interviewed and all volunteers (diabetic patients and normal subjects) were informed about the nature of the study and their consent to participate in the study was obtained. Blood samples were taken from 30 patients (13 men and 17 women) with type 2 DM who have done routine tests at the Center of Diagnosis and Secondary Support (Centro de Diagnóstico e Apoio Secundário - CEDAS – Santa Maria – RS/Brazil). The mean ( $\pm$  SEM) age of the patients was 57.83 ( $\pm$  2.16) years old and fasting glucose levels were 152.1 ( $\pm$ 8.12) mg/dL. Alcoholic subjects, pregnant women, and people with cancer were excluded from the study. All patients were under treatment with hypoglycemic agents. The control group consisted of 20 healthy subjects (9 men and 11 women). The general characteristics of the participants are shown in Table 1.

Whole blood was collected in tubes with EDTA, centrifuged for 15 min at 2500 rpm, and the erythrocytes were washed twice in 0,9% NaCl and recovered by centrifugation, finally, packed erythrocytes were obtained. The erythrocytes hemolysates (RBC) were used to make Non protein thiol groups (NP-SH), AChE, Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD) activities. The erythrocyte membranes (ghosts) were obtained following the method described by Marchesi and Palade (1967), with minor modifications. The erythrocyte hemolysate was lysed in 10 volumes of 5 mM Tris-HCl (pH 7.0), mixed 15-20 min and centrifuged 25.000 g, 30 min. The supernatant was discarded and red cells were resuspended in same medium, mixed and centrifuged. The red cells were suspended in 0.05 M Tris-HCl

(pH 7.0), 0.50 M NaCl, and centrifuged 25.000 g, 10 min. Red cells (now faint pink in color) were suspended in 5 mM Tris-HCl (pH 7.0), and centrifuged twice at 25.000 g, 10 min, until the membrane became colourless. The ghosts were used for the estimations of ADA activity, TBARS levels and Protein thiol groups (P-SH). The samples of plasma obtained with EDTA were used for P-SH and Vitamin C (VIT C) determinations. Biochemical and hematological parameters were determined using routine clinical chemical assays.

#### *2.4. ADA activity assay*

The samples of ghosts were incubated with ASc at 100 µg/mL and 200 µg/mL concentrations during the experimental procedure for 60 min, and ADA activities were measured spectrophotometrically using the method of Giusti and Gakis (1971). Results were expressed in units per g protein (U/g protein).

#### *2.5. AChE activity assay*

AChE activity was determined by the method of Elmann et al. (1961), modified by Worek et al. (1999). The samples of RBC were incubated with ASc at 100 µg/mL and 200 µg/mL. To achieve temperature equilibration and complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated for 10 min prior to the addition of substrate. Enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. The butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) was inhibited by ethopropazine. AChE activity was measured at 436 nm and 37°C using polystyrol cuvetts. All samples were run in duplicate or triplicate and the enzyme activity was expressed in µmol AcSCh/h/hemoglobin.

#### *2.6. Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS) assay*

The analysis of the production of TBARS was performed essentially by the method of Moore et al. (1989), with minor modifications. The samples of ghosts were

incubated with ASc at 200 µg/mL for 15 min. Then, they were mixed with thiobarbituric acid (0.47%) also containing 0.4 g of trichloroacetic acid. This solution was then boiled for 15 min and allowed to cool before the measurement of UV absorption at 532 nm. Results were expressed as nanomoles of MDA/mg protein.

### 2.7. CAT activity assay

CAT activity in RBC was measured by the method of Aebi (1984). 20 µL of RBC sample was added to a cuvette and the reaction was started by the addition of freshly prepared 0,5 M hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). The rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition was measured spectrophotometrically at 240nm during 120 seconds. The activity of CAT was expressed as µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/ml erythrocytes.

### 2.8. SOD activity assay

SOD (E.C.1.15.1.1) activity in RBC was assayed spectrophotometrically as described by McCord and Fridowich (1969). This method is based on the capacity of SOD to inhibit autoxidation of adrenaline to adrenochrome. The color reaction was measured at 480nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26°C. The activity of SOD was expressed as USOD/ ml erythrocytes.

### 2.9. VIT C determination

Plasma VIT C was estimated as described by Galley et al. (1996) with some modifications by Jacques-Silva et al. (2001). Plasma was precipitated with 1 volume of a cold 5% trichloroacetic acid solution followed by centrifugation. An aliquot of 300 µL of the supernatants were mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg/mL) and 13.3% trichloroacetic acid and incubated for 3h at 37°C. Then, 1 mL 65% sulfuric acid was added to the medium and the orange red compound was measured at 520 nm. The content of ascorbic acid was calculated using a standard curve (1.5 – 4.5

μmol/L ascorbic acid freshly prepared in sulfuric acid) and expressed as μg/mL plasma.

#### 2.10. P-SH determination

P-SH were assayed in plasma and ghosts by the method of Boyne and Ellman (1972) modified by Jacques-Silva et al. (2001), which consisted on the reduction of DTNB in 0.3 M phosphate buffer (pH 7.0) measured at 37°C, 412 nm. Quantification of total P-SH groups may indicate thiol status and may also indicate the general state of thiol-containing proteins and, indirectly, the redox state of the blood cells. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the protein thiol groups. The results were expressed as nmol P-SH/mL (plasma) and nmol P-SH/mg protein (ghosts).

#### 2.11. NP-SH determination

RBC non protein thiol groups were determined as described by Boyne and Ellman (1972) modified by Jacques-Silva et al. (2001). Erythrocytes (300 μL) obtained after centrifugation of whole blood were hemolyzed with 10% triton solution (100 μL) for 10 min. Then, the protein fraction was precipitated with 200 μL of 20% trichloroacetic acid followed by centrifugation. The samples were incubated with ASc at 100 μg/mL and 200 μg/mL concentrations for 60 min. Quantification of NP-SH groups may indicate 90% of GSH content in the blood (LeBoeuf and Hoekstra, 1983), which is one of the most important reducing agents in different mammal cells (Jonas et al., 2000). The colorimetric assay was carried out in 1M phosphate buffer (pH 7.4). A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate non protein thiol groups. The NP-SH level was measured at 412 nm and expressed as nmol NP-SH/mL erythrocytes.

#### 2.12. Protein determination

Protein content was determined according to Peterson (1977), using bovine serum albumin as standard.

### 2.13. Statistical analysis

Statistical differences among groups were analyzed by Student's *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test, when appropriate. The results were expressed in mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM). The correlations were assessed by Pearson rank correlation coefficient. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Clinical characteristics of experimental groups

Clinical characteristics of DM patients and control subjects used in this study are depicted in Table 1. The state of glycemic control was evaluated from fasting plasma glucose and blood GlyHb, that were higher in the group of diabetic patients than in the healthy group ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$ , respectively). Total cholesterol levels in the group of DM patients were higher than in the healthy group ( $P < 0.01$ ). The other parameters of diabetic patients did not differ significantly from the values in healthy subjects.

### 3.2. Effect of ASc on ADA and AChE activities of DM subjects and healthy controls

The results of the present study demonstrated that ADA and AChE activities were altered in DM subjects. The results obtained for ADA activity in ghosts are presents in Fig. 2. As can be observed, subjects with DM ( $0.7231 \pm 0.1586$ ) showed a significant increase on the ADA activity when compared to the control group ( $0.3256 \pm 0.036$ ) ( $P < 0.05$ ). When the control group was exposed to ASc, no significant difference was found in both concentrations tested. However, experimental data demonstrated that ADA activity in ghosts of diabetic subjects was significantly decreased to 33.04% in the presence of 200  $\mu\text{g/mL}$  of ASc ( $P < 0.05$ ), whereas 100  $\mu\text{g/mL}$  of ASc did not present effect in the diabetic group.

The results obtained for AChE activity in RBC were similar to those found for ADA activity. AChE activity was significantly increased in type 2 DM group ( $183.3 \pm 17.8$ ;  $P < 0.05$ ) compared to the control group ( $137.0 \pm 10.5$ ) (Fig. 3). When erythrocytes were incubated with ASc (200  $\mu\text{g/mL}$ ) we observed a significant inhibition in the enzyme activity to 62.95% in the control group ( $P < 0.05$ ) and 39.88% in the DM group ( $P < 0.001$ ). However, 100  $\mu\text{g/mL}$  of ASc did not present effect on the AChE activity in the control and DM groups.

### *3.3. Effect of ASc on TBARS levels in ghosts of Type 2 DM subjects and healthy controls*

We observed that TBARS levels were significantly increased in the DM group when compared to the control group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4). When ghosts were incubated with ASc, we verified a significant reduction in TBARS levels to 34.78% in the type 2 DM group ( $P < 0.01$ ), compared with the healthy subjects. However, in the control group ASc did not present any effect.

### *3.4. Measure of parameters of oxidative stress in groups studied*

As shown in Table 2, no significant difference was found between levels of P-SH plasma, P-SH ghosts, VIT C and CAT activity in the subjects studied. However, DM patients showed a significant decrease in SOD activity ( $P < 0.05$ ) when compared to the control group. In DM patients, NP-SH RBC levels ( $P < 0.05$ ) also presented a significantly decrease when compared to the control group. Moreover, experimental data demonstrated that in presence of ASc (100 and 200  $\mu\text{g/mL}$ ) there was an increasing of the NP-SH levels of diabetic subjects in 115.2% and 125.4%, respectively ( $P < 0.01$ ) (Fig. 5).

Furthermore, in the present study, we observed some correlations between the parameters analyzed in the diabetic patients (Table 3). The experimental data presented a significant positive correlation between VIT C and P-SH plasma levels ( $r = 0.3945$ ,  $P < 0.05$ ). Also, the results showed a positive correlation between glucose and P-SH plasma ( $r = 0.3886$ ,  $p < 0.05$ ) and NP-SH RBC levels ( $r = 0.4076$ ,  $P < 0.05$ ).

Moreover, P-SH plasma levels correlated positively with ADA activity ( $r=0.6775$ ,  $P<0.001$ ) and NP-SH RBC levels correlated negatively with TBARS levels ( $r=-0.5215$ ,  $P<0.05$ ).

#### 4. Discussion

Hyperglycaemia resulting from uncontrolled glucose regulation has been widely recognized as a causal link between diabetes and diabetic complications (Rolo and Palmeira, 2006). It has been reported that various proteins, including haemoglobin undergo non-enzymatic glycosylation in diabetes (Kumar et al., 2005). Our findings corroborate with the fact that the GlyHb concentration reflects the extent as well as the management of diabetic condition (Wolffenbuttel et al., 1996), as showed in Table 1.

In the present study, ADA activity was increased in ghosts of diabetic patients (Fig. 2), would lead to reduction of adenosine levels. Adenosine, a degradation product of adenine nucleotides, has been proved to play an important role in the modulation of insulin action on glucose metabolism in different tissues (Rutkiewicz and Gorski, 1990). Insulin has several actions in vascular cells and some mechanisms have been proposed to account for insulin-induced vasodilatation, including the release of adenosine (Mckay and Hester, 1996; Abbink-Zandbergen et al., 1999). In fact, extracellular adenosine serves as anti-vasoocclusive/cardioprotective function (Jackson et al., 1996). These effects would affect the development of vascular complications observed in the diabetic state.

Furthermore, we observed an increase in AChE activity in diabetic patients (Fig. 3). The increased RBC concentrations of AChE indirectly may reflect the reduced concentration of acetylcholine that, in turn, enhance local and systemic inflammatory events. These results imply that AChE could serve as a marker of low-grade systemic inflammation and could be useful to predict prognosis and response to treatment in type 2 DM (Rao et al., 2007). Also, we may suggest that these effects may cause development of vascular complications, since acetylcholine produces vasodilatation in normal coronary arteries, with consequent increase of blood flow (Cox et al., 1989).

Concerning the results above, we also observed that ASc improved both enzymatic activities, ADA in ghosts (Fig. 2) and AChE (Fig. 3) in RBC of diabetic patients. The reduction of ADA and AChE activities caused by ASc would be related with anti-inflammatory properties of ASc (Koch et al., 1992; Melzig, 1996).

Interestingly, ASc also reduced lipid peroxidation in ghosts of diabetic patients whose TBARS were elevated (Fig. 4). Peroxidation of membrane lipids can result in the inactivation of enzymes and cross-linking of membrane lipids and proteins and in cell death (Snyder et al., 1985; Hebbel et al., 1990). We assume that the ASc constituents, including gallic acid, chlorogenic acid and rutin may be responsible for these effects and may provide some protection against the development of long-term diabetic complications by the reduction of lipid peroxidation.

Moreover, no significant differences were found in CAT activity, VIT C and P-SH plasma and ghosts levels (Table 2). Corroborating with our results, Peuchant et al. (1997) and Olczyk et al. (1994) observed no differences between diabetic and control groups for erythrocyte antioxidant enzymatic activities. However, the activity of SOD decreased in erythrocytes of diabetic patients, which could be due to the increased utilization for scavenging free radicals and this finding supports the hypothesis of free radical mediated injury in diabetes (Ramakrishna and Jailkhani, 2008). We observed a positive correlation between P-SH plasma and VIT C (Table 3). GSH and Vitamin C are connected through a redox coupling. They can substitute and save each other in different species (Mårtensson et al., 1993). It has been shown that besides this redox connection, GSH deficiency induces glycogen breakdown and de novo ascorbate synthesis independently of the origin of GSH depletion (Braun et al., 1996).

Another significant finding in the study was that the NP-SH RBC levels were significantly reduced in diabetic patients (Table 2). ASc increased the NP-SH levels of diabetic patients contributing in the protection of normal cell structure and function, since -SH groups are involved in maintaining the redox homeostasis, quenching of free radicals and participating in detoxification reactions (Fig. 5). We also observed a moderate positive correlation between glucose levels and P-SH plasma and NP-SH RBC levels (Table 3). Adverse biochemical changes associated with hyperglycemia include increased flux of glucose through the polyol pathway, leading to the depletion of NADPH which reduces the glutathione- redox cycle (Lapenna et al., 2004). Indeed,

GSH depletion increases the sensitivity of cells to various aggressions and has also several metabolic effects, such as a decrease in the rate of gluconeogenesis or an increase in glycogenolysis (Yu, 1994).

On the other hand, a negative correlation between TBARS in ghosts and NP-SH RBC in diabetic patients was observed (Table 3). This finding indicates that an increase in the level of TBARS in circulation may be associated with a decrease in SH erythrocyte levels, probably due to the effect of increased peroxidation and oxygen damage to the cell membranes which appears as a result of increased ROS generation in diabetic patients. A positive correlation between ADA activity and P-SH plasma levels (Table 3) was also observed. In this condition, is possible that Ado released into the extracellular space as product of the enzymatic action of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP), interacts with endothelial receptors, inhibiting the metabolism oxidative and free radicals production, which are important mediators of cellular damage (Howell et al., 2000).

In conclusion, the results of this study demonstrated that ASc was able to ameliorate the alterations in ADA, AChE activities as well as antioxidant status in patients with type 2 DM. Thus, we can suggest that ASc exerted a beneficial action against changes occurring in the patients studied, once the parameters evaluated play an important role in DM.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Centro de Diagnóstico e Apoio Secundário (CEDAS). Karine is scholar of CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## References

- Abbink-Zandbergen, E.J., Vervoort, G., Tack, C.J., Lutterman, J.A., Schaper, N.C., Smits, P., 1999. The role of adenosine in insulin-induced vasodilation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 374–380.
- Aebi H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105,121–127.
- Bax, B.E., Bain, M.D., Fairbanks, L.D., Webster, A.D.B., Chalmers, R.A., 2000. In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase. *Br. J. Haematol.* 109, 549-554.
- Bielat, K., Tritsch, G.L., 1989. Ecto-enzyme activity of human erythrocyte adenosine deaminase. *Mol. Cell. Biochem.* 86,135-142.
- Bopp, A., De Bona, K.S., Bellé, L.P., Moresco, R.N., Moretto, M.B., 2009. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 23, 501-507.
- Boyne, A.F., Ellman, G.L.,1972. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal. Biochem.* 46, 639-653.
- Braun, L., Csala, M., Poussu, A., Garzo, T., Mandl, J., Banhegyi, G., 1996. Glutathione depletion induces glycogenolysis dependent ascorbate synthesis in isolated murine hepatocytes. *FEBS Lett.* 388, 173–176.
- Cox, D.A., Vita, J.A., Treasure, C.B., 1989. Atherosclerosis impairs flow mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 80, 458-465.
- De Bona, K.S., Bellé, L.P., Sari, M.H., Thomé, G., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Boligon, A., Athayde, M.L., Pigatto, A.S., Moretto, M.B., 2010. *Syzygium cumini* Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients. *Cell. Physiol. Biochem.* 26, 729-738.
- Eidi, A., Eidi, M., Esmaeili, E., 2006. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 13,624–629.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr. V., Feather, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Galley, H., Davies, M.J., Webster, N.R., 1996. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 139-143.

Geiger, J.D., Padua, A.R., Nagy, J.I., 1991. Adenosine deaminase regulation of purine actions. *In Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function* 71-84.

Giusti, G., Gakis, C., 1971. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme* 12, 417–425.

Grover, J.K., Yadav, S., Vats, V., 2002. Medicinal plants of India with anti diabetic potential. *J. Ethnopharmacol.* 81,81–100.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concept. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501–514.

Hebbel, R.P., Leung, A., Mohandas, N., 1990. Oxidation-induced changes in microrheology properties of the red blood cell membrane. *Blood* 76,1015–1020.

Hsueh, W.A., Lyon, C.J., Quinones, M.J., 2004. Insulin resistance and the endothelium. *Am. J. Med.* 117,109–117.

Jackson, E.K., Mi, Z., Koehler, M.T., Carcillo, J.A., Herzer, W.A., 1996. Injured Erythrocytes Release Adenosine Deaminase Into the Circulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 1250-1260.

Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenides and ascorbic acid changes deposition of selenium and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119-125.

Jonas, C.R., Puckett, A.B., Jones, D.P., Griffith, D.P., Szeszycki, E.E., Bergman, G.F., Furr, C.E., Tyre, C., Carlson, J.I., Galloway, J.R., Blumberg, J.B., Ziegler, T.R.,

2000. Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 181-189.

Kedar, P., Chakrabarti, C.H., 1983. Effects of jambolan seed treatment on blood sugar, lipids and urea in streptozotocin induced diabetes in rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 27, 135-140.

Koch, H.P., Jager, W., Groh, U., Plank, G., 1992. In vitro inhibition of adenosine deaminase by flavonoids and related compounds. New insight into the mechanism of action of plant phenolics. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 14, 413-417.

Kuhad, A., Sethi, R., Chopra, K., 2008. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sci.* 83, 128–134.

Kumar, P.A., Haseeb, A., Suryanarayana, P., Ehtesham, N.Z., Reddy, G.B., 2005. Elevated expression of alpha A- and alpha B-crystallins in streptozotocin induced diabetic rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 77–83.

Lapenna, D., Pierdomenico, S.D., Ciofani, G., Giamberardino, M.A., Cuccurullo, F., 2004. Aortic glutathione metabolic status: time-dependent alteration in fat-fed rabbits. *Atherosclerosis* 173, 19–25.

LeBoeuf, R.A., Hoekstra, W.G., 1983. Adaptive changes in hepatic glutathione metabolism in response to excess selenium in rats. *J. Nutr.* 113, 845-854.

Marchesi, V.T., Palade, G.E., 1967. The localization of Mg-Na-K-activated Adenosine Triphosphatase on red cell ghost membranes. *J. Cell. Biol.* 35, 385-404.

Mårtensson, J., Han, J., Griffith, O.W., Meister, A., 1993. Glutathione ester delays the onset of scurvy in ascorbate-deficient guinea pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 317-321.

Mazzanti, C.M., Spanevello, R.M., Pereira, L.B., Gonçalves, J.F., Kaizer, R., Corrêa, M., Ahmed, M., Mazzanti, A., Festugatto, R., Graça, D.L., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2006. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. *Neurochem. Res.* 31, 1027–1032.

McCord, J., Fridowich, I., 1969. Superoxide Dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

McKay, M.K., Hester, R.L., 1996. Role of nitric oxide, adenosine, and ATP-sensitive potassium channels in insulin-induced vasodilation. *Hypertension* 28, 202–208.

Melzig, M.F., 1996. Inhibition of adenosine-deaminase activity of aortic endothelial-cells by selected flavonoids. *Planta Med.* 62, 20-21.

Moore, R.B., Brummitt, M.L., Mankad, V.N., 1989. Hydroperoxides selectively inhibit human erythrocyte membrane enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 527-534.

Neumann, S., Razen, M., Habermehl, P., Meyer, C.U., Zepp, F., Kirkpatrick, C.J., Wessler, I., 2007. The nonneuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. *Life Sci.* 80, 2361–2364.

Olczyk, K., Kościelniak-Kocurek, E., Sonecki, P., Zdenkowski, W., 1994. The lipid peroxidation products and the enzymes of antioxidant system in patients with diabetes mellitus. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 39, 93-99.

Pawelczyk, T., Sakowicz, M., Szczepanska-Konkel, M., Angielski, S., 2000. Decreased expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 1-6.

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.

Peuchant, E., Delmas-Beauvieux, M.C., Couchouron, A., Dubourg, L., Thomas, M.J., Perromat, A., Clerc, M., Gin, H., 1997. Short-term insulin therapy and normoglycemia. Effects on erythrocyte lipid peroxidation in NIDDM patients. *Diabetes Care* 20, 202-207.

Prince, M.S., Kamalakkannan, N., Menon, V.P., 2003. *Syzygium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. *J. Ethnopharmacol.* 84, 205–209.

Ramakrishna, V., Jaikhan, R., 2008. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol.* 45, 41-46.

Rao, A.A., Sridhar, G.R., Das, U.N., 2007. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses* 69, 1272–1276.

Ratsimamanga, A.R., Loiseau, A., Ratsimamanga-Urverg, S., Bibal-Prot, P., 1973. Nouvelle contribution à l'étude de l'action d'un principe hypoglycémiant mis en évidence dans d'écorce jeune de *Eugenia jambolana* (Myrtacées) sur l'hyperglycémie provoquée du lapin normal et poursuite de sa purification. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Serie D, Sciences Naturelles* 277, 2219-2222.

Rohn, T.T., Nelson, L.K., Waeg, G., Quinn, M.T., 1998. U-101033E (2,4-diaminopyrrolopyrimidine), a potent inhibitor of membrane lipid peroxidation as assessed by the production of 4-hydroxynonenal malondialdehyde, and 4-hydroxynonenal-protein adducts. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1371–1379.

Rolo, A.P., Palmeira, C.M., 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 167-178.

Rutkiewicz, J., Górski, J., 1990. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. *FEBS Lett.* 271, 79-80.

Sabu, M.C., Kuttan, R., 2002. Anti diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J. Ethnopharmacol.* 81, 155–160.

Sands, W.A., Palmer, T.M., 2005. Adenosine receptors and the control of endothelial cell function in inflammatory disease. *Immunol. Lett. Rev.* 101, 1-11.

Silman, I., Sussman, J.L., 2005. Acetylcholinesterase: classical and non classical functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 293–302.

Snyder, L.M., Fortier, N.L., Trainor, J., Jacobs, J., Leb, L., Lubin, B., Chiu, D., Shohet, S., Mohandas, N., 1985. Effect of hydrogen peroxide exposure normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J. Clin. Invest.* 76, 1971–1977.

Teixeira, C.C., Rava, C.A., Mallman da Silva, P.M., Melchior, R., Argenta, R., Anselmi, F., Almeida, C.R., Fuchs, F.D., 2000. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. *J. Ethnopharmacol.* 71, 343–347.

Uluoglu, C., Cimen, B., Ozbey, G., Karasu, C., Durakoglugil, D.B., Gunes, A., Turkozkan, N., Zengil, H., 2008. The effect of experimental diabetes on the circadian pattern of adenosine deaminase and myeloperoxidase activities in rat liver. *Gen. Physiol. Biophys.* 27, 25-31.

Villasenõr, I.M., Lamadrid, M.R., 2006. Comparative anti-hyperglycemic potentials of medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 104, 129–131.

Willis, E.H., Carson, D.A., Shultz, L.D., 1987. Adenosine deaminase activity in recipients of bone marrow from immunodeficient mice homozygous for the wasted mutation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 145, 581-585.

Wolffenbuttel, B.H., Giordano, D., Founds, H.W., Bucala, R., 1996. Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-AGE measurement. *Lancet* 347, 513-515.

Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta* 288, 73-90.

Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 136–162.

**Tables:****Table 1.** Clinical characteristics of the experimental groups.

	Control	Type 2 DM
♂/♀	9/11	13/17
Age (years)	54.45 ±3.2	57.83±2.16
Diabetes duration (years)	-	10.5±2.1
Weight (Kg)	73.27±3.02	75±1.95
GlyHb (g%)	5.84 ± 0.2	**7.65 ± 0.42
Glucose (mg/dL)	91.8 ± 1.66	***152.1 ± 8.12
Urea (mg/dL)	32.9 ± 1.9	36,5 ± 1.85
Creatinine(mg/dL)	0,84 ± 0.04	0,86 ± 0.04
Triglycerides (mg/dL)	124,2 ± 12.61	173.0 ± 19.5
Total Cholesterol(mg/dL)	170,6 ± 6.9	**204,2 ± 8.7
HDL-C (mg/dL)	52.43 ± 3.67	50.44 ± 3.5
Hemoglobin (g/dL)	13.81 ± 0.34	13.02 ± 0.2
Hematocrit (%)	42.1 ± 0.92	40.9 ± 0.72
Erythrocytes (n° x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.5 ± 0.13	4.5 ± 0.1
Drugs		
Metformin	-	n=19
Glibenclamide	-	n=11

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. GlyHb = glycosylated hemoglobin; HDL-C=high density lipoprotein cholesterol. Statistically significant differences from controls, as determined by Student's *t*-test (\*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ).

**Table 2.** Levels of antioxidants in control group and patients with type 2 DM.

	Control	Type 2 DM
NP-SH RBC (nmol NP-SH/mL)	2373 ( $\pm$ 144.5)	*2028 ( $\pm$ 88.88)
P-SH plasma (nmol P-SH/mL)	112.2 ( $\pm$ 8.88)	127.4 ( $\pm$ 10.4)
P-SH ghosts (nmol P-SH/mg protein)	20.7 ( $\pm$ 3.2)	23.32 ( $\pm$ 2.4)
VIT C ( $\mu$ g/mL plasma)	13.48 ( $\pm$ 2.22)	13.57 ( $\pm$ 1.3)
CAT ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mL)	136.4 ( $\pm$ 3.1)	136.3 ( $\pm$ 3.65)
SOD (USOD/mL)	129.3 ( $\pm$ 14.19)	*96.54 ( $\pm$ 6.02)

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. P-SH: Protein thiol groups, NP-SH: Non protein thiol groups; VIT C: Ascorbic acid; CAT: Catalase; SOD: Superoxide dismutase. Statistically significant differences from controls, as determined by Student's *t*-test (\* $P<0.05$ ).

**Table 3.** Correlations between biochemical estimations in the Type 2 DM group.

	VIT C	ADA	Glucose	TBARS
P-SH	*0.3945	***0.6775	*0.3886	-
NP-SH	-	-	*0.4076	*- 0.5215

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; VIT C: Ascorbic acid; P-SH: Protein thiol groups; NP-SH: Non protein thiol groups; ADA: Adenosine deaminase; Statistically significant differences (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

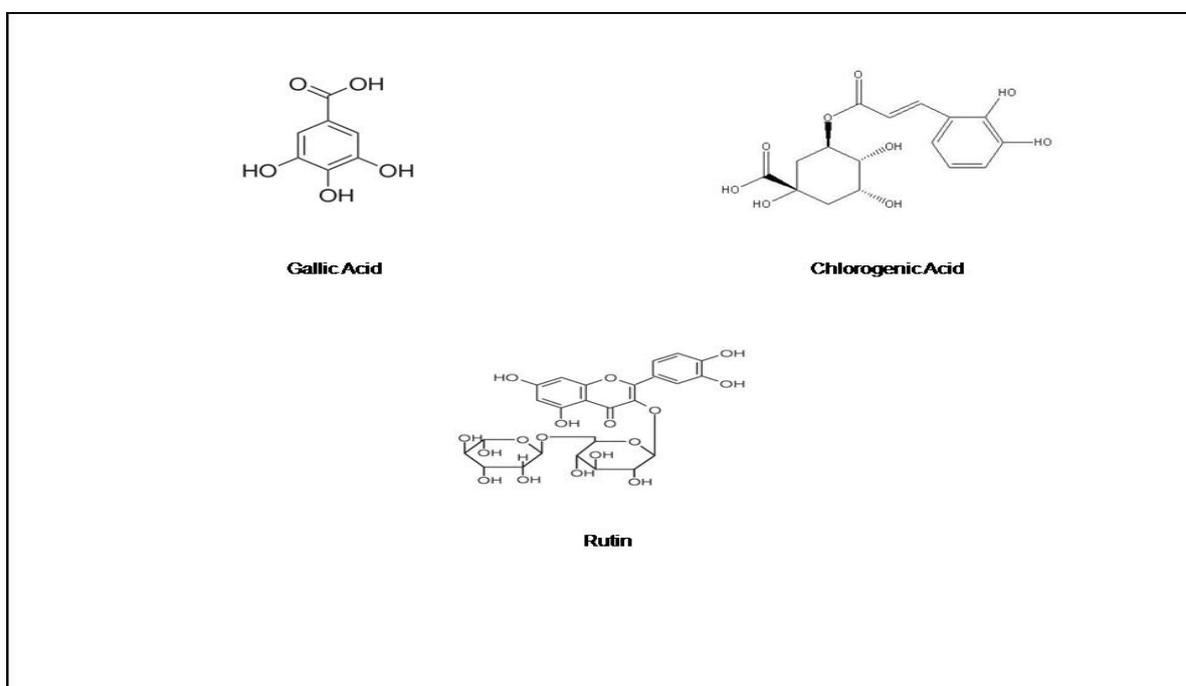
**Figures:****Fig.1.**

Fig.2.

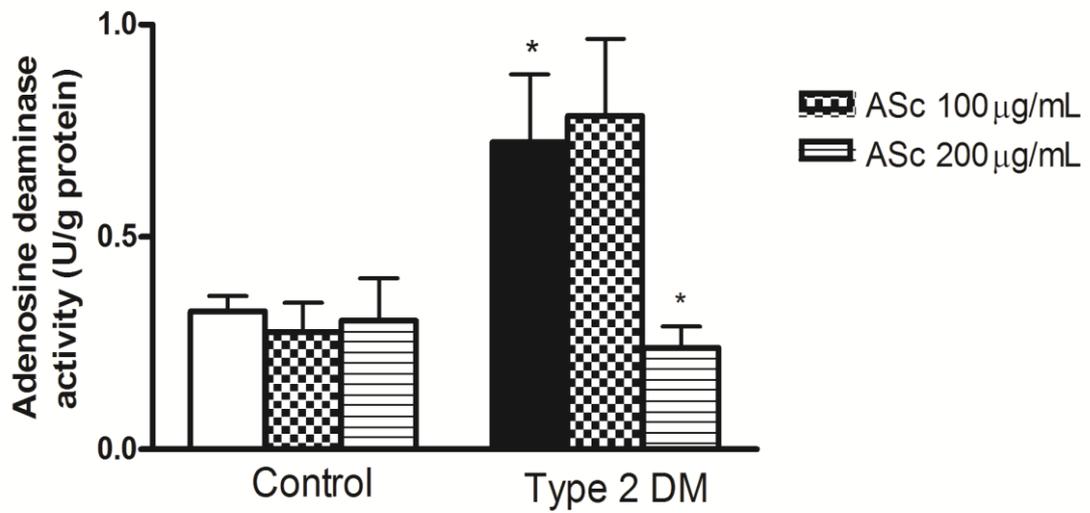


Fig.3.

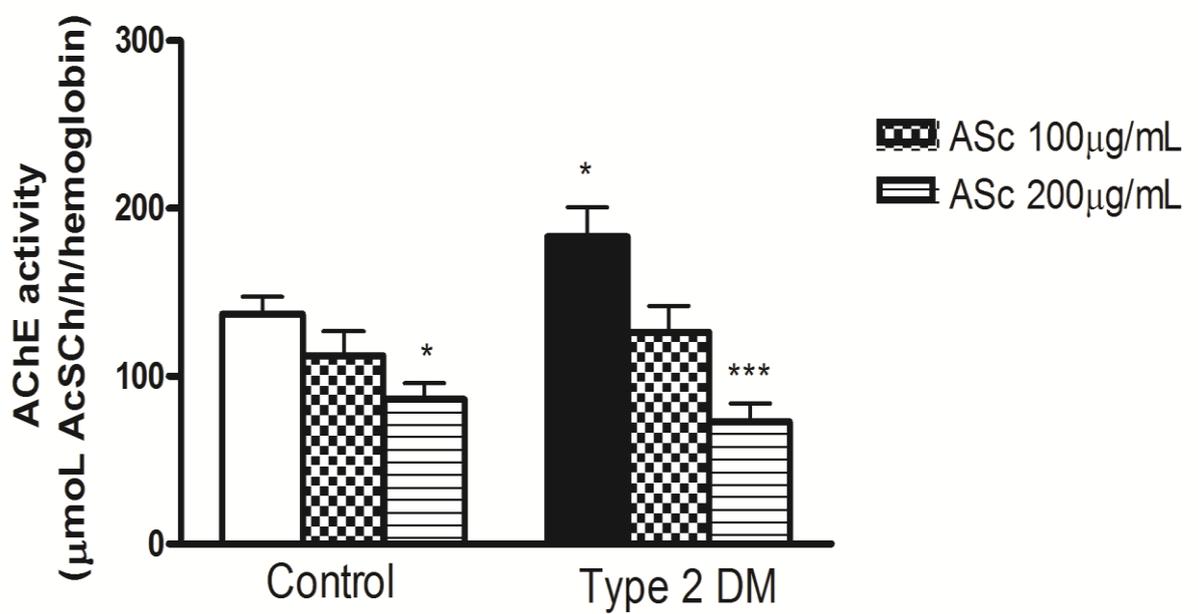


Fig.4.

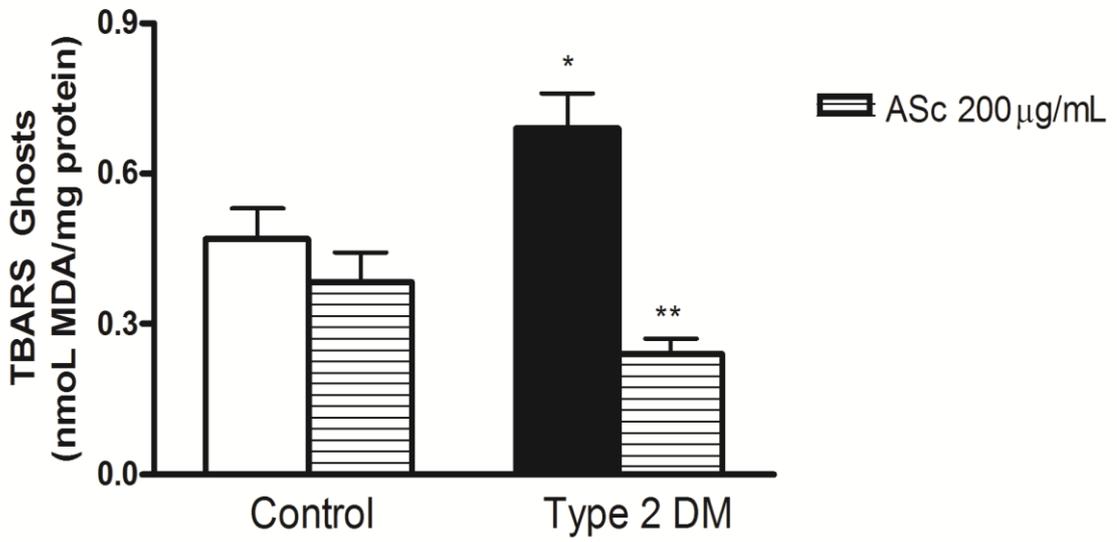
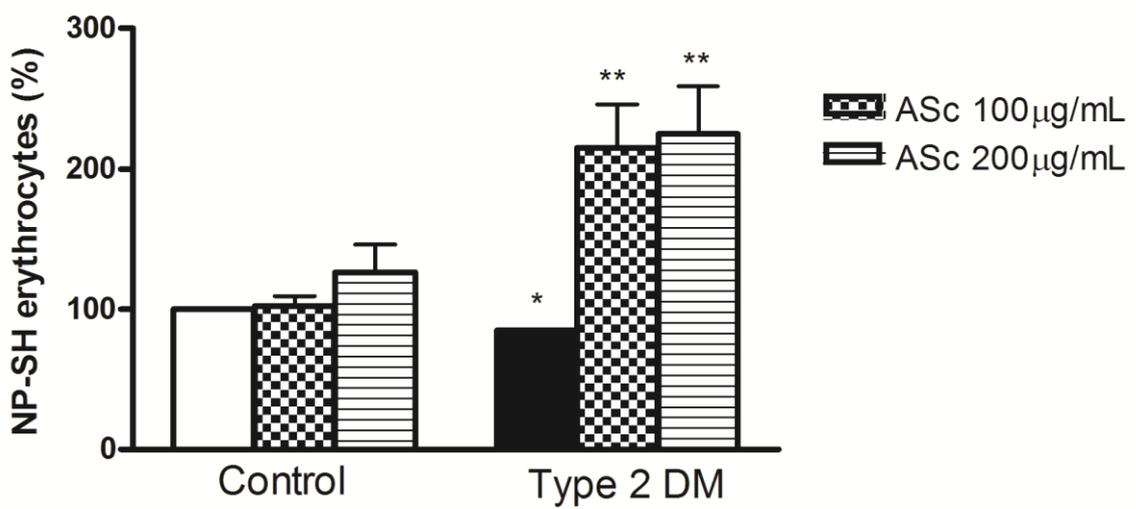


Fig.5.



## Legends

**Fig. 1.** Molecular structures of compounds found in the *Syzygium cumini* aqueous leaf extract.

**Fig. 2.** Effect of ASc on ADA activity in ghosts obtained from diabetics and control patients *in vitro*. All samples were run in triplicate. Data are reported as mean  $\pm$  SEM and expressed as U/g protein. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group, as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* $P$ <0.05 compared with control group, \* $P$ <0.05 compared with type 2 DM group and with type 2 DM group with ASc 100  $\mu$ g/mL).

**Fig. 3.** *In vitro* exposure of erythrocytes obtained from diabetics and control patients to ASc on AChE activity. All samples were run in triplicate. Data are reported as mean  $\pm$  SEM and expressed as  $\mu$ mol AcSCh/h/hemoglobin. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group, as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* $P$ <0.05 compared with control group, \*\*\* $P$ <0.001 compared with type 2 DM group).

**Fig. 4.** Effect of *in vitro* exposure of ghosts obtained from type 2 DM and control patients to ASc on TBARS levels. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* $P$ <0.05 compared with control group; \*\* $P$ <0.01 compared with type 2 DM group).

**Fig. 5.** Effect of exposure of erythrocytes to ASc on NP-SH levels from type 2 DM and control patients, *in vitro*. Data are reported as mean $\pm$ SEM and expressed as % NP-SH erythrocytes. Statistically significant differences from controls and type 2 DM group as determined by ANOVA followed by Tukey multiple comparison test (\* $P$ <0.05 compared with control group; \*\* $P$ <0.01 compared with type 2 DM group).

---

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a atividade de enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, como a 5'NT e ADA, além da atividade da enzima AChE e parâmetros de estresse oxidativo em amostras de pacientes diagnosticados como diabéticos tipo 2.

A adenosina é um importante nucleosídeo componente do sistema purinérgico, que desempenha um papel fundamental no metabolismo celular e atua como um regulador fisiológico do sistema cardiovascular (ROSALES *et al.*, 2004; PEART & GROSS, 2005). Neste estudo, foi observado um aumento na atividade das enzimas 5'NT e ADA em pacientes diabéticos, influenciando assim nos níveis de adenosina, uma vez que sua produção pode ocorrer através da enzima 5'NT, sendo posteriormente metabolizada em inosina pela enzima ADA (LATINI & PEDATA, 2001). Conseqüentemente, estes efeitos podem influenciar no desenvolvimento de complicações vasculares observadas no estado diabético, uma vez que a adenosina exerce importante papel na prevenção do processo trombótico.

Além disso, observamos um aumento na atividade da enzima AChE em eritrócitos de pacientes com DM tipo 2, podendo levar à redução nos níveis de ACh. Corroborando com nossos resultados, KUHAD & CHOPRA (2007) também observaram um aumento na atividade desta enzima em soro de ratos diabéticos. Dessa forma, é possível que as funções exercidas pela ACh estejam prejudicadas, provocando, assim, redução nas ações anti-inflamatórias exercidas pela mesma e contribuindo para progressivas disfunções vasculares observadas em pacientes diabéticos. Pode-se também sugerir que o aumento da atividade da AChE, observada neste estudo, esteja associada ao processo de estresse oxidativo que ocorre durante o DM, uma vez que o aumento da peroxidação lipídica é capaz de alterar o estado conformacional da molécula de AChE e, conseqüentemente, sua atividade (DAS *et al.*, 2001; ALDUNATE *et al.*, 2004).

Neste estudo observamos que o ASc foi capaz de reduzir o efeito das atividades das enzimas 5'NT, ADA e AChE em plaquetas e eritrócitos de pacientes diabéticos. Dessa maneira, é possível sugerir que o ASc seja capaz de manter os níveis de adenosina e ACh, auxiliando na manutenção da integridade vascular importante no estado hiperglicêmico, além de auxiliar em processos inflamatórios. Os compostos fenólicos presentes no Sc podem ser os principais responsáveis por

suas funções fisiológicas, uma vez que apresentam propriedades antioxidantes e antihiperlipidêmicas (LOPEZ -VELEZ *et al.*, 2003; USHIDA *et al.*, 2008).

Em relação ao perfil oxidativo, observamos um aumento nos níveis de TBARS, bem como deficiência em alguns sistemas de defesa antioxidante em pacientes diabéticos. Durante a hiperglicemia persistente do DM, ocorre um aumento da produção de EROs e da peroxidação lipídica, causando injúria celular e danos às membranas celulares, além de complicações vasculares em pacientes diabéticos (ESTERBAUER *et al.*, 1991; HALLIWELL, 1997; TIWARI, 2004). Além disso, pacientes diabéticos também apresentam um declínio nos mecanismos de defesa antioxidante, levando ao dano de organelas celulares e enzimas e resistência à insulina (PAWLAK *et al.*, 1998, ZHAO, 2001). O ASc foi capaz de reduzir os níveis de TBARS em plaquetas e membrana de eritrócitos, além de provocar um aumento nos níveis de grupamentos SH não proteicos em eritrócitos, demonstrando que o extrato das folhas de Sc poderia apresentar propriedades antioxidantes, e, desta forma, estaria protegendo do estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia diabética.

Em resumo, a partir deste trabalho pode-se demonstrar que o DM está associado a uma série de alterações nos sistemas purinérgico e colinérgico, além de provocar um desequilíbrio entre a produção de espécies altamente reativas e defesas antioxidantes, o que conduz frequentemente a lesão celular e tecidual. É importante salientar que os resultados mais significativos obtidos neste estudo se referem ao efeito do ASc sobre as enzimas 5'NT, ADA e AChE. Assim, pode-se sugerir que o Sc é um composto natural promissor com efeitos significativos no metabolismo celular. Portanto, é de grande utilidade, que, em um futuro próximo, possam ser desenvolvidos um maior número de investigações clínicas expressivas para melhor entendimento das propriedades e mecanismos de ação do Sc, com a intenção de ampliar a gama de compostos naturais que podem ser utilizados como modelos para novos agentes antidiabéticos.

---

## **6. CONCLUSÕES**

Podemos concluir que:

- A atividade das enzimas 5'NT e ADA encontram-se aumentadas em plaquetas e membranas de eritrócitos de pacientes com DM tipo 2, indicando que a sinalização purinérgica pode estar alterada no estado diabético;
- O aumento da atividade da enzima AChE em eritrócitos de pacientes diabéticos pode estar associado ao processo de estresse oxidativo, bem como com a sua participação nos mecanismos inflamatórios;
- A ADA 1 é a isoenzima predominante em plaquetas de pacientes com DM tipo 2;
- O aumento nos níveis de TBARS, bem como deficiência em alguns sistemas de defesa antioxidante durante a hiperglicemia persistente do DM ocorre devido a um aumento da produção de EROs e da peroxidação lipídica;
- O ASc provocou redução na atividade das enzimas 5'NT e ADA, podendo auxiliar na manutenção dos níveis de adenosina e assim, contribuindo para a manutenção da integridade vascular importante no estado hiperglicêmico, tendo em vista o papel cardioprotetor exercido pela mesma.
- Da mesma forma, o ASc provocou diminuição na atividade da enzima AChE nos eritrócitos, podendo levar a um aumento nos níveis de ACh e, assim, contribuindo para eventos anti-inflamatórios locais e sistêmicos, para o aumento do fluxo sanguíneo e redução de complicações vasculares.

- O Sc é um importante composto natural que pode atuar como potente antioxidante, uma vez que foi capaz de provocar redução de alguns parâmetros de medida de estresse oxidativo avaliados, além de contribuir para melhoria nas defesas antioxidantes;
- Os compostos fenólicos presentes no Sc podem ser os principais responsáveis por suas propriedades químicas.

---

## **7. PERSPECTIVAS**

Particularmente, há o interesse em dar continuidade ao estudo aqui apresentado, buscando responder questões ainda não avaliadas neste trabalho.

Através da abordagem da questão da Síndrome Metabólica, temos o interesse de avaliar os seguintes pontos:

Em plaquetas, eritrócitos, linfócitos e soro de pacientes portadores de Síndrome Metabólica:

- Determinar a atividade das enzimas Adenosina deaminase, Dipeptidil Peptidase IV e Hexoquinase;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo, como os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de antioxidantes, como a Catalase, Superóxido Dismutase e Vitamina C;
- Avaliar Proteína C reativa, NAG e ceruloplasmina como biomarcadores inflamatórios;
- Avaliar parâmetros bioquímicos rotineiros (glicose, perfil lipídico, uréia, creatinina e insulina);
- Avaliar os níveis de Óxido Nítrico como marcador de disfunção endotelial;
- Comparar o efeito do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e da rutina, constituinte químico do *Syzygium cumini*, sobre os parâmetros citados acima, sob condições in vitro;

---

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radic Biol Med**, v.39, p. 297-316, 2005.

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

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

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thromb Res**, v. 114, p. 447- 453, 2004.

ANGIOLLOLI, D. J. *et al.* Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. **J Am Coll Cardio**, v 16, p.1541- 1547, 2007.

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

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

BAE, E. A. *et al.* 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.

BANHEGYI, G. *et al.* Ascorbate metabolism and its regulation in animals. **Free Radic Biol Med**, v. 23, p. 793-803,1997.

BARCELÓ, A.; AEDO, C. RAJPATHAK, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull World Health Organ**, v.81, p. 19-27, 2003.

BARMAN, T. E. *Enzyme Handbook*. v.2. New York:Springer Verlag, 1996.

BASU, T. K.; DONALDSON, D. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, p. 957-979, 2003.

BATNA, A.; FUCHS, C. Spitteller lipid peroxidation in presence of ebslen. **Chem Phys Lipids**, v. 87, p. 149-158, 1997.

BAUTERS, C. *et al.* Influence of diabetes mellitus on heart failure risk and outcome. **Cardiovasc Diabetol**, v.2, p. 1-16, 2003.

BENNETT, P. H. Diabetes in developing countries and unusual populations. In: MANN, J. I.; PYÖRÄLÄ, K.; TEUSCHER, A., (Eds.). **Diabetes in Epidemiological Perspective**, p. 43-57, 1983.

BERNE, R. M.; GENUTH, S. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 190, 2000.

BLACKBURN, M. R.; DATTA, S. K.; KELLEMS, R. E. Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. **J Biol Chem**, v. 273, p. 5093–5100, 1998.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. *et al.* Consequences of the Diabetic Status on the Oxidant/Antioxidant Balance. **Diabetes Metab**, v. 26, n. 163-176, 2000.

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). **Clin Chim Acta**, v. 306, p. 79–89, 2001.

BOUMA, M. G.; VAN DEN WILDENBERG, F. A.; BUURMAN, W. A. The anti-inflammatory potential of adenosine in ischemiareperfusion injury: established and putative beneficial actions of a retaliatory metabolite. **Shock**, v. 8, p. 313–320, 1997.

BRAGA, F. G. *et al.* Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRAGANÇA, L. A. R. Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de planta e fitoterápicos hipoglicemiantes. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**, p. 105-22, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Assistência à Saúde. Coordenação de Doenças Crônicas - Degenerativas. Brasília - DF: Manual de Diabetes. p. 92, 1993.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol**, v. 240, p. 31–304, 2004.

CAMARGO, J. L. *et al.* Efeito do sexo e da gestação sobre os níveis séricos de frutossamina de indivíduos normais. **Revista AMRIGS**, v. 38, p. 13-17, 1994.

CARR, M. E. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. **J Diabetes Complications**, v.15, p.44– 54, 2001.

CHACON, M. A.; REYES, A. E.; INESTROSA, N. C. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. **J Neurochem**, v. 15, p. 87-91, 2003.

CHAPPEY, O. *et al.* Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. **Eur J Clin Invest**, v.27, p. 97–108, 1997.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chem Toxicol**, v. 37, p. 949- 962, 1999.

CHERUBINI, A. *et al.* Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, p. 841-852, 2005.

CNOP, M. *et al.* Mechanisms of: Pancreatic  $\beta$ -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, p.97-107, 2005.

COADE, S. B.; PEARSON, J. D. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. **Circ Res**, v. 65, p. 531-537, 1989.

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

COLGAN, S. P. *et al.* Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal**, v. 2, p.351- 360, 2006.

COLEMAN, M. D.; RUSTIOM, C. V. Resistance to glutathione depletion in diabetic and non-diabetic human erythrocytes *in vitro*. **J Pharm Pharmacol**, v.51, p. 21–25, 1999.

CORRAL, I. *et al.* Adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of HIV-infected patients: limited value for diagnosis of tuberculous meningitis. **Eur J Clin Microbiol**, v. 23, p. 471- 476, 2004.

COX, D. A.; VITA, J. A.; TREASURE, C. B. Atherosclerosis impairs flowmediated dilation of coronary arteries in humans. **Circulation**, v. 80, p. 458-465, 1989.

CRISTALLI, G. *et al.* Adenosine Deaminase: functional implications of inhibitors. **Med Res Rev**, v. 21, p. 105-128, 2001.

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

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

DADDONA, P. E.; KELLEY, W. N.; Human adenosine deaminase. Purification and subunit structure. **J Biol Chem**, v. 252, p. 110 –115, 1977.

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

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J Cell Mol Med**, v.10, p.389-406, 2006.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sci**, v. 68, p. 1545-1555, 2001.

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

DE ALMEIDA, L. J. P.; SALDANHA, C. Nonneuronal Cholinergic System in Human Erythrocytes: Biological Role and Clinical Relevance. **J Membrane Biol**, v. 234, p. 227-234, 2010.

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.

DEFRONZO, R. A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Ann Intern Med**, v.131, p. 281-303, 1999.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role os oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens**, v. 18, p. 655-673, 2000.

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

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2008 ( Disponível em [http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Diretrizes\\_SBD\\_2008\\_MAR\\_12.pdf](http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Diretrizes_SBD_2008_MAR_12.pdf))

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/>).

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47-95, 2002.

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

ELGAWISH, A. *et al.* Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose *in vitro* and *in vivo*. **J Biol Chem**, v. 271, p. 12964-12971, 1996.

ESTEVEZ, F.; DE ANGELO, T.; VESSEL, E. Basal and paracetamol-depleted glutathione from human lymphocytes. **Acta Physiol Pharmacol Latino Americana**, v. 44, p.48-54, 1994.

ESTERBAUER, H.; SHAUER, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, v. 11, p. 81–128, 1991.

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.

FERNANDEZ, A. A.; FINK, N. E. Red blood cell osmotic fragility confidence intervals: a definition by application of a mathematical model. **Clin Chem Lab Med**, v. 38, n. 5, p. 433-436, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Méd Brasil**, v. 43, p.61-68, 1997.

FRANCO, R. *et al.* Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progr Neurobiol**, v. 52, p. 283-294, 1997.

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

FRASSETTO, S. S. *et al.* Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 1369-1377, 2000.

GAKIS, C. *et al.* Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects. A hypothesis on the significance of ADA2. **Panminerva Med**, v.31, p. 107–113, 1989.

GALANTI, B. *et al.* Increased lymphocyte adenosine deaminase in typhoid fever. **Scand J Infect Dis**, v.13, p. 47–50, 1981.

GILON, P.; HENQUIN, J. C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic  $\beta$ -cell function. **Endocr Rev**, v. 22, p. 565–604, 2001.

GODOY, P. Pâncreas Endócrino. In: BOGLIOLO, L. **Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1004-1008, 2000.

GORRELL, M. D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. **Clin Sci**, v. 108, p.277-292. Review, 2005.

GORGUNER, M.; CERCI, M.; GORGUNER, I. Determination of adenosine deaminase activity and its isoenzymes for diagnosis of pleural effusions. **Respirology**. v. 5, p. 321-324, 2000.

GREGG, D.; GLODSCHIMIDT-CLERMONT, P. Platelets and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 108, p. 88-90, 2003.

GRIENGLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GRISARU, D. *et al.* Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **Eur J Biochem**, v. 264, p. 672-686, 1999.

GROSS, J. L. *et al.* Diagnóstico e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquiv Bras Endocrinol Metab**, v. 46, nº 1, 2002.

GUL, M. *et al.* Cellular and clinical implications of glutathione. **Indian J Exp Biol**, v. 38, p. 625-634, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Mol Aspects of Med**, v.8, p.89-193. Review, 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radic Biol Med**. Oxford: Clarendon Press, 543, 1989.

HALLIWELL, B., How to characterize a biological antioxidant. **Free Radic Res Communications**, v. 9, p. 1, 1990.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutr Rev**, v. 55, p.44–52, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxidative stress: adaption, damage, repair and death. In: **Free radic Biol Med**. 3 th ed. Oxford: Oxford University Press, p. 246-349, 1999.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, p. 1179-1180. Review, 2000.

HIRSHHORN, R.; RATECH, H. Isoenzymes of adenosine deaminase. In: Rattazzi MC Scandalios JG Whitt GS editors. Isoenzymes: Current Topics in **Biol Med Res**, v. 4, p.131- 157, 1980.

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

HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. **Biochem J**, v.256, p. 205-212, 1988.

HUNT, J. V.; SMITH, C. C. T.; WOLFF, S. P. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. **Diabetes**, v. 39, p. 1420-1424, 1990.

HUO, Y.; WINTERS, W. D.; YAO, D. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytother Res**, v. 17, p. 48-55, 2003.

IBIŞ, M. *et al.* Serum Adenosine Deaminase Levels in Pancreatic Diseases. **Pancreatology**, v. 7, p. 526–530, 2007.

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

INOBUCHI, T. *et al.* A Possible Target of Antioxidative therapy for diabetic vascular complications-vascular NAD(P)H oxidase. **Curr Med Chem**, v. 10, p. 1759-1764, 2003.

ITALIANO, J. E.; HARTWIG, J. H. Megakaryocyte development and platelet formation. *In*: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

IWAKI-EGAWA, S. I.; NAMIKI, C.; WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 137, p. 247–254, 2004.

IWAKI-EGAWA, S.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biol Chem**, v. 387; p. 319-321, 2006.

JOZWIK, M. *et al.* Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. **Clin Chim Acta**, v. 267, p. 129–142, 1997.

KASHYAP, M. K. *et al.* Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Mol Cell Biochem**, v. 277, p. 89-99, 2005.

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

KHANDKAR, M. A. *et al.* Aloxan-diabetes alters kinetic properties of the membrane-bound form, but not of the soluble form, of acetylcholinesterase in rat brain. **Biochem J**, v. 307, p. 647–649, 1995.

KIDD, P. M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Altern Med Rev**, v. 2, p.155-176, 1997.

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

KISS, A. C. I.; *et al.* Efeito do extrato aquoso de *Allium sativum* L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabetes induzido por Streptozotocin. **Rev Bras Plant Med**, v. 8, p.24-30, 2006.

KOBAYASHI, F. *et al.* Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. **Am J Gastroenterol**, v. 88, p. 226-271, 1993.

KOCH, H. P. *et al.* In vitro inhibition of adenosine deaminase by flavonoids and related compounds. New insight into the mechanism of action of plant phenolics. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. v.14, p. 413-417, 1992.

KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; NIKI, E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. **FEBS Lett**, v. 413, p. 236-38, 1997.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J.D. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr Med Chem**, v. 8, p. 773-796. Review, 2001.

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

KUHAD, A.; SHARMA, S.; CHOPRA, K. Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 12, p. 624–632, 2008.

KUMAR, G.; BANU, S.; MURUGESAN, A. G. Influence of *Helicteres isora* administration for diabetes mellitus: the effect on changes in tissue fatty acid composition. **Food Chem Toxicol**, v. 47, p.1826-1830, 2009.

KURTUL, N. *et al.* H. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. **Acta Médica**, v. 47, p. 33–35, 2004.

LAMBA, S. S. *et al.* 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.

LEBECHE, D.; DAVIDOFF, A.J.; HAIJAR, R. J. Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 5, p. 715–724, 2008.

LEE, G. R. *et al.* **Wintrobe Hemotologia Clin, Vol I e II**, São Paulo: Manole, p. 2623, 1998.

LEVIN, J. The evolution of mammalian platelets. *In*: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.

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

LIENHARD, G. E. *et al.* How cells absorb glucose. **Sci Am**, v. 266, p. 86-91, 1992.

LIMA, L. A. *et al.* Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) skeels (Myrtaceae). **Quimica Nova**, v. 30, p. 860-864, 2007.

LOPEZ-VELEZ, M.; MARTINEZ-MARTINEZ, F.; DEL VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 43, p. 233–244, 2003.

LORENZI, H. *et al.* **Árvores Exóticas no Brasil**. 2003.

LUNKES, G. I. *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thromb Res**, v. 109, p. 189–194, 2003.

LUNKES, G. I. *et al.* NTPDase and 5'- nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 65, p. 1–6, 2004.

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.

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

MAHDI, A. A. *et al.* Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and Antioxidant status in diabetic rats. **Indian J Clin Biochem**, v. 18, p. 8-15, 2003.

MARDANYAN, S. *et al.* Tryptophan environment in adenosine deaminase: enzyme modification with Nbromosuccinimide in the presence of adenosine and EHNA analogs. **Biochim Biophys Acta**, v. 1546, p. 185–195, 2001.

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

MASELLA, R. *et al.* Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. **J Nutr Biochem**, v.16, p. 577–586, 2005.

MASSOULIÉ, J. *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progr Neurobiol**, v. 41,p. 31-91, 1993.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Front Biosci**, v.15, p. 339-345,1999.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GOMEZ, C., NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**, v.32, p.595-603, 1999.

MAY, J. M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? **FASEB J**, v. 13, p. 995-1006, 1999.

MAYES, P. A. Biologic oxidation. In Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds): **Harper's biochemistry**. San Mateo, Appleton & Lange, p. 105-111, 1990.

MAZZANTI, C. M. *et al.* Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 33, p. 1061-1065, 2003.

MAZZANTI, C. M. *et al.* Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 34, p. 803-807, 2004.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

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

MELZIG, M. F. Inhibition of adenosine-deaminase activity of aortic endothelial-cells by selected flavonoids. **Planta Med**, v.62, p. 20-21, 1996.

MÉNDEZ FILHO, J. D.; RODRÍGUEZ, H. G. R. Sobre los beneficios de los radicales libres. **Rev Méd Inst Mex Seguro Soc**, v. 35, p. 309-313, 1997.

MESULAM, M. M. *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience** v. 110, p. 627-639, 2002.

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

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

MOHAMED, A.K. *et al.* The role of oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in late diabetic complications. **BioFactors**, v.10, p.157-167, 1999.

MORESCO, R.N. *et al.* Effect of the aqueous extract of *Syzygium cumini* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Phytother Res**, v.21, p. 793- 795, 2007.

MORETTO, M. B. *et al.* Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. **J Trace Elemen Med Biol**, v. 17, p. 255-260, 2004.

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.

NAMIKI, M. Antioxidants/ antimutagens in food. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.29, p. 273-300, 1990.

NEUMANN, S. *et al.* The nonneuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. **Life Sci**, v. 80, p.2361–2364, 2007.

NISHIKAWA, T. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787-790, 2000.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

NORTHAM, E. A.; RANKINS, D.; CAMERON, F. J. Therapy insight: the impact of type 1 diabetes on brain development and function. **Natur Clin Pract Neurol**, v.2, p. 78-86, Review, 2006.

ONG, K. C.; KHOO, H. E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sci**, v. 67, p. 1695-1705, 2000.

PAK, M. A. *et al.* Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1049- 1053, 1994.

PAWLAK, W. *et al.* Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes. **J Gravit Physiol**, v. 5, p.163-164, 1998.

PEART, J. N.; GROSS, G. J. Cardioprotection following adenosine kinase inhibition in rat hearts. **Basic Res Cardiol**, v. 100, p. 328–336, 2005.

PEPATO, M. T. *et al.* Lack of antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 3, p. 389- 395, 2001.

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

PFAFFLY, J. R. Diabetic complications, hyperglycemia & free radicals. **Free Radic Biol Med**, v. 77, p. 222, 2001.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

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.

POSPISILOVA, S.; FREBORT, Y. Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 151, p. 3–10, 2007.

PRADO, M. A. M. *et al.* Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem Int**, v. 41, p. 291-299, 2002

PRINCE, P. S. M., MENON, V. P., PARI, L. Effect of *Syzygium cumini* extracts on hepatic hexokinase and glucose-6-phosphatase in experimental diabetes. **Phytother Res**, v. 11, p. 529-531, 1997.

PRINCE, P. S. M.; MENON, V. P.; PARI, L. Hypoglycemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in Alloxan diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 61, p. 1-7, 1998.

RACEK, J. *et al.* What is the Source of Free Radicals Causing Hemolysis in Stored blood? **Physiol Res**, v. 50, p. 383–388, 2001.

RACONKZAY, Z. *et al.* Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chem Biol Interact**, v.157, p. 233-238, 2005.

RAMAKRISHNA, V.; JAIKHANI, R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. **Acta Diabetol**, v.45, p. 41-46, 2008.

RAMKUMAR, K. M. *et al.* Effect of *Gymnema montanum* leaves on red blood cell resistance to oxidative stress in experimental diabetes. **Cell Biol Toxicol**, v.24, p. 233-241, 2008.

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

RAO, A. A.; GUMPENY, R. S.; DAS, U. N. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Med Hypotheses**, v. 69, p. 1272–1276, 2007.

RATHBONE, M. *et al.* Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progr Neurobiol**, v. 59, p.663-690, 1999.

RIZVI, S.I. *et al.* Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, p.70-5, 2005.

ROCHA, F. D. *et al.* Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, p. 49-54, 2006.

RODWELL, V. W. **Estrutura, função e replicação das macromoléculas informacionais**. In: Murray, R. K.; Granner, D.K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. – Harper: Bioquímica. 8<sup>a</sup> 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.

ROSOVE, M. H.; FRANK, H. J.; HARWING, S. S. Plasma beta-thromboglobulin, platelet factor 4, fibrinopeptide A, and other hemostatic functions during improved, shortterm glycemic control in diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 7, p.174 –179, 1984.

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

SAID, O. *et al.* Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J Ethnopharmacol**, v. 83, p. 251-265, 2002.

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

SANCHEZ-CHAVEZ, G.; SALCEDA, R. Acetyl- and butyrylcholinesterase in normal and diabetic rat retina. **Neurochem Res**, v.26, p. 153–159, 2001.

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

SCHETINGER, M.R. *et al.* Activity of synaptosomal ATP diphosphohydrolase from hippocampus of rats tolerant to forebrain ischemia. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, p.1123-1128, 1994.

SCHMATZ, R. *et al.* Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci**, v.84, p. 345-350, 2009.

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, p. 367-369, 2000.

SCHOSSLER, D. R. C. et al. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini*. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1821-1825, 2004.

SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R. A. Mechanisms of thrombopoiesis. **J Thromb Haemost**, v. 3, p. 1717-1724, 2005.

SHAFI, P. M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, p. 414-416, 2002.

SHARMA, S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol**, v.104, p. 367-373, 2006.

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochim Pol**, v. 53, p. 539–546, 2006.

SHOELSON, S. E. Insulin and other antidiabetic agents. Kirk- Othmer **Encyclopedia of Chemical Technology**, 3th. Edn, John Wiley, New York, v. 14, p. 662-676, 1995.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais, potencial antiinflamatório. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, p.38-43, 2000.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, p.1314, 1988.

SILVA, C.A. Estudo sobre a participação dos eritrócitos na regulação da glicemia e suas relações com o metabolismo hepático de carboidratos [tese]. Campinas (SP): IBUNICAMP; 1997.

SILVA, C.A., et al. Participação dos eritrócitos no controle glicêmico no exercício. **Saúde em Revista**, v. 7, p. 31-39, 2005.

SLATER, T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochem J**, v.222, p.1-15, 1984.

SOARES, J. C. M.; COSTA, S. T. da; CECIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com *diabetes mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 113-118, 2000.

SOBOL, A. B.; WATALA, C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v.50, p. 1-16, Review, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em <http://www.diabetes.org.br>, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Diabetes mellitus: tratamento medicamentoso, 2004.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for na old actor. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SOSLAU, G.; YOUNGPRAPAKORN, D. A possible dual physiological role of extracellular ATP in the modulation of platelet aggregation. **Biochim Biophys Acta**, v.1355, p.131-140, 1997.

SOVIC, A. *et al.* The carcinostatic and proapoptotic potential of 4-hydroxynonenal in HeLa cells is associated with its conjugation to cellular proteins. **Anticancer Res**, v. 21, p. 1997-2004, 2001.

STANLEY, M. P.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, P. V. Syzygium cumini seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **J Ethnopharmacol**, v.84, p.205-209, 2003.

STRATMANN, B.; TSCHOEPE, D. Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes. **Diab Vasc Dis Res**, v. 2, p. 16-23. Review, 2005.

STEFANOVIC, V. *et al.* Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase in obese type 2 diabetic patients treated with glicazide. **Diabetes Metab**, v. 32, p. 166-170, 2006.

SUHAIL, M.; RIZVI, S. I. Erythrocyte membrane acetylcholinesterase in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. **Biochem J**, v. 259, p. 897–899, 1989.

SZELÉNYI, J. L.; PÁLDI-HARIS, P.; HOLLÁN, S. Changes in the cholinergic system of lymphocytes due to mitogenic stimulation. **Immunol Lett**, v.16, p.49-54, 1987.

TALESA, V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. **Mech Ageing Dev**, v. 122, p. 1961-1969, 2001.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v.42, p.1075-1081, Review, 2003.

TEIXEIRA, C. C. *et al.* The effect of *Syzygium cumini* (L.) skeels on post-prandial blood glucose levels in non-diabetic rats and rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol**, v.56, p. 209-213, 1997.

TEIXEIRA, C. C. *et al.* Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. **J Ethnopharmacol**, v. 71, p. 343-347, 2000.

THIERMANN, H. *et al.* Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. **Chem Biol Interact**, v. 157-158, p. 345- 347, 2005.

TIANO, L. *et al.* Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Mutat Res**, v. 464, p. 269-277, 2000.

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.

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

TIWARI, A. K. Antioxidants: new generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. **Curr Sci**, v. 86, p.1092–1102, 2004.

UNGERER, J. P. *et al.* Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. **Clin Chem**, v. 38, p. 1322–1326, 1992.

UNGERER, J. P. *et al.* Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. **Chest**, v. 106, p. 33, 1994.

USHIDA, Y. *et al.* Endothelium-dependent vasorelaxation effect of rutin-free tartary buckwheat extract in isolated rat thoracic aorta. **J Nutr Biochem**, v.19, p. 700–707, 2008.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, p.1–40, 2006.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DER GRAAF, P. H. *et al.* Mechanism-based pharmacokinetic pharmacodynamic modeling of antilipolytic effects of adenosine A(1) receptor agonists in rats: prediction of tissue-dependent efficacy in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 290, p. 701-709, 1999.

VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **J Biol Chem**, v. 251, p. 5448–5456, 1976.

VERICEL, E. *et al.* Diabetic Patients without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status. **Diabetes**, v. 53, p.1046- 1051, 2004.

VIBERTI, G. The need for tighter control of cardiovascular risk factors in diabetic patients. **J Hypertens**, v. 1, p. 3-6, 2003

VISIOLI, F.; KEANEY Jr., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep. **Cardiovasc Res**, v. 47, p. 409-418, 2000.

VOLPATO, G. T. *et al.* Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev Bras Plant Med**, v. 4, p.35-45, 2002.

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

WESSLER, I. *et al.* Dysfunction of the nonneuronal cholinergic system in the airways and blood cells of patients with cystic fibrosis. **Life Sci**, v. 80, p. 2253–2258, 2007.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the nonneuronal cholinergic system in humans. **Br J Pharmacol**, v. 154, p. 1558–1571, 2008.

WIEACKER, P. *et al.* Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann Genet**, v. 23, p. 73-77, 1980.

WILD, S. *et al.* Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p.1047-1053, 2004.

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.

YAMAGISHI, S.; NAKAMURA, K.; IMAIZUMI, T. Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic vascular complications. **Curr Diabetes Rev**, v.1, p. 93–106, 2005.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mut Res**, v. 379, p. 201-210, 1997.

ZHANG, Y. *et al.* Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells. **Carcinogenesis**, v. 23, p.207-211, 2002.

ZHAO, L. Effects of free radicals in diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 77, p. 222, 2001.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochem J**, v.15, p.345-365. Review, 1992.

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

ZIMMERMANN, H. *et al.* New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochem Int**, v.32, p.421-425, 1998.

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

ZYZAK, D. B. *et al.* Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. **Arch Biochem Biophys**, v. 316, p. 547-554, 1995.

**ANEXO A:** Comprovante de submissão do manuscrito “Erythrocytic Enzymes and Antioxidant Status in Patients with Type 2 Diabetes: Ameliorating Effect of *Syzygium cumini* Leaf Extract” à revista European Journal of Pharmacology:



Submissions Being Processed for Author Maria Beatriz Moretto, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display  results per page.

+ 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>  <a href="#">Send E-mail</a></p>		Erythrocytic Enzymes and Antioxidant Status in Patients with Type 2 Diabetes: Ameliorating Effect of <i>Syzygium cumini</i> Leaf Extract	20 Dec 2010	20 Dec 2010	Submitted to Journal

**ANEXO B:** Produção bibliográfica obtida durante o período de realização do Mestrado:

1)Efeito do *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre a atividade das enzimas adenosina deaminase e 5' nucleotidase, in vitro, em plaquetas de diabéticos. Jornada Acadêmica Integrada, UFSM, 2009 (apresentação oral de trabalho).

2)Efeito do extrato aquoso de *Syzygium cumini* sobre a atividade da enzima adenosina deaminase e dano oxidativo em plaquetas de pacientes diabéticos. XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos (Farmapolis), 2010 (apresentação de trabalho na forma de pôster).

3)Efeito do *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre a atividade das enzimas adenosina deaminase e 5' nucleotidase, in vitro, em plaquetas de diabéticos. 24 °Jornada Acadêmica Integrada, UFSM, 2010 (apresentação de trabalho na forma de pôster).

4)Artigo publicado na revista *Cellular Physiology and Biochemistry* (2010): “*Syzygium cumini* extract decrease Adenosine deaminase, 5 nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients”.

5)Artigo submetido à revista *European Journal of Pharmacology*: “Erythrocytic Enzymes and Antioxidant Status in Patients with Type 2 Diabetes: Ameliorating Effect of *Syzygium cumini* Leaf Extract”.

6) Artigo publicado: Abdalla, F.H., Belle, L. P., De Bona, K. S., Bittencourt, P. E. R., Pigatto, A.S., Moretto, M. B. *Allium sativum* l. extract prevents methyl mercury-induced cytotoxicity in peripheral blood leukocytes (ls). *Food and Chemical Toxicology*. , v.48, p.417 - 421, 2010.

7) Artigo publicado: Pinheiro, F.V., Pimentel, V. C., De Bona, K. S., Scola, G., Salvador, M., Funchal, C.S., Moretto, M. B. Decrease of adenosine deaminase activity and increase of lipid peroxidation after Metothrexate treatment in rats: protective effects of grape seed. *Cell Biochemistry and Function*. , v.28, p.89 - 94,

2010.

8) Artigo publicado: G. R. Thomé, C. M. Mazzanti, M. Ahmed, M. Corrêa, R. M. Spanevello, P. A. Maldonado, C. Luchese, D. Cargnelutti, V. M. Morsch, DE BONA, K. S., M. M. M. F. Duarte, A. Mazzanti, A. M. Fiorenza, C. W. Nogueira, M. R. C. Schetinger. Activity of ectonucleotidases and adenosine deaminase in rats exposed to cigarette smoke. *Inhalation Toxicology.* , 2009.

9) Artigo publicado: Pimentel, V. C., Bellé, L. P., Pinheiro, F.V., De Bona, K. S., Moretto, M. B. Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia. *International Journal of Developmental Neuroscience.* , 2009.