

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

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE BATATA
E ALECRIM SOBRE AS COLINESTERASES EM UM
MODELO DE DIABETES TIPO 1 EM RATOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eduardo José Machado Dutra

Santa Maria, RS, Brasil
2014

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE BATATA E ALECRIM SOBRE AS COLINESTERASES EM UM MODELO DE DIABETES TIPO 1 EM RATOS

por

Eduardo José Machado Dutra

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Maria Melchiors Morsch

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Machado Dutra, Eduardo José

Avaliação do efeito de extratos de batata e alecrim sobre as colinesterases em um modelo de diabetes tipo 1 em ratos / Eduardo José Machado Dutra.-2014.

59 p.; 30cm

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Coorientadora: Vera Maria Melchios Morsch

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2014

1. ácido rosmarínico 2. antocianinas 3. colinesterases
4. diabetes I. Chitolina Schetinger, Maria Rosa II.
Melchios Morsch, Vera Maria III. Título.

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

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE BATATA
E ALECRIM SOBRE AS COLINESTERASES EM UM
MODELO DE DIABETES TIPO 1 EM RATOS**

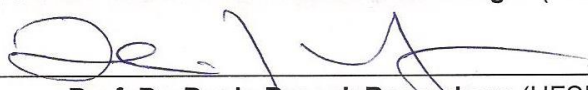
elaborada por
Eduardo José Machado Dutra

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

Comissão Examinadora



Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Chitolina Schetinger (Orientadora)



Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg (UFSM)



Prof.ª Dr.ª Sara Marchesan de Oliveira (UFSM)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2014

~~~~ الله ~~~~

*Em memória de Javed Anwar,  
estimado amigo e colega*

~~~~ الله ~~~~

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo o incentivo, amor e carinho que me permitiram chegar até aqui. Por sempre cobrarem o melhor de mim e acreditarem no meu potencial, principalmente quando eu mesmo duvidei. Por serem modelos e exemplos de caráter e perseverança.

À minha família, tios, tias, primos e primas, por serem sempre presentes nos bons e maus momentos. Aos meus falecidos avós, que foram guia e sustentação durante todo o meu caminho.

À minha orientadora, pela oportunidade incrível e paciência fora de série, pelas discussões proveitosas e preocupação sincera (“coragem, pode chorar na minha sala”). À minha co-orientadora, pelos galhos quebrados e opiniões construtivas.

Aos queridos colegas de laboratório, pelas experiências e risadas compartilhadas, pelas trocas de ideias, por me acolherem e suportarem durante todos esses anos de Iniciação Científica e Mestrado. Em especial, à Naiara, cuja ajuda foi imprescindível e sem a qual este trabalho não teria sido possível.

À Tami, por tornar tudo isso suportável. Pelo apoio e pelas broncas, sempre repletas de carinho. Por me carregar nos braços quando o coração pesava demais para o corpo ficar de pé. Por ser a melhor coisa que já me aconteceu.

Aos demais amigos e colegas da Química, pelo companheirismo e bons momentos. Aos professores, pelos ensinamentos e inspiração.

A todos vocês, meus mais sinceros agradecimentos.

It's funny how some distance
Makes everything seem small
And the fears that once controlled me
Can't get to me at all
It's time to see what I can do
To test the limits and break through [...]

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

Avaliação do efeito de extratos de batata e alecrim sobre as colinesterases em um modelo de diabetes tipo 1 em ratos

Autor: Eduardo José Machado Dutra

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Maria Melchiors Morsch

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de dezembro de 2014

O diabetes tipo 1 (DT1) é uma doença caracterizada pela incapacidade do indivíduo de produzir o hormônio insulina devido à destruição das células- β pancreáticas pelas células imune do próprio organismo. Ainda não existe uma terapia 100 % eficaz para tratar os sintomas do DT1. Os tratamentos atuais envolvem monitoramento constante dos níveis de glicose do sangue e injeções periódicas de insulina. Os processos inflamatórios estão associados com o desenvolvimento e a progressão do DT1 e, por isso, novas terapias envolvendo fármacos com propriedades anti-inflamatórias têm sido alvo crescente de interesse no meio científico. Os polifenóis são uma classe de compostos heterocíclicos dos quais fazem parte as antocianinas e o ácido rosmarínico, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Neste trabalho, estudamos os efeitos de dois extratos ricos em polifenóis – batata cozida e alecrim - e de um concentrado de antocianinas em um modelo de ratos com diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina. Os extratos foram administrados por gavagem durante 30 dias. Após, os ratos foram eutanasiados e verificou-se os efeitos do tratamento sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) de linfócitos e da butirilcolinesterase (BuChE) de soro, devido à importância dessas enzimas como biomarcadores de inflamação. As atividades de ambas as enzimas mostraram-se aumentadas nos ratos diabéticos em relação aos controles. O extrato de casca de batata cozida e as antocianinas concentradas não alteraram significativamente a atividade da AChE em linfócitos, provavelmente devido à sua baixa biodisponibilidade, enquanto o extrato de alecrim foi um potente inibidor dessa enzima. Nenhum dos tratamentos surtiu efeito sobre a atividade da BuChE de soro. Estes resultados reforçam a hipótese inflamatória na patologia do DT1 e apresentam o extrato de alecrim como uma possível terapia secundária para o tratamento de doenças associadas à inflamação, como o diabetes tipo 1.

Palavras-chave: Alecrim; Batata; Colinesterases; Diabetes; Linfócitos.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

Evaluation of the effects of potato and rosemary extracts on cholinesterases of type-1 diabetic rats

Author: Eduardo José Machado Dutra

Academic Advisor: Prof. Dr. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-advisor: Prof. Dr. Vera Maria Melchiors Morsch

Date and Place of the Defense: Santa Maria, December 19, 2014

Type 1 diabetes (T1D) is a disease characterized by the individual's inability to produce the hormone insulin due to destruction of pancreatic β -cells by the immune cells of the organism itself. So far, there is no 100% effective therapy for treating the symptoms of T1D. Current treatments involve constant monitoring of blood glucose levels and regular insulin injections. Inflammatory processes are associated with the development and progression of T1D, and so new therapies involving drugs with anti-inflammatory properties have been the subject of increasing interest in the scientific community. Polyphenols are a class of heterocyclic compounds that include anthocyanins and rosmarinic acid, both known for their antioxidant and anti-inflammatory properties. We studied the effects of two polyphenol rich extracts (cooked potato and rosemary) and a concentrate of anthocyanins in a model of type 1 streptozotocin-induced diabetic rats. The extracts were administered by gavage for 30 days. After this period, the rats were euthanized and we assessed acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and serum butyrylcholinesterase (BuChE) activity, because of the importance of these enzymes as biomarkers of inflammation. The activities of both enzymes were shown to be increased in diabetic rats compared to controls. The cooked potato peel extract and concentrated anthocyanins did not alter AChE activity in lymphocytes, probably due to low bioavailability, while rosemary extract was a potent inhibitor and reverted the activity to normal levels. None of the treatments had any effect on serum BuChE activity. These results support the involvement of inflammatory processes on T1D pathology and present the rosemary extracts as a promising alternative for future phytochemical therapies for the treatment of inflammatory-related diseases, such as type 1 diabetes.

Keywords: Cholinesterases; Diabetes; Lymphocytes; Potato; Rosemary.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

| | |
|---|----|
| Table 1 – Composition of the cooked potato extracts | 40 |
| Table 2 – Composition of the rosemary extracts | 40 |
| Table 3 – Animals' weights and glycemia at last day of treatment | 43 |

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| Fig. 1 – Decaimento linear das células- β após insulto primário | 20 |
| Fig. 2 – Tipos de leucócitos responsáveis pela defesa do nosso organismo | 21 |
| Fig. 3 – Sinalização colinérgica nas fendas sinápticas | 23 |
| Fig. 4 – Estrutura cristalográfica da acetilcolinesterase | 24 |
| Fig. 5 – Acetilcolinesterase: sítio e reação | 25 |
| Fig. 6 – Regulação colinérgica de linfócitos | 27 |
| Fig. 7 – Fórmula estrutural da estreptozotocina | 30 |
| Fig. 8 – Estrutura básica dos principais tipos de flavonoides | 31 |
| Fig. 9 – Fórmula estrutural do ácido rosmarínico | 34 |

MANUSCRITO

| | |
|---|----|
| Fig. 1 – Acetylcholinesterase activity in lymphocytes | 44 |
| Fig. 2 – Butyrylcholinesterase activity in blood serum | 45 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

ABD- Associao Brasileira de Diabetes

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

BuChE - Butirilcolinesterase

ChAT – Colina acetil-transferase

DM – Diabetes melito

DNA – cido Desoxirribonucleico

DT1 – Diabetes tipo 1

DT2 – Diabetes tipo 2

Ibope – Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística

OMS – Organizao Mundial da Saúde

STZ – Estreptozotocina

VACHT – Transportador de Acetilcolina Vesicular

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 07 |
| ABSTRACT | 08 |
| LISTA DE TABELAS | 09 |
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES | 11 |
| APRESENTAÇÃO | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos | 17 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 O Diabetes Melito (DM) | 18 |
| 3.1.1 O diabetes tipo 1 (DT1) | 19 |
| 3.2 O sistema imunológico e os processos inflamatórios | 20 |
| 3.3 O sistema colinérgico: da neurotransmissão à inflamação | 22 |
| 3.3.1 O sistema colinérgico neuronal | 22 |
| 3.3.2 O sistema colinérgico não neuronal | 26 |
| 3.3.3 Interação entre os sistemas colinérgicos neuronal e não-neuronal | 27 |
| 3.4 Modelos experimentais com animais | 28 |
| 3.4.1 Modelos de DM em animais | 29 |
| 3.5 Uso de plantas com fins medicinais | 30 |
| 3.5.1 Os polifenóis | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.2 A batata e as antocianinas | 32 |
| 3.5.3 O alecrim e o ácido rosmarínico | 33 |
| 4 MANUSCRITO | 35 |
| 5 CONCLUSÃO | 51 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito, o qual se encontra na devida seção. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item Conclusão, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura e Conclusão desta dissertação.

O manuscrito está em fase de preparação.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença multifatorial que atinge uma parcela significativa e crescente da população mundial. Estima-se que o número de portadores da síndrome já ultrapasse os 300 milhões e que em poucas décadas já serão mais de 500 milhões de afetados em todo o globo (WHO, 2014). O DM é caracterizado por altos níveis de glicose no sangue, configurando assim um quadro de hiperglicemia crônica. Este aumento da quantidade de açúcar circulante se deve a uma diminuição na secreção de insulina e/ou a uma resistência adquirida a este hormônio (GILLESPIE, 2006). A Associação Brasileira de Diabetes (ABD) classifica o diabetes em dois tipos principais: o diabetes do tipo 1 (DT1) - também chamado insulinodependente, imunomediado ou infanto-juvenil - de etiologia autoimune, fortemente influenciado por fatores genéticos e ambientais e mais prevalente em crianças e adolescentes e o diabetes do tipo 2 (DT2) – também conhecido por diabetes adquirido, do adulto ou não-insulinodependente - que pode ser desencadeado por fatores como obesidade, sedentarismo e dieta hipercalórica e atinge principalmente a população entre 30 e 69 anos (KEANEY & LOSCALZO, 1999). Além desses dois tipos, dependendo da predisposição genética de cada indivíduo, podem ocorrer também casos de diabetes associado à gestação, ou a doenças como pancreatites, hemocromatoses ou fibrose cística, ou ainda devido ao uso de certos medicamentos, como diuréticos, corticoides e betabloqueadores (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010).

As causas do diabetes tipo 1 ainda não são inteiramente conhecidas, mas evidências sugerem que alterações em fatores ambientais podem levar à manifestação de um processo inflamatório exacerbado em indivíduos geneticamente predispostos, disparando uma resposta autoimune do organismo (PICCIRILLO et al., 2004). Os linfócitos, desorientados, passam a reconhecer e atacar as próprias células- β do pâncreas, que são responsáveis pela produção e liberação do hormônio insulina. Quando a destruição atinge um nível crítico, o organismo perde a capacidade de controlar a homeostase da glicose no sangue e o indivíduo torna-se dependente de injeções regulares de insulina para sobreviver (VAN BELLE, COPPIETERS & VON HERRATH, 2011). Sendo de natureza autoimune, muitos eventos inflamatórios têm sido associados com a patogênese e progressão do DT1.

A inflamação é um mecanismo natural de defesa do nosso corpo contra patógenos invasores e envolve a atuação conjunta de defesas inatas (pele, mucosas, macrófagos não específicos, etc.) e defesas específicas adquiridas (glóbulos brancos ou leucócitos). Em geral, a resposta imune é rigorosamente controlada e dura de apenas algumas horas até poucos dias (OLIVEIRA, 2009). Porém, falhas na regulação podem levar a casos de inflamação crônica, que duram meses ou até anos e estão associadas a diversas doenças, como hipertensão, aterosclerose, Alzheimer, Parkinson e diabetes melito, entre outras (SCHALKWIJK et al., 1999). Um dos mecanismos regulatórios das respostas imunes envolve a participação da acetilcolina (ACh).

A molécula da ACh, inicialmente descoberta como um neurotransmissor, atua em tecidos não-neuronais como uma molécula sinalizadora (TONIN, 2014). Os linfócitos, células responsáveis pela defesa específica contra patógenos, são os principais promotores da destruição das células- β . Foi demonstrado que os linfócitos possuem um sistema colinérgico completo, incluindo as enzimas necessárias para a síntese e transporte da ACh e as enzimas responsáveis pela sua degradação, das quais a acetilcolinesterase (AChE) é a principal. É sabido que a atividade da AChE em linfócitos de pacientes diabéticos encontra-se aumentada (FUJJI et al., 2003; KAWASHIMA & FUJII, 2003). No sangue, a principal enzima responsável pela degradação dos ésteres de colina é a butirilcolinesterase. Ambas as enzimas têm sido usadas como marcadores de inflamação (SANTARPIA, et al., 2013).

Terapias envolvendo o uso de plantas, ou moléculas derivadas delas, estão entre os tratamentos naturais mais antigos de que se tem notícia (FERREIRA et al., 2014). Os extratos de plantas contendo polifenóis têm se mostrado bastante úteis no combate a doenças diversas, sendo associados a propriedades anticancerígena, antimicrobiana, antiproliferativa, citoprotetora, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (ROCHA et al., 2006). O alecrim e a batata possuem diversos compostos polifenólicos em sua composição, em especial o ácido rosmarínico, no primeiro, e as antocianinas, no segundo (KONTOGIANNI et al., 2013; MULINACCI et al., 2008).

Assim, considerando que ainda não existe uma terapia 100 % eficaz para o tratamento do diabetes melito e que sua patologia está associada a um processo inflamatório regulado pelo sistema colinérgico, considera-se relevante investigar os efeitos de extratos ricos em polifenóis sobre a atividade dessas enzimas em modelos de diabetes tipo 1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o potencial anti-colinesterásico de extratos de batata cozida e alecrim em um modelo de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do tratamento com extratos de batata roxa cozida e alecrim sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase de linfócitos;

- Verificar o efeito do tratamento com extratos de batata roxa cozida e alecrim sobre a atividade da enzima butirilcolinesterase de soro;

- Discutir o potencial desses compostos naturais em terapias anti-inflamatórias no tratamento do diabetes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O diabetes melito (DM)

Segundo dados de novembro de 2014 divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), existem cerca de 347 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que mais de 80 % delas vivem em países de baixa e média renda *per capita*. Em 2030, estima-se que o diabetes terá alcançado a marca de 552 milhões de afetados e será a 7ª maior causa global de mortalidade. No Brasil, já são mais de 13,4 milhões de diabéticos, segundo a pesquisa “Diabetes: mude seus hábitos”, realizada pelo Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (Ibope) em 2013. Esta pesquisa revelou ainda que, do total de casos, 90 % correspondem à forma adquirida da doença, que os números estão crescendo em proporções alarmantes e que a população em geral desconhece as causas e sintomas do diabetes. (WHO, 2014)

O diagnóstico do diabetes é feito medindo-se as alterações nos níveis de glicose plasmática de jejum de 8 a 10 horas e por teste oral de tolerância à glicose, duas horas após sobrecarga de 75 g de glicose, considerando como normais pacientes com níveis de glicemia de jejum inferior a 100 mg/dL e tolerância à glicose inferior à 140 mg/dL. Pacientes com glicemia de jejum entre 100 e 126 mg/dL e tolerância à glicose entre 140 e 199 mg/dL são considerados pré-diabéticos em risco, enquanto pacientes com glicemia superior a 126 mg/dL e tolerância à glicose acima de 200 mg/dL são considerados diabéticos (SBD, 2014).

É fundamental que o diagnóstico seja feito logo no início da doença, para combater os sintomas associados à hiperglicemia, que incluem: poliúria, sede excessiva, cansaço, perda de peso (mais comum no tipo 1, mas também pode ocorrer no tipo 2), aumento do apetite, visão embaçada, deficiência nos processos de cicatrização e de combate a infecções e cetoacidose (GILLESPIE, 2006). Além disso, o diabetes está associado à incidência de sobrepeso e obesidade e a uma série de outras complicações vasculares, que podem levar a doenças cardíacas, cegueira, amputações, neuropatias e falência dos rins (BURGOYNE, 1961).

O tratamento para o diabetes resume-se a controlar a glicemia do sangue e manter um estilo de vida saudável, com práticas físicas regulares e uma alimentação

balanceada. Para os pacientes com diabetes do tipo 1, a aplicação de doses de insulina é fundamental, o que não costuma ser muito apreciado visto que a administração é por via subcutânea (VAN BELLE, COPPIETERS & VON HERRATH, 2011). Já os pacientes com diabetes tipo 2 (DT2) podem valer-se de medicamentos por via oral para o controle dos níveis glicêmicos, sendo que a maioria destes fármacos atua aumentando a sensibilidade e/ou a secreção de insulina ou então diminuindo a secreção de glucagon (NGUYEN et al., 2011).

3.1.1 O diabetes tipo 1 (DT1)

O diabetes do tipo 1 pode ser considerado como uma resposta autoimune do corpo, que passa a atacar as células- β pancreáticas responsáveis pela produção do hormônio insulina (ATKINSON, 2012). Fatores genéticos, ambientais e imunológicos são apontados como os principais responsáveis pela manifestação da doença, mas existem evidências que sugerem que infecções virais também poderiam desencadear o processo autoimune característico do DT1, sobretudo aquelas causadas por enterovírus, rotavírus e rubéola (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010). Uma sequência de eventos desencadeadores parece preceder a manifestação da hiperglicemia por meses ou até anos, dificultando o estabelecimento claro dos fatores que levam ao aparecimento do DT1. O diabetes melito insulínico acomete principalmente crianças, adolescentes e jovens adultos, sendo por isso também conhecido como diabetes juvenil e compreende cerca de 10 % dos casos de diabetes registrados anualmente no mundo (DANEMAN, 2006).

Antes que os sintomas aparentes do diabetes tipo 1 se manifestem, é possível verificar a ocorrência de uma cascata de eventos imunes silenciosos que culmina na destruição das células- β pancreáticas responsáveis pela produção de insulina. Esta cascata tem início quando ocorre uma falha nos mecanismos de reconhecimento do sistema imunológico e em decorrência disso são produzidos autoanticorpos, ou seja, anticorpos que atuam contra uma ou mais proteínas do próprio organismo. Em seguida, os linfócitos auto reativos são ativados e invadem o pâncreas para destruir as células- β das ilhotas de Langerhans (FAIDEAU et al., 2005). Essa destruição sistemática pode ocorrer durante anos sem ser detectada, até que um número suficientemente grande de células do pâncreas tenham sido

destruídas e o indivíduo torne-se dependente de administrações regulares de insulina para sobreviver (Figura 1).

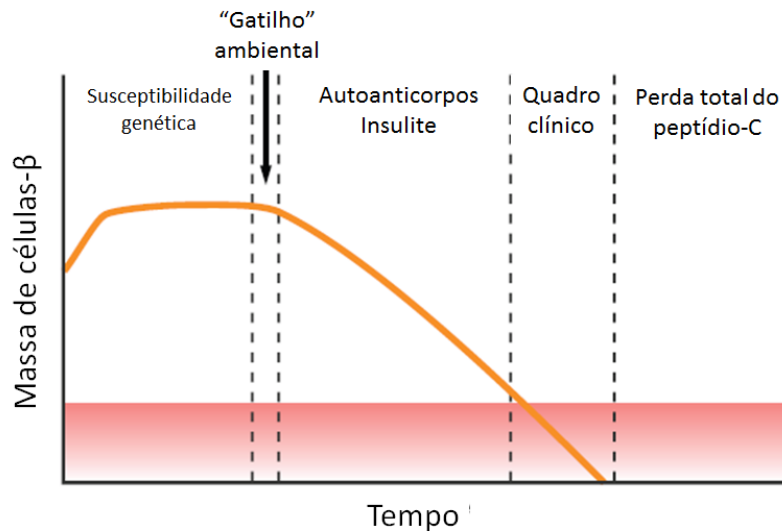


Figura 1 - Modelo de decaimento linear da massa de células- β pancreáticas após estímulo primário. Em indivíduos geneticamente predispostos, um gatilho ambiental induz autoimunidade e destruição das células- β das ilhotas de Langerhans, levando a um quadro de pré-diabetes e, quando a destruição atinge um estado crítico, culminando em diabetes melito tipo 1 (*Adaptado de VAN BELLE, COPPIETERS & VON HERRATH, 2011*).

3.2 O sistema imunológico e os processos inflamatórios

O sistema imunológico é o mecanismo de defesa do nosso organismo contra bactérias, vírus, germes, micróbios, toxinas e demais corpos estranhos que poderiam vir a nos infectar. O sistema imune geralmente é dividido em duas partes: as defesas inatas, com as quais o indivíduo já nasce, tais como a pele, mucosas, o suco gástrico e macrófagos não-específicos; e as defesas adaptativas ou adquiridas (imunidade) contra invasores específicos, que se desenvolvem durante a vida toda e permitem que o organismo identifique e defenda-se de um patógeno com o qual ele já teve contato previamente (PARKIN & COHEN, 2001). A defesa contra patógenos específicos é feita pelos glóbulos brancos (ou leucócitos), que por sua vez podem ser divididos em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos, conforme a Figura 2 (DEMPSEY, VAIDYA & CHENG, 2003).

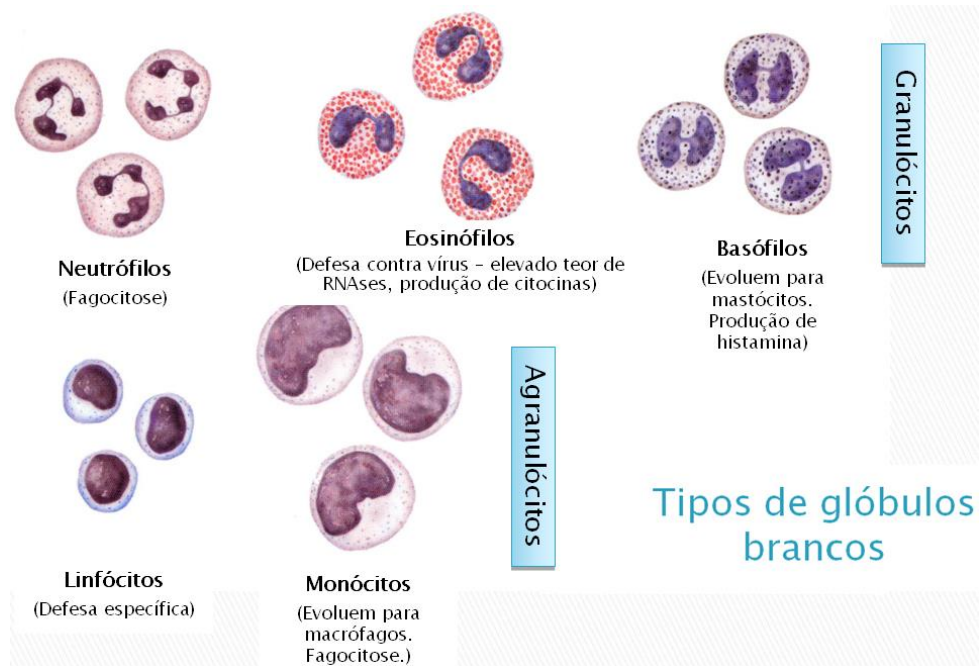


Figura 2 – Tipos de leucócitos responsáveis pela defesa do nosso organismo (Adaptado de Pinto, 2011).

Os linfócitos são derivados das células-tronco hematopoiéticas produzidas na medula óssea vermelha e podem ser classificados em linfócitos B ou T, sendo que os primeiros estão envolvidos na resposta imune humoral e os segundos fazem parte da resposta imune mediada por células (CHAPLIN, D. D., 2006). Os linfócitos T reconhecem um patógeno somente após pequenos fragmentos deste (chamados antígenos) terem sido reconhecidos e combinados com um receptor denominado Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH). A detecção dos antígenos é feita pelas células B, que então produzem anticorpos específicos para eles e “marcam” os invasores a serem destruídos, ao que entram em cena os linfócitos T auxiliares (CD4+) que produzem e liberam citocinas que recrutam células efetoras para lidar com o corpo estranho. Entre as células recrutadas, encontram-se os linfócitos T citotóxicos (CD8+), cuja função é destruir células anormais ou infectadas (BONILLA & OETTGEN, 2010). Uma das primeiras respostas do sistema imunológico no combate a invasores é a inflamação.

A inflamação é uma resposta fisiológica natural do organismo a uma lesão de tecido ou à presença de um patógeno ou outro agente irritante. É um processo finamente regulado por mediadores pró e anti-inflamatórios que atuam no recrutamento de células do sistema imune, tais como leucócitos, macrófagos e linfócitos (OLIVEIRA, 2009). Entre os principais mecanismos que regulam a resposta

inflamatória, podemos citar as citocinas, as quimiocinas, as moléculas de adesão celular, as células *natural killer*, as enzimas sintetizadoras de prostaglandinas, o óxido nítrico (NO), entre outros mediadores que controlam o início e fim da resposta inflamatória, que geralmente dura de algumas horas a poucos dias (AHMED, 2011). Porém, deficiências nos mecanismos de terminação do processo inflamatório podem levar a um quadro de inflamação crônica, que pode durar meses ou até anos e contribui para o desenvolvimento de doenças autoimunes, em que o organismo passa a reconhecer como invasor as próprias células e tecidos do corpo (MURAKAMI & HIRANO, 2012).

Embora a patologia do Diabetes Tipo 1 (DT1) não seja inteiramente conhecida até o presente momento, uma das teorias sugere que um dano primário (que poderia ser uma infecção viral, p.e.) seria o responsável por desencadear uma resposta inflamatória típica do sistema imunológico inato. Tal evento promoveria considerável estresse sobre a homeostase das células- β pancreáticas, resultando em uma mudança no perfil de expressão gênica em indivíduos predispostos e culminando na destruição das células- β do pâncreas pelo próprio organismo (BAUMANN, SALEM & BOEHM, 2012). Ainda, acredita-se que as células- β poderiam estar envolvidas no processo de sua própria destruição devido a um segundo tipo de estresse celular intrínseco desencadeado por uma fase de alta demanda de insulina (KARUNAKARAN & PARK, 2013).

3.3 O sistema colinérgico: da neurotransmissão à inflamação

3.3.1 O sistema colinérgico neuronal

O sistema colinérgico envolve o mediador químico acetilcolina (ACh) e o aparato enzimático responsável pela sua síntese e degradação. Desde a descoberta em 1914 do papel da ACh como neurotransmissor, por Sir Henry Dale, o sistema colinérgico tem sido estudado como alvo para o desenvolvimento de terapias visando o tratamento de síndromes neurológicas, como transtorno de humor, esquizofrenia, epilepsia, morte súbita infantil e as doenças de Parkinson e Alzheimer (SERRES, 2011).

A síntese da acetilcolina é feita pela enzima colina-o-acetil-transferase (ChAT, EC 2.3.1.6) a partir da acetil-coenzima A formada durante a respiração celular e da

colina proveniente do metabolismo dos lipídios. Uma vez sintetizada, a ACh é carregada pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) e armazenada em vesículas sinápticas, aonde permanece até ser liberada por exocitose e ligar com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré- e pós-sinápticas, transmitindo assim o impulso nervoso (SCHMATZ et al., 2009). O término da neurotransmissão é mediado pela ação das colinesterases, que promovem a hidrólise da ACh em acetato e colina na fenda sináptica (ver Figura 4).

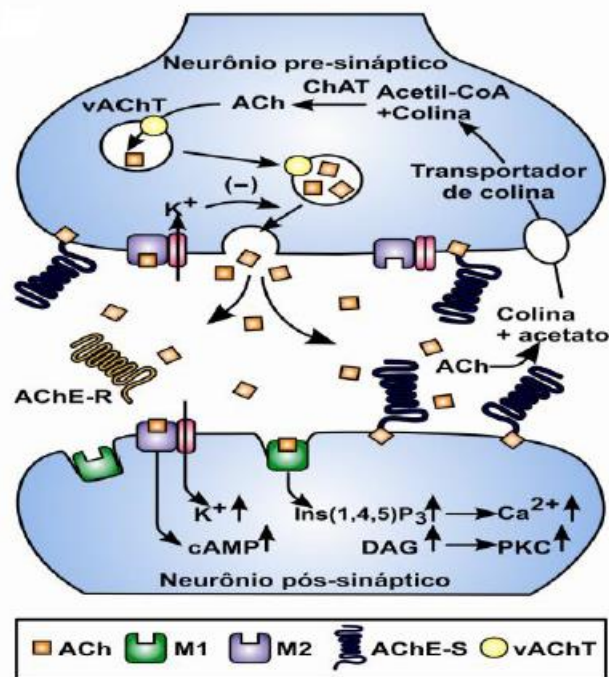


Figura 3 - Representação da sinalização colinérgica que ocorre nas fendas sinápticas durante a transmissão de impulsos nervosos. A acetilcolina (ACh) é sintetizada pela colina acetil-transferase (ChAT) e armazenada nos transportadores de ACh vesicular (vAChT). No momento do impulso nervoso, a ACh é liberada na fenda sináptica e interage com os receptores muscarínicos do tipo 1 (M1) e do tipo 2 (M2). Após, a ACh restante é prontamente hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato (*Adaptado de Serres, 2011*).

As colinesterases pertencem à classe enzimática das hidrolases e seu principal alvo catalítico são os ésteres de colina. Dependendo da sua especificidade, as colinesterases são classificadas em acetilcolinesterases (AChE, EC 3.1.1.7) ou colinesterases verdadeiras, se hidrolisam preferencialmente a acetilcolina ou em butirilcolinesterases (BuChE, EC 3.1.1.8) ou pseudocolinesterases, se hidrolisam

preferencialmente a butirilcolina ou outros ésteres de maneira não-específica (TAYLOR, 1991).

A acetilcolinesterase (Figura 5) é a principal enzima regulatória responsável pela terminação dos impulsos nervosos, possuindo uma enorme eficiência catalítica (uma única molécula da enzima é capaz de hidrolisar até 6×10^5 moléculas de ACh em um único minuto) e alta especificidade pelo seu substrato (DUTRA, 2013). Porém, a função da AChE não se restringe às transmissões nervosas, pois ela também tem sido associada ao crescimento dos neuritos, à regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, à osteogênese e à atividade hematopoiética. Além disso, sua presença em linfócitos parece implicar um possível papel na regulação das funções imunes (KAWASHIMA & FUJII, 2000).

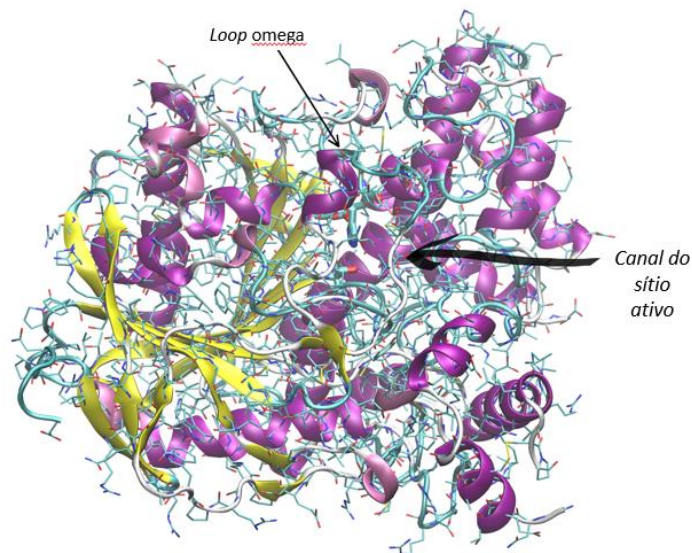


Figura 4 - Estrutura cristalográfica da acetilcolinesterase (AChE), ressaltando o sítio catalítico onde ocorre a hidrólise da acetilcolina (ACh) em colina e acetato. (Adaptado de Bourne et al., 2003).

A partir da elucidação da estrutura tridimensional da AChE, novas possibilidades terapêuticas passaram a ser investigadas. Uma das principais revelações sobre a estrutura dessa enzima foi a presença de um sítio ativo contendo uma tríade catalítica semelhante a de outras hidrolases de serina. A tríade, composta por resíduos de glutamato 334, serina 203 e histidina 447, está localizada na base de uma profunda (~ 20 Å) e estreita fenda, denominada “gorge aromático”, que contém ainda alguns poucos resíduos negativamente carregados à sua volta.

Dentro do *gorge*, localizam-se dois sítios aniônicos, formados primariamente por triptofanos. O primeiro deles, denominado Sítio Aniônico Periférico (SAP), é responsável pela captura da acetilcolina por meio de interações cátion- π e ligações de hidrogênio entre a carbonila do grupo acetil e um resíduo de tirosina mais abaixo. O segundo sítio, chamado Sítio Aniônico Catalítico (SAC), trabalha posicionando a acetilcolina para que a tríade catalítica atue sobre ela (TAYLOR, 1991).

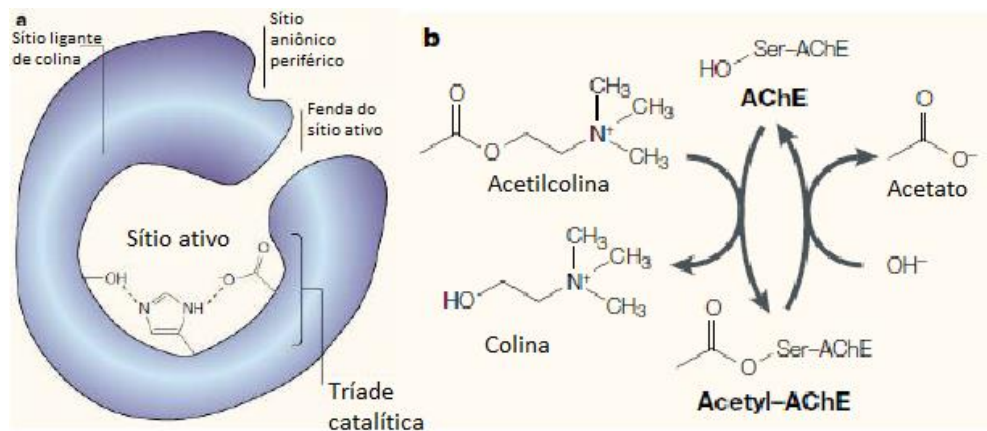


Figura 5 – Acetilcolinesterase: sítio e reação. a) Representação da enzima, com o sítio ativo localizado no fundo de um canal estreito, alinhado com cadeias laterais hidrofóbicas de aminoácidos b) A AChE promove a hidrólise da acetilcolina pela formação de um intermediário acetil-AChE com a liberação de colina e a subsequente hidrólise do intermediário para liberar acetato (*Adaptado de Serres, 2011*).

A butirilcolinesterase, por sua vez, é bastante semelhante estruturalmente à AChE (elas possuem uma homologia de cerca de 65 % em suas sequências de aminoácidos e têm sítios catalíticos parecidos), mas diferem em suas funções, distribuição e especificidade pelos substratos. Especula-se que ambas as enzimas tenham surgido de um precursor comum, dadas as grandes semelhanças entre os genes que as codificam (DARVESH, HOPKINS & GEULA, 2003). Enquanto a AChE é bastante específica para a acetilcolina, a BuChE é capaz de hidrolisar uma quantidade maior de ésteres e, dessa forma, exerce algumas funções mais diversificadas em vários órgãos do corpo, como no fígado, na pele, no cérebro, no

músculo liso gastrointestinal e no plasma sanguíneo em forma solúvel (SANTARPIA, et al., 2013).

3.3.2 O sistema colinérgico não-neuronal

Como discutido anteriormente, o primeiro papel bioquímico proposto para a acetilcolina foi o de um neurotransmissor, dando origem a diversos estudos sobre a sua atuação em sistemas neuronais, sobretudo nas sinapses. No entanto, hoje sabemos que sua presença não está restrita aos neurônios e que ela se encontra expressa em diversos outros tecidos e órgãos não-neuronais de mamíferos, como nas células endoteliais, mesoteliais, parenquimais, epiteliais e nas células imune (TONIN, 2014). Nestes meios, a ACh exerce as funções de molécula sinalizadora e/ou citotransmissora.

Dentre as células que apresentam o “maquinário” bioquímico necessário para sintetizar, regular e reconhecer acetilcolina, os linfócitos possuem a maior parte dos componentes para constituir um sistema colinérgico não-neuronal independente e funcional (FUJJI et al., 2003). Uma das diferenças notáveis entre o sistema colinérgico de linfócitos e o sistema colinérgico neuronal clássico é que, em linfócitos, não se conseguiu detectar a presença de compartimentos vesiculares para o armazenamento de acetilcolina, sugerindo que a ACh seja produzida pelos linfócitos conforme necessidade e liberada imediatamente, sem ser estocada (KAWASHIMA & FUJII, 2003). No entanto, o mecanismo de terminação do sinal permanece idêntico: após a interação com os receptores, a ACh é prontamente hidrolisada pelas enzimas colinesterases (Figura 7). Outros estudos ainda demonstraram que as células T auxiliares são a maior fonte de ACh em sangue e que a sua ativação modula os processos de sinalização intracelular por meio da expressão de receptores muscarínicos e nicotínicos, com a ACh agindo como imunomodulador (ANWAR et al., 2012).

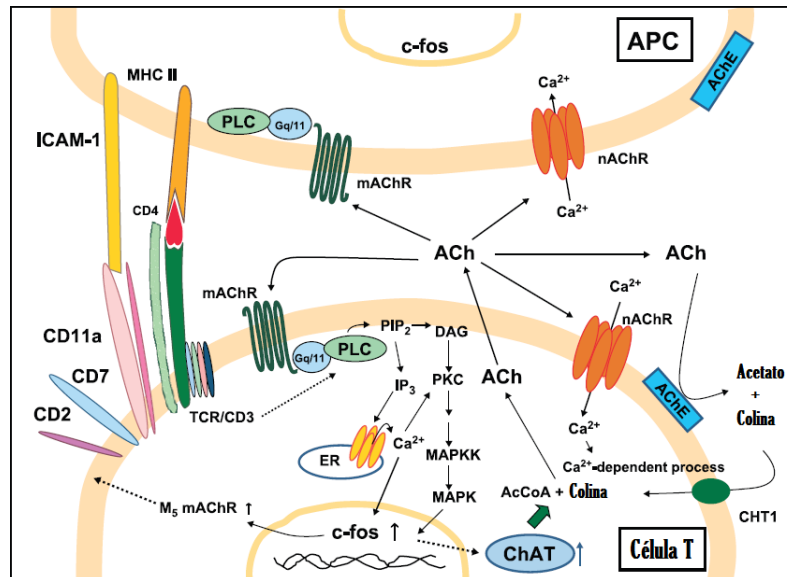


Figura 6 – Diagrama esquemático ilustrando os diversos caminhos regulatórios que afetam e são afetados pelo sistema colinérgico de linfócitos durante respostas imunológicas. ACh, acetilcolina; AChE, acetilcolinesterase; AcCoA, acetil-coenzima A; APC, célula apresentadora de antígeno; ChAT, colina acetil-transferase; CHT1, transportador de colina de alta afinidade; DAG, diacil glicerol; ER, retículo endoplasmático; ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1; IP3, inositol-1,4,5-trifosfato; mAChR, receptor muscarínico de ACh; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; MAPKK, quinase da MAPK; MHC II, complexo de Histocompatibilidade principal classe II; nAChR, receptor nicotínico de ACh; PIP2, fosfatidilinositol—4,5-bifosfato; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C; TCR, receptor de célula T (*Adaptado de KAWASHIMA & FUJII, 2003*).

3.3.3 Interação entre os sistemas colinérgicos neuronal e não-neuronal

Evidências da interação entre os sistemas colinérgicos neuronal e não-neuronal foram obtidas a partir de experimentos em que o bloqueio de certos componentes do sistema nervoso (hipotálamo dorsal ou hipófise, p.e.) afetavam também o sistema imune, indicando uma espécie de mecanismo concertado entre resposta neurológica e resposta imune. Gomes (2013) resume dessa forma:

“os sistemas imune e nervoso fornecem ferramentas de forma coordenada e independente no controle dos processos biológicos [...] apontando uma via de mão dupla através do reconhecimento de efetores celulares como citocinas, neurotransmissores e hormônios que podem ser detectados tanto por células do sistema imune quanto do sistema nervoso”. (GOMES, 2013)

Um agente principal na interação do sistema nervoso com o sistema imune é o nervo vago, apontado como mediador das respostas do sistema nervoso central (SNC) à presença de estímulos inflamatórios na circulação. O nervo vago, que se estende do tronco cerebral até os órgãos viscerais, é o responsável pela regulação dos movimentos cardíacos e gastrointestinais e, ao que as evidências indicam, pela regulação das respostas anti-inflamatórias, que ocorre por meio da ativação das fibras aferentes deste nervo por produtos inflamatórios (ZIMMER, 2006). A informação é então transmitida até o sistema nervoso, estimulando a produção de ACh pelo nervo vago eferente. A ACh passa a atuar como sinalizadora para a inibição da síntese e da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células de defesa do organismo, encerrando assim o processo inflamatório (PAVLOV et al., 2009).

3.4 Modelos experimentais com animais

Ferreira, Hochman e Barbosa (2005) definem os modelos experimentais em pesquisa como sendo “a materialização de uma parte da realidade, por meio da representação simples de uma ocorrência recente ou antiga”. Assim, um modelo experimental deve ser capaz de reproduzir o mais fidedignamente possível as condições às quais está se propondo. Para tal, precisa ser testado e comprovado previamente, de forma a apresentar uma precisão científica adequada. Além disso, é fundamental que se conheçam as suas limitações em relação à realidade que tenta representar (CBRA, 2014).

A utilização de animais em estudos sobre anatomia e fisiologia não é novidade para o homem: existem registros de que os povos babilônios e assírios já realizavam cirurgias em animais em datas tão longínquas quanto 2000 a.C. O grego Aristóteles (384-382 a.C), considerado o “pai da Biologia”, descreveu em seus tratados a dissecação de animais com fins de elucidar as diferenças internas entre as variadas espécies, mas foi Eraristratus (304-258 a.C.) quem de fato começou a desenvolver experimentos com animais vivos semelhantes aos modelos que utilizamos hoje em dia (ERICSSON, CRIM & FRANKLIN, 2013). A Antiguidade Clássica (séculos VIII a.C. a V d.C.) foi um período bastante fértil para a Medicina, com muito do funcionamento dos órgãos internos sendo elucidado a partir de

dissecações em animais e cadáveres humanos. Porém, as pesquisas científicas, sobretudo no que tange às práticas ligadas à dissecação animal, viriam a sofrer um baque violento e permanecer estagnadas por muitos anos durante o período conhecido como Idade Média (séculos V a XV), devido em grande parte a proibições de cunho eclesiástico. Com o fim da Inquisição medieval, a Humanidade veria ressurgir o interesse pelos modelos experimentais em Medicina, com pesquisadores como Andrea Versalius (1514-1564), fundador da anatomia moderna, com suas demonstrações públicas em cadáveres de cães e porcos. Daí em diante, muitas descobertas importantes foram sendo feitas, como por exemplo o trabalho de William Harvey (1578-1657) sobre os movimentos do coração e do sangue, ou o trabalho de Stephan Hayles, quem primeiro reportou a medida da pressão sanguínea (FRANCO, 2013).

A experimentação em animais, atualmente, é um ramo bem definido das ciências biológicas e farmacêuticas e conta com legislação e diretrizes éticas próprias para assegurar que os animais sejam mantidos em condições ideais, atendendo parâmetros sanitários e genéticos de qualidade que garantam o bem estar animal e a fidedignidade dos resultados. Ainda, os experimentos com animais devem ser meticulosamente planejados para obter-se dados relevantes utilizando o mínimo de animais possível (BROM, 2002). O descarte adequado do material biológico é outro fator que deve ser levado em conta no planejamento dos experimentos.

3.4.1 Modelos de DM em animais

A forma mais comumente utilizada para a indução de diabetes melito em modelos animais é a injeção parenteral única (intraperitoneal ou endovenosa) de substância química, geralmente estreptozotocina (STZ) ou aloxana, sendo que a dose necessária para exercer efeito diabetogênico varia conforme a rota de administração e a espécie e estado de nutrição do animal (SILVA et al., 2011). Outros mecanismos de indução incluem manipulação cirúrgica ou genética dos animais, sendo mais complicados e, por isso, menos utilizados (SHARMA et al., 2013). A maioria dos experimentos é realizada em roedores, devido à sua fisiologia propícia (o funcionamento dos seus órgãos internos assemelha-se bastante ao de seres humanos) e à grande quantidade de linhagens disponíveis atualmente.

O STZ (Figura 3) é um antibiótico obtido das bactérias *Streptomyces achromogenes* e é o único derivado conhecido da N-metil-N-nitrosuréia que ocorre naturalmente (SINGARAM, LAWRENCE & HORNEMAAN, 1978). Seu mecanismo de ação envolve a sua captação pelas células pancreáticas que contêm transportadores de glicose GLUT-2, seguida por uma alquilação do DNA celular e ativação da poli-ADP ribose sintetase, o que ocasiona uma diminuição rápida e potencialmente letal nos níveis de adenosina trifostato (ATP) das células pancreáticas, causando a destruição das células por necrose (DELFINO et al., 2002). Em ratos adultos, a dose mais utilizada é de 60 mg STZ/kg de rato, mas doses mais altas e mais baixas também são utilizadas.

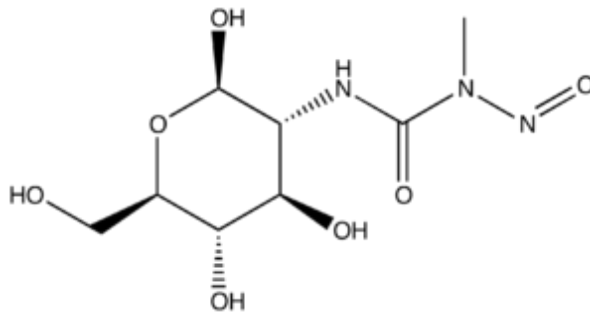


Figura 7 - Fórmula estrutural da estreptozotocina (C₁₈H₁₅N₃O₇)

3.5 Uso de plantas com fins medicinais

A fitoterapia é, certamente, uma das práticas medicinais mais antigas empregadas pela Humanidade. Logo que os primeiros hominídeos passaram a observar o comportamento dos outros animais e perceberam que mascar certas ervas ou comer raízes de determinadas plantas ajudava a amenizar sintomas de enxaqueca, gastrite, constipação e diversas outras aflições, surgiu uma prática milenar de estudo das propriedades medicinais das plantas e que viria, com o tempo, a evoluir de simples sabedoria popular para textos místicos mais elaborados, até adquirir caráter científico e firmar as bases para as ciências farmacêuticas atuais (FERREIRA et al., 2014). No entanto, apesar de anos de refinamento das práticas, os usos fitoterápicos mais primitivos - como o da velha receita de família para fazer chá de carqueja - convivem ainda lado a lado com aspectos mais sofisticados de

exploração dos recursos medicinais das plantas, como acontece nas indústrias milionárias especializadas em extrair princípios ativos de produtos naturais e vendê-los encapsulados (EL-ABHAR & SCHAALAN, 2014).

3.5.1 Os polifenóis

Os polifenóis são metabólitos naturais das plantas, caracterizados pela presença de vários grupos fenol em sua estrutura, geralmente derivados da L-fenilalanina. Dependendo do número de anéis fenólicos e dos elementos estruturais que mantêm estes anéis ligados, os polifenóis podem ser divididos em várias classes: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico), flavonoides, estilbenos e lignanas (GHARRAS, 2009). Os flavonoides constituem um grupo de moléculas bastante variado e podem ser divididos em flavonóis, flavonas, flavononas, isoflavonas e antocianidina (Figura 8).

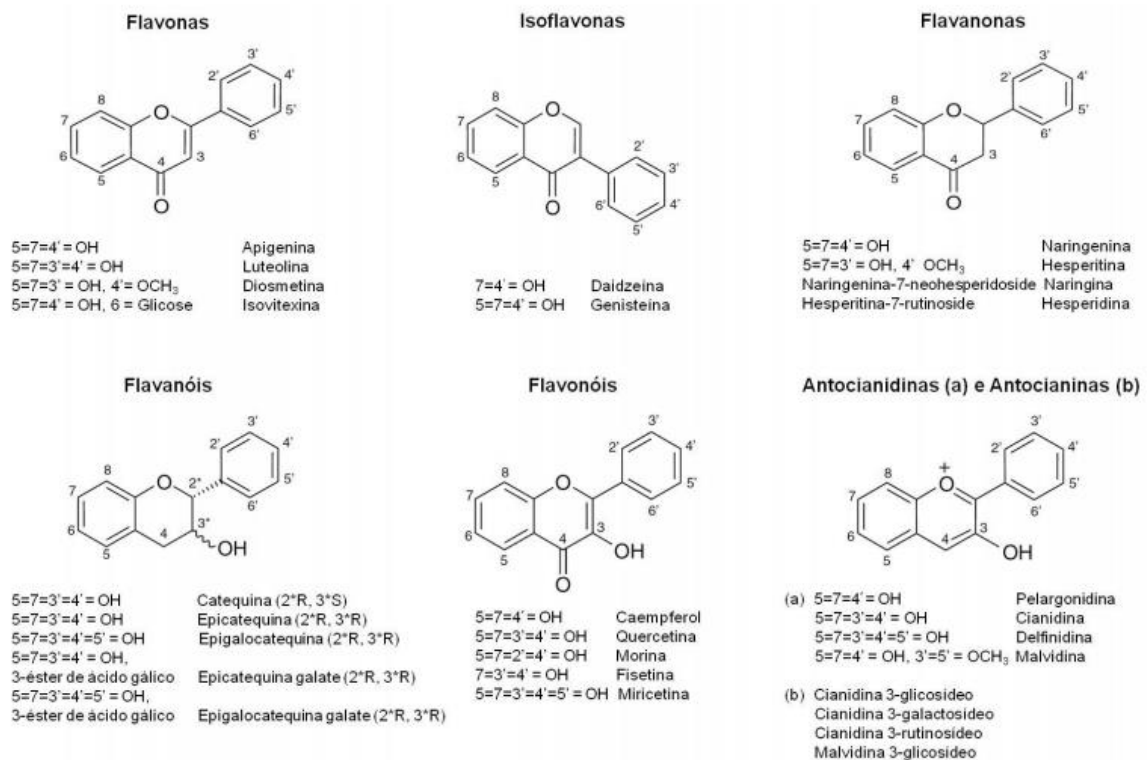


Figura 8 – Estrutura básica dos principais tipos de flavonoides. A posição dos anéis aromáticos e dos substituintes (geralmente hidroxilas) determina o tipo de flavonoide (Adaptado de BAHADORAN, MIRMIRAN & AZIZI, 2013).

As fontes mais comuns de polifenóis em nossa dieta são as frutas e bebidas como chás, vinho tinto e café, mas algumas verduras, leguminosas e cereais também possuem quantidades significativas desses compostos (ANHÊ et al., 2013). As plantas utilizam os polifenóis com fins de defesa contra micro-organismos e raios ultravioleta, ou como atrativos para insetos polinizadores (MANACH et al., 2005). Os polifenóis contribuem amplamente para as propriedades organolépticas (sabor, cor, aroma) dos alimentos, sendo por isso muito visados por *chefs* de cozinha e vinicultores em busca de diferentes características sensoriais para os seus produtos.

Os principais benefícios dos polifenóis para a nossa saúde dizem respeito às suas propriedades antioxidantes, por meio da captura de radicais livres, da diminuição da peroxidação lipídica e da inibição da produção de espécies reativas. Além do seu potencial antioxidante, também as atividades anticarcinogênicas e antiarterioescleróticas de alguns chás têm sido associadas à presença de compostos polifenólicos (BAHADORAN, MIRMIRAN & AZIZI, 2013). Outros autores também têm reportado atividade antimicrobiana, antiproliferativa, antineurodegenerativa e anti-inflamatória. Devido a essas características, os polifenóis têm sido estudados como alternativas para o tratamento de diversas patologias, entre elas: hipertensão, aterosclerose, fibromialgia, entre outras doenças (WILLIAMSON & MANACH, 2005).

3.5.2 A batata e as antocianinas

A batata (*Solanum tuberosum* L.), assim como outras plantas, acumula uma grande variedade de metabólitos secundários em seus tecidos, incluindo ácidos fenólicos, glicoalcaloides e antocianinas, que se concentram principalmente na casca do tubérculo e contribuem para a proteção da planta contra estresse biótico e abiótico (TAI et al., 2014). Em suas mais diversas variedades, a batata possui uma vasta aplicação culinária ao redor do mundo, devido às suas propriedades organolépticas e nutritivas. Friedman (1997) demonstrou, ainda, que o conteúdo polifenólico total das batatas sofre poucas alterações mesmo após o seu cozimento. A cor das batatas, sobretudo as roxas e vermelhas, é devido à presença de antocianinas em sua casca.

As antocianinas correspondem a um grupo de pigmentos polifenólicos naturais solúveis em água, responsáveis pelas cores vermelha, laranja brilhante,

roxa, rosa e azul escura de diversas frutas, vegetais e flores (IERI et al., 2011). A palavra “antocianina” é derivada das palavras gregas *anthos* (flor) e *kyanos* (azul). Sua importância biológica vai desde a proteção contra os raios-ultravioleta até a atração de insetos polinizadores (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Quimicamente, as antocianinas são compostos polifenólicos bastante instáveis, pertencentes à classe dos flavonoides (rever Figura 8). Sua estrutura básica consiste de uma antocianidina (ou aglicona) ligada a uma unidade de açúcar. As agliconas são estruturas formadas por um anel aromático ligado a um anel heterocíclico contendo oxigênio, o qual está ligado a um terceiro anel aromático por meio de uma ligação carbono-carbono (RAGHVENDRA, 2011). Em 1939, Pauling propôs que as cores intensas e variadas exibidas por estas moléculas seriam devidas aos efeitos de ressonância do íon flavílio que compõe as agliconas. As antocianinas são bastante dispersas na natureza, sendo que, atualmente, são conhecidas mais de 635 variantes dessa classe, que diferem entre si quanto ao número de grupos hidroxilados presentes na molécula de aglicona e quanto à natureza e ao número de açúcares ligados na estrutura, bem como dos carboxilatos alifáticos ou aromáticos ligados nestes (HE & GIUSTI, 2010).

3.5.3 O alecrim e o ácido rosmarínico

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., popularmente conhecida como alecrim, é uma planta de origem mediterrânea utilizada largamente como tempero culinário devido ao seu aroma forte e às suas propriedades antioxidantes, conservantes e antimicrobianas. Mais recentemente, estudos têm associado o alecrim e seus metabólitos com atividades antiviral, antimutagênica, antidiabetogênicas e anti-inflamatórias (ULBRICHT, et al., 2010). O teor de compostos fenólicos presentes no alecrim varia bastante conforme as condições ambientais, como a disponibilidade de água ou a exposição a altas temperaturas e raios-ultravioleta (BEGUM et al., 2013). Dentre os seus componentes, um dos que mais tem recebido destaque em pesquisas é o ácido rosmarínico.

O ácido rosmarínico (ou rosemárico) é um polifenol encontrado em diversas plantas das famílias Boraginaceae e Lamiaceae, mas também já foi reportado, em menores quantidades, nas plantas das famílias Blechnaceae, Zosteraceae, Potamogetonaceae, entre outras (JAYANTHY & SUBRAMANIAN, 2014). Está

presente em grande quantidade no alecrim, endro, manjerona, poejo, sálvia, orégano e outros (MUSHTAQ et al., 2014). Seu nome é originado do *Rosmarinus officinalis* (alecrim), a primeira planta da qual ele foi extraído e isolado, em 1958, pelos pesquisadores italianos Scarpati e Oriente.

Quimicamente, o ácido rosmarínico é um éster dos ácidos cafeico e 3,4-dihidroxifenil-lático, de fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_8$. Está registrado sobre o número CAS 20283-92-5 e sua nomenclatura oficial diverge, mas as mais aceitas são α -O-cafeoil-3,4-dihidroxifenil-lático, ácido α -[3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]-3,4-dihidroxi-benzenopropanóico ou ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-[3-(3,4-dihidroxifenil)-1-oxo-2-propeniloxi]-propanóico (AZEVEDO et al., 2011). Uma vez que possui um centro quiral, o ácido rosmarínico apresenta-se em duas formas enantioméricas distintas: a forma (R)(+) e a forma (S)(-), vide Figura 9.

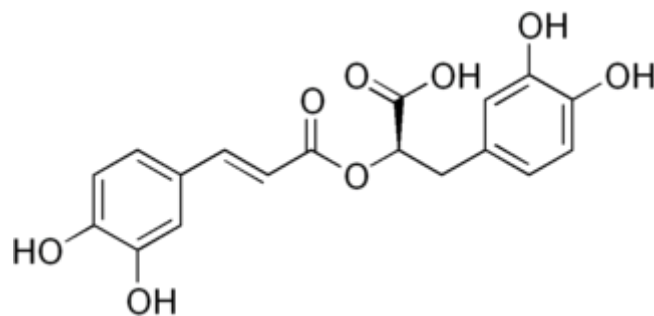


Figura 9 – Fórmula estrutural do ácido rosmarínico ($C_{18}H_{16}O_8$).

Assim, considerando o papel das enzimas regulatórias do sistema colinérgico na patologia do diabetes tipo 1, julga-se relevante estudar os efeitos de extratos ricos em ácido rosmarínico e antocianinas sobre estas enzimas em modelo de diabetes em ratos.

4. MANUSCRITO

Evaluation of the effects of potato and rosemary extracts on cholinesterases of type-1 diabetic rats

Eduardo José Machado Dutra^a, Naiara Stefanello^a, Jessié Gutierrez^a, Fabiano Carvalho^a, Lizielle Oliveira^a, Andréia Cardoso^a, Nadia Mulinacci^b, Vera Maria Melchior Morsch^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^{a*}.

^a Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi, Prédio 18, Sala 2208, 97105-900, Santa Maria

^b Department of Pharmaceutical Science, University of Florence, via Ugo Schiff 6, 50019 Sesto Fiorentino, (FI), Italy

* Corresponding author

Address correspondence and reprint requests to:

Maria Rosa Chitolina Schetinger (mariachitolina@gmail.com)

Tel: +55 (55) 3220-9557

Fax: +55 (55) 33208978

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is a disease characterized by the individual's inability to produce the hormone insulin due to destruction of pancreatic β -cells by the immune cells of the organism itself. So far, there is no 100% effective therapy for treating the symptoms of T1D. Current treatments involve constant monitoring of blood glucose levels and regular insulin injections. The inflammatory processes are associated with the development and progression of T1D. Thus, new therapies involving drugs with anti-inflammatory properties have been the subject of increasing interest in the scientific community. Polyphenols are a class of heterocyclic compounds that include anthocyanins and rosmarinic acid, both known for their antioxidant and anti-inflammatory properties. We studied the effects of two polyphenol rich extracts (cooked potato peel and rosemary) and a concentrate of anthocyanins in a model of type 1 streptozotocin-induced diabetic rats. The extracts were administered by gavage for 30 days. After this period, the rats were euthanized and we assessed acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and serum butyrylcholinesterase (BuChE) activity, because of the importance of these enzymes as biomarkers of inflammation. The activities of both enzymes were shown to be increased in diabetic rats compared to controls. The cooked potato peel extract and concentrated anthocyanins did not alter AChE activity in lymphocytes, probably due to low bioavailability, while rosemary extract was a potent inhibitor and reverted the activity to normal levels. None of the treatments had any effect on serum BuChE activity. These results support the involvement of inflammatory processes on T1D pathology and present the rosemary extracts as a promising alternative for future phytochemical therapies for the treatment of inflammatory-related diseases, such as type 1 diabetes.

Keywords: Cholinesterases; Diabetes; Lymphocytes; Potato; Rosemary

1 Introduction

According to the World Health Organization (WHO), in 2013 there were more than 345 million people with diabetes around the globe. By 2030, this number is expected to be over 550 million, making diabetes the seventh largest cause of mortality worldwide. In Brazil, a 2013 report made by the Brazilian Institute of Public Opinion and Statistics has revealed that there are more than 13.4 million diabetics in the nation and that this figure is rapidly rising (WHO, 2013).

Diabetes mellitus (DM) is a multifactor disease characterized by abnormal high levels of sugar in the blood, due to a deficiency in insulin secretion and/or an acquired resistance to this hormone (GILLESPIE, 2006). There are two main kinds of

diabetes: the insulin-dependent form (or type 1 diabetes) and the acquired form, also known as type 2 diabetes. Beside these two, there are also kinds of diabetes associated with other diseases, like pancreatitis, hemochromatosis and cystic fibrosis, or triggered by the use of certain drugs, like diuretics, corticoids, and beta adrenergic blocking agents. There is also a form of diabetes associated with gestation (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010).

Type 1 diabetes (T1D) is responsible for approximately 10 % of all registered cases worldwide, and affects mainly children and young adults. Its symptoms include increased thirst, frequent urination, extreme hunger, unintended weight loss, blurred vision, fatigue and weakness (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010). Its etiology is not entirely understood, but it is associated with a malfunction in the organism's natural immune response system, which leads to the destruction of the pancreatic β -cells responsible for the insulin production, in a cascade of autoimmune events that seem to be triggered by environmental changes (like viral infections) and is strongly tied to a genetic predisposition (PICCIRILLO et al., 2004).

The immunologic system is our body's own mechanism of defense against bacteria, virus, germen and toxins. It is generally divided in two parts: the innate defense system, like our skin, mucosa, gastric juice and non-specific macrophages; and the adaptive defense system, which involves the acquired immunity against specific targets and allows the body to protect itself against a pathogen that it has already been in contact before (PARKIN & COHEN, 2001). The main cells responsible for the specific recognition and destruction of pathogens are the leukocytes, which can be further divided in neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes and lymphocytes (DEMPSEY, VAIDYA & CHENG, 2003). A normal immune response begins when a pathogen infiltrates the organism, and is promptly "scanned" by B cells that recognize the antigens in it and start producing specific antibodies to mark the invaders. Then, the T helper lymphocytes (CD4+ cells) "read" these markings and release cytokines to recruit effector cells to deal with the pathogen. Among the recruited cells, are the cytotoxic lymphocytes (CD8+), which have the function to seek and destroy the abnormal or infected cells (BONILLA & OETTGEN, 2010).

Being a very important defense mechanism against pathogens, the inflammation process must be highly coordinated in order to prevent the occurrence of malfunctions (OLIVEIRA, 2009). In lymphocytes, the signaling molecule

acetylcholine (ACh) acts as an immunomodulator, by means of binding to T helper cells muscarinic receptors and mediating its action (KAWASHIMA & FUJII, 2003). Thus, the activities of acetylcholinesterase in lymphocytes and butyrylcholinesterase in serum are good indicatives of the occurrence of inflammation processes (FUJII, 2003).

Because of its autoimmune nature, research parties aiming to treat T1D are starting to include anti-inflammatory drugs on their trials, as a manner to minimize adverse effects and insulin-dependence. Some of the drugs that use anti-inflammatory approaches to treat diabetes currently on clinical trials are anakinra (LARSEN et al., 2007), atorvastatin (ARCA, M., 2007), simvastatin (ELDOR & RAZ, 2009), aldesleukin (HULME et al., 2012), salsalate (FLEISCHMAN et al., 2008) and diacerein (RAMOS-ZAVALA et al., 2011), among others. In addition, the well-known modulator of inflammatory processes and widely administered drug aspirin has been recommended by the American Diabetes Association as a secondary prevention strategy in patients with a history of vascular episodes (ADS, 2014).

Some of the current diabetes treatment involve phytochemicals - leaf and root teas being among the more common ones (CHANG et al., 2013). Plants possess many health-promoting properties. Fruits and vegetables containing polyphenolic compounds in their composition have been associated with a series of benefits, mainly as antioxidants, but also as antiproliferative, anticarcinogenic, antimicrobial, antineurodegenerative and anti-inflammatory (GHARRAS, 2009).

Thus, considering the role of inflammatory processes in type 1 diabetes progression and the importance of the cholinesterases on the regulation of these processes, this work aimed to study the effects of two extracts (potato and rosemary) containing natural anti-inflammatory polyphenols on the activities of enzymes acetylcholinesterase of lymphocytes and blood serum butyrylcholinesterase in a model of type 1 diabetes.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

Acetylthiocholine iodide (ASChI), butyrylthiocholine iodide (BuSChI), Percoll, tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie Brilliant Blue G, trizma and streptozotocin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Anthocyanins were purified from grape skin (AC-12-R-WS-P/10120/Gin:601412) and are commercially available by Christian Hansen A/S. All other reagents and solvents used in these experiments were obtained from commercial sources and were of analytical grade and of the highest purity available.

2.2 Animals

Adult male Wistar rats (70-90 days) weighing from 200 to 300 g were used in the experiments. The animals were obtained from the university's Central Animal House and were housed five to a cage on a natural 12 h day/night cycle at a constant temperature of 23 ± 1 °C, with free access to water and standard chow *at libitum*. All of the experimental protocols were performed in accordance with the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and in accordance with international guidelines for animal experimentation. This study was approved by the local Ethical Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) under the protocol number 23/2011.

2.3 Diabetes induction by streptozotocin

The experimental protocol for diabetes induction was performed according to Schmatz et al. (2011). Briefly, the animals were submitted to a single intraperitoneal injection of 55 mg/kg streptozotocin (STZ), diluted in 0.1 M sodium-citrate buffer pH 4.5. Controls received an equal volume of the sodium-citrate buffer only. For the next 24 h after induction, STZ-treated rats were given a 5 % glucose solution instead of

water, in order to prevent death due to hypoglycemic shock. The glucose levels were measured 48 h after STZ or vehicle injection using a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer-Mannheim, MO, USA). The animals with fasting glycemia over 250 mg/dL were considered diabetic and used for the present study.

2.4 Treatment with baked potato extract (BP), anthocyanins (AN) and rosemary extract acid (RE)

Two different cooked potato and two rosemary extracts were provided by Italian professor Nadia Mulinnacci, from the Department of Pharmaceutical Sciences of University of Florence. Their compositions, determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), are represented in Table 1 and Table 2, respectively. The extracts with the highest polyphenolic content were chosen for the treatment. Therefore, the animals were treated with extracts Pizzoli064 and Rosemary II. We added a third treatment group of pure anthocyanins to compare to the results of the total potato extract, as a mean to assess the role of anthocyanins in polyphenolic activity. Treatment doses of the extracts were selected based on the literature (LIONETTO et al., 2010; BAKIREL et al., 2007; KANG et al., 2013). Anthocyanins dose was selected in a way that it was equivalent to the amount of anthocyanins present in the cooked potato extract.

| Extract | Total polyphenols (µg/g) | Phenolic acids (µg/g) | Anthocyanins (µg/g) |
|-------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| Pizzoli 128 | 620.1 | 556.68 | 64.1 |
| Pizzoli 064 | 1620.1 | 1182.86 | 437.2 |

Table 2 - Composition of the rosemary extracts

| Extract | Total polyphenols
(% w/w) | Total terpenoids
(% w/w) | Total flavonoids
(% w/w) | Rosmarinic acid
(% w/w) |
|-------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Rosemary I | 5.57 | 3.49 | 1.28 | 0.8 |
| Rosemary II | 16.96 | 10.28 | 2.57 | 4.11 |

The animals were randomly divided into 8 groups with at least 5 rats per group: I - Control/Water; II - Control/Baked potato extract 50 mg/kg; Control/Anthocyanins 15 mg/kg; Control/Rosemary extract 25 mg/kg; Diabetic/Water; Diabetic/Baked potato extract 50 mg/kg; Diabetic/Anthocyanins 15 mg/kg and Diabetic/Rosemary extract 25 mg/kg. Two weeks after diabetes induction, we started treatment administration by gavage. All compounds were freshly prepared in distilled water and were administered once a day, between 2 and 4 p.m., during 30 days. Control animals received an equivalent volume of water instead. At the end of the treatment period, animals were anesthetized with halotan, and then their blood was collected from the still-beating heart, quickly followed by euthanasia. Structures were separated and kept in ice or frozen for posterior analysis.

2.5 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method as described by Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.6 Isolation of lymphocytes from blood

Lymphocytes were isolated from animal blood collected with EDTA, employing a Fycoll-Hypaque gradient, as described by Böyum (1968). About 4 mL of whole blood were used for the cells isolation.

2.7 Acetylcholinesterase activity in lymphocytes

The AChE activity was determined according to the method described by Ellman et al. (1961), modified by Fitzgerald and Costa (1993). Briefly, 0.2 mL of intact cells were added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine (AcSCh), 0.1 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) and 0.1 M phosphate buffer pH 8.0. The absorbance was read at 412 nm, immediately before and after 30 min of incubation, in a SpectramaxPlux 340 microplate reader. AChE activity was expressed as the number of AcSCh μ mols hydrolyzed in an hour per milligram of protein.

2.8 Butyrylcholinesterase activity in blood serum

BuChE activity in serum was determined by the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) adapted to microplates. The reaction mixture (300 μ L final volume) contained 100 mM phosphate buffer pH 7.5 and 1.0 mM DTNB. Reaction was started by adding 0.8 mM butyrylthiocholine substrate. The method is based on the formation of the yellow anion thionitrobenzoate, which can be measured photometrically at 420 nm. The absorbance was read during 2 min of incubation at 37 °C and the BuChE activity was expressed as μ mol BuSCh/h/mg protein.

2.9 Statistical analysis

The statistical method employed was one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple-comparison test. Values of $P < 0.05$ were considered representative of statistical significance among the data. All data were analyzed by commercial software GraphPad Prism 5.0 and were expressed as mean \pm S.D.

3 Results and discussion

3.1 Efficacy of STZ-diabetes induction

During treatment, signs of polyuria were observed in all diabetic animals' boxes, along with increased thirst and hunger. It wasn't noticed any abnormal aggressive behavior by any of the subjects. In general, rats from diabetic groups seemed more physically debilitated and lost more weight (see Table 3), in comparison to the control groups, which looked healthier and gained weight as expected. Aside from two rats of the Diabetic/H₂O box, all other diabetic animals kept their fasting glycemia over 250 mg/dL, while control groups were below 200 mg/dL. We consider loss of weight and elevated blood glucose, as well increased thirst, polyuria and hunger, as being indicatives that diabetes induction worked well.

Table 3 – Animal's weights and glycemia at last day of treatment

| Group | Weight
(g) | Glycemia
(mg/dL) | Group | Weight
(g) | Glycemia
(mg/dL) |
|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------|---------------------|
| CT/H ₂ O | 359.2 ± 32 | 150.3 ± 15 | DB/H ₂ O | 278.1 ± 36 | 411.8 ± 92 |
| CT/BP
50 mg/kg | 367.0 ± 37 | 155.8 ± 13 | DB/BP
50 mg/kg | 267.3 ± 35 | 475.0 ± 26 |
| CT/AN
15 mg/kg | 379.4 ± 54 | 136.4 ± 21 | DB/AN
15 mg/kg | 252.5 ± 35 | 484.0 ± 71 |
| CT/RO
25 mg/kg | 344.0 ± 31 | 164.6 ± 33 | DB/RO
25 mg/kg | 269.4 ± 40 | 425.1 ± 76 |

3.2 Acetylcholinesterase activity in lymphocytes

Figure 1 shows that the acetylcholinesterase activity in lymphocytes is increased in diabetic rats (19.8 ± 4.4), in comparison to the control group (10.6 ± 4.7), indicating that an inflammatory process is probably taking place, which could contribute to the progression of the autoimmune condition that characterizes type 1

diabetes. While treatment with cooked potato extract (1a) and concentrated anthocyanins (1b) were not particularly good at inhibiting AChE activity in lymphocytes of diabetic rats, the rosemary extract (1c) was capable of bringing down AChE activity in diabetic rats back to normal levels (10.7 ± 4.2). These results are in agreement with previous reports of rosemary extract being a potent anti-inflammatory agent (TAKAKI et al., 2008; JUHÁS, S. et al., 2008). In addition, *Rosmarinus officinalis* anti-inflammation properties have been linked to the presence of rosmarinic acid (RA) on its extract (BOONYARIKPUNCHAI, SUKRONG & TOWIWAT, 2014). In this report, we suggest that RA anti-inflammatory activity might be due to its inhibition of the AChE enzyme in lymphocytes.

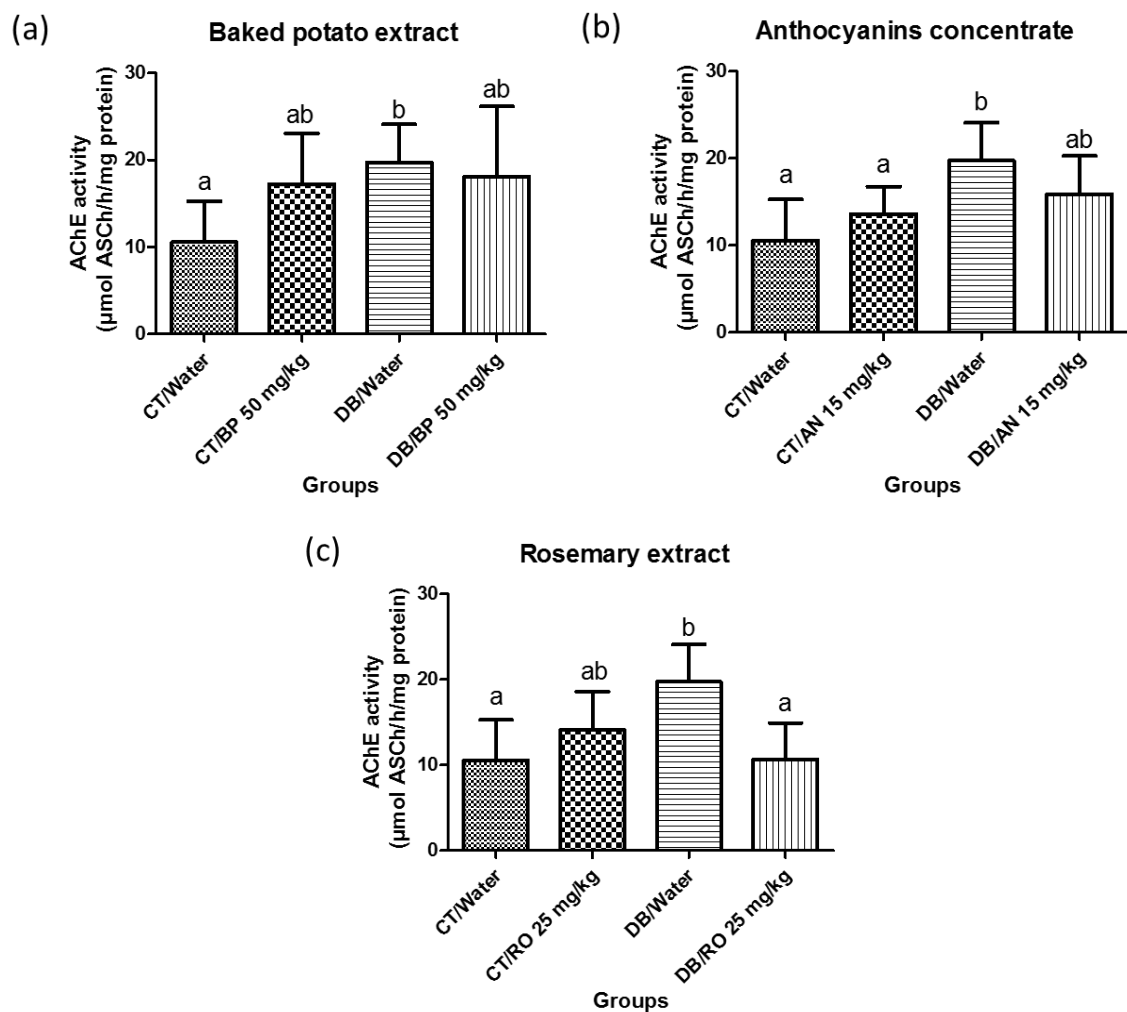


Figure 1 – Acetylcholinesterase activity in lymphocytes of rats treated with (a) baked potato extract 50 mg/kg, (b) anthocyanins concentrate 15 mg/kg and (c) rosemary

extract 25 mg/kg. Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$). Results are expressed as mean \pm SD.

On the other hand, the cooked potato extract (1a) and the purified anthocyanins (1b) did not show great potential as cholinesterase inhibitors in lymphocytes or blood serum, despite of anthocyanins' previously reported inhibition of brain AChE by our group (GUTIERRES et al., 2013) and others (PERVIN et al., 2014; MAEDA-YAMAMOTO et al., 2012). It seems that, as suggested by Fernandes et al. (2014), anthocyanins might not have a good bioavailability in blood as they have in brain. Talavéra et al. (2005) demonstrated that anthocyanins are readily absorbed by the organism but excreted almost as fast, while Kalt et al. (2008) found that some of it can be accumulated in liver, eyes, cortex and cerebellum of pigs, though none could be detected in plasma or urine. Therefore, we think that the low bioavailability of anthocyanins on lymphocytes and blood serum might explain why it was not able to inhibit AChE activity in these structures as well as it does in brain. However, further experiments must be performed in order to assess the truth on this matter, as the cause remains unclear

3.3 Butyrylcholinesterase activity in blood serum

The butyrylcholinesterase activity in blood serum was also elevated in diabetic rats when compared to the control group, as shown in **Figure 2**. These findings support the role of ACh as an anti-inflammatory signaling molecule and of BuChE as an interesting marker of systemic inflammation, as previously proposed by Abbott et al. (1993) and reinforced by Das (2012). However, neither treatment tested in this experiment was able to revert this condition, indicating that these polyphenols could interact more specifically with the AChE enzyme than with BuChE. Another hypothesis, as discussed on previous topic, is that these compounds may not be as much available in blood. Further experiments shall aim to elucidate this matter.

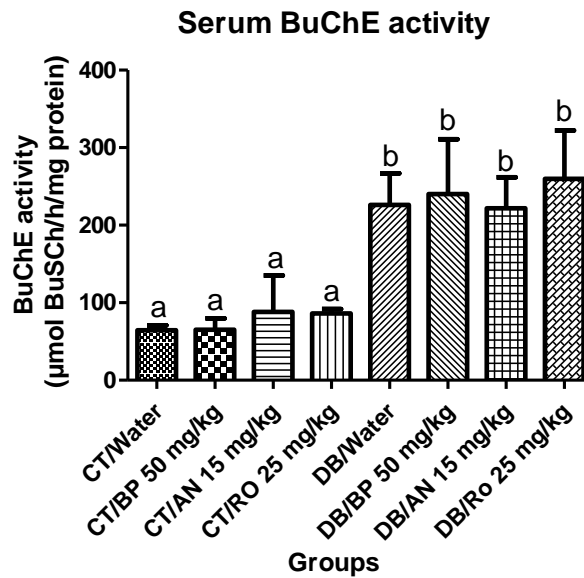


Figure 2 – Butyrylcholinesterase activity in blood serum of rats treated with 50 mg/kg baked potato (BP) and 25 mg/kg rosemary (RO) extracts and with a concentrate of 15 mg/kg anthocyanins (AN). Different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$). Results are expressed as mean \pm SD.

4 Conclusion

We conclude that rosemary extract from *Rosmarinus officinalis* has the potential to inhibit acetylcholinesterase activity in lymphocytes, even in a low-medium dose. These results add to previous works of our group about the beneficial properties of *R. officinalis*, which have shown that rosmarinic acid was able to prevent lipid peroxidation and oxidative damage in the brain of diabetic rats, by inhibiting brain AChE (MUSHTAQ et al., 2014). Combining anti-inflammatory and anti-oxidant properties, rosemary extract could be used as a complementary therapy for the treatment of type 1 diabetes, as well as other autoimmune and chronic inflammation-related diseases.

Future studies regarding anthocyanins should assess the matter of their bioavailability, as it appears to be a limiting agent of their beneficial properties. In addition, *in vitro* studies offering insight on these compounds stability as well as cholinesterases activities from other tissues might be of great value on solving the puzzle of anthocyanins.

ACKNOWLEDGMENTS

The researchers declare no conflict of interest on this report. We also acknowledge the support of Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for this project by awarding research funds and fellowships.

REFERENCES

ABBOTT, C. A.; MACKNESS, M.; KUMAR, S.; OLUKOJA, A. O.; GORDON, C.; ARROL, S.; BHATNAGAR, D.; BOULTON, A. J.; DURRINGTON, P. N. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. **Clin. Sci. (Lond.)**. vol. 85, p. 77-81, 1993.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADS). Aspirin therapy in diabetes. **Diabetes Care**. vol. 27(S1), p. S72-S73, 2004.

ARCA, M. Arorvastatin efficacy in the prevention of cardiovascular events in patients with diabetes mellitus and/or metabolic syndrome. **Drugs**. vol. 67(1), p. 43-54, 2007.

BAKIREL, T.; BAKIREL, U.; KELES, O. U.; ÜLGEN, S. G.; YARDIBI, H. In vivo assessment of anti-diabetic and antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rats. **J. Ethno-Parmacol.** vol. 116, p. 64-73, 2008.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**. vol. 464, p. 1293-1300, 2010.

BOONYARIKPUNCHAI, W.; SUKRONG, S.; TOWIWAT, P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. **Pharmacol. Biochem. Behav.** vol. 124, p. 67-73, 2014.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **J. Allergy Clin. Immunol.** vol. 125(2), p. 33-40, 2010.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of nuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.** vol. 97, p. 77-89, 1968.

DAN, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. **Ann. Hepatol.** vol. 11(3), p. 409-411, 2012.

DEMPSEY, P. W.; VAIDYA, S. A.; CHENG, G. *The art of war: Innate and adaptive immune responses.* **Cell. Mol. Life Sci.** vol. 60, p. 26-04-2621, 2003.

ELDOR, R.; RAZ, I. American diabetes association indications for statins in diabetes: is there evidence? **Diabetes Care.** vol. 32(2), p. 384-391, 2009.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** vol. 7, p. 88-95, 1961.

FERNANDES, I.; FARIA, A.; CALHAU, C.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **J. Funct. Foods.** vol. 7, p. 54-66, 2014.

FITZGERALD, B. B.; COSTA, L. G. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. **Fund. Appl. Toxicol.** vol. 20, p. 210-216, 1993.

FLEISCHMAN, A.; SHOELSON, S. E.; BERNIER, R.; GOLDFINE, A. B. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. **Diabetes Care.** vol. 31, p. 289–294, 2008.

FUJII, T.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, K.; KAWASHIMA, K. Expression of acetylcholine in lymphocytes and modulation of an independent lymphocytic cholinergic activity by immunological stimulation. **Biogenic Amines.** vol. 17, p. 373-386, 2003.

GHARRAS, H. L. Polyphenols – food sources, properties and applications: a review. **Int. J. Food Sci. Technol.** vol. 44, p. 2512-2518, 2009.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ.** vol. 175(2), p. 165-170, 2006.

GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; SCHETINGER, M. R. C.; AGOSTINHO, P.; MARISCO, P. C.; VIEIRA, J. M.; ROSA, M. M.; BOHNERT, C.; RUBIN, M. A.; MORSCH, V. M.; SPANEVELLO, R.; MAZZANTI, C. M. Neuroprotective effect of

anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. **Int. J. Devl. Neuroscience.** vol. 33, p. 88-97, 2014.

HULME, M. A.; WASSERFALL, C. H.; ATKINSON, M. A.; BRUSKO, T. M. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. **Diabetes.** vol. 61(1), p. 14-22, 2012.

JUHÁS, S.; BUKOVSKÁ, A.; CIKOS, S.; CZIKKOVÁ, S.; FABIAN, D.; KOPPEL, J. Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice. **Acta Vet. BRNO.** vol. 78, p. 121-127, 2009.

KALT, W.; BLUMBERG, J. B.; MCDONALD, J. E., VINQVIST-TYMCHUK, M. R.; FILLMORE, S. A. E.; GRAF, B. A. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **J. Agric. Food Chem.** vol. 56, p. 705–712, 2008.

KANG, M.; LIM, S. S.; LEE, J.; YEO, K. M.; KANG, Y. Anthocyanins-rich purple corn extract inhibit diabetes-associated glomerular angiogenesis. **PLoS ONE.** vol. 8(11), p. 1-5, 2013.

KAWASHIMA, K; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences.** vol. 74, p. 675-696, 2003.

LARSEN, C. M.; FAULENBACH, M.; VAAG, A.; VOLUND, A.; EHSES, J. A.; SEIFERT, B.; MANDRUP-POULSEN, T.; DONATH, M. Y. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** vol. 356, p. 1517-1526, 2007.

LER SAÚDE. **Diabetes.** Disponível em: < <http://www.lersaude.com.br/>>. São Paulo, 2014. Acesso em 18 out. 2014.

LIONETTO, M. G.; GIORDANO, M. E.; CALISI, A.; ERROI, E.; DE NUCCIO, F.; SCHETTINO, T. Effect of the daily ingestion of a purified anthocyanin extract from grape skin on rat serum antioxidant capacity. **Physiol. Res.** vol. 60, p. 637-645, 2011.

MAEDA-YAMAMOTO, M.; SAITO, T.; NESUMI, A.; TOKUDA, Y.; EMA, K.; HONMA, D.; OQINO, A.; MONOBE, M.; MURAKAMI, A.; TACHIBANA, H.; Chemical analysis and acetylcholinesterase inhibitory effect of anthocyanin-rich red leaf tea (cv. Sunrouge). **J. Sci. Food Agric.** vol. 92(11), p. 2379-2386, 2012.

MUSHTAQ, N.; SCHMATZ, R.; PEREIRA, L. B.; AHMAD, M.; STEFANELLO, N.; VIEIRA, J. M.; ABDALLA, F.; RODRIGUES, M. V.; BALDISSARELLI, J.; PELINSON,

L. P.; DALENOGARE, D. P.; REICHERT, K. P.; DUTRA, E. J. M.; MULINACCI, N.; INNOCENTI, M.; BELLUMORI, M.; MORSCH, V. M. M.; SCHETINGER, M. R. C. Rosmarinic acid prevent lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem. Funct.** vol. 32(3), p. 287-293, 2014.

OLIVEIRA, P. A. G. **Expressão de factores colinérgicos em monócitos/macrófagos na inflamação.** 2009. 43 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular Humana) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet.** vol. 357, p. 1777-1789, 2001.

PERVIN, M.; HASNAT, A.; LEE, Y. M.; KIM, D. H.; JO, J. E.; LIM, B. O. Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of Grape Skin Anthocyanin (GSA). **Molecules.** vol. 19, p. 9403-9418, 2014.

PICCIRILLO, L. J.; GONÇALVES, M. F. R.; CLEMENTE, E. L. S.; GOMES, M. B. Marcadores de inflamação em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** vol. 48(2), p. 253-260, 2004.

RAMOS-ZAVALA, M. G.; GONZÁLEZ-ORTIZ, M.; MARTÍNEZ-ABUNDIS, E.; ROBLES-CERVANTES, J. A.; GONZÁLEZ-LOPEZ, R.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, N. J. Effect of diacerein on insulin secretion and metabolic control in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. **Diabetes Care.** vol. 34, p. 1591–1594, 2011.

SCHMATZ, R.; PEREIRA, L. B.; STEFANELLO, N.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; GUTIERRES, J.; BATANI, M.; MARTINS, C. C.; ABDALLA, F. H.; SERRES, J. D. S.; ZANINI, D.; VIEIRA, J. M.; CARDOSO, A. M.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie.** vol. 30, p. 1-10, 2011.

TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L. E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S. M.; DINIZ, S. P.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **J. Med. Food.** vol. 11(4), p. 741-746, 2008.

TALAVÉRA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISON, J. L. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney and brain. **J. Agric. Food Chem.** vol. 53, p. 3902-3908, 2005.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho vem a somar com outras pesquisas que evidenciam a existência de processos inflamatórios na patologia do diabetes melito tipo 1 (DMT1) e apresenta o extrato de alecrim como um possível complemento secundário para novas terapias fitoquímicas anti-inflamatórias.

Em nossos experimentos, o extrato de alecrim mostrou-se um potente inibidor da enzima acetilcolinesterase de linfócitos. No entanto, o outro extrato polifenólico testado (batata) não foi bem sucedido em alterar a atividade da AChE nessas células, embora trabalhos anteriores do nosso grupo já tenham demonstrado a inibição da AChE em cérebro de ratos pelas antocianinas. Neste relato, discutimos a possibilidade dessa discrepância entre as atividades em cérebro e em linfócitos ser devido à baixa biodisponibilidade destes compostos no sangue, enquanto já foi demonstrado que eles podem se acumular em estruturas cerebrais. Mais testes nesse sentido precisam ser realizados para melhor elucidar esta questão.

Para trabalhos futuros, sugerimos ainda que sejam estudados os efeitos destes extratos sobre outros biomarcadores de inflamação, sobre o estresse oxidativo e sobre a peroxidação lipídica de outras estruturas afetadas pelo diabetes, como fígado, rins e sistema nervoso central. Ainda, testes *in vitro* para verificar a estabilidade das antocianinas sob diversas condições pode fornecer respostas importantes sobre a sua biodisponibilidade em diferentes estruturas do organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Front. Biol.** vol. 6, p. 274-281, 2011.

ANHÊ, F. F.; DESJARDINS, Y.; PILON, G.; DUDONNÉ, S.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; MARETTE, A. Polyphenols and type 2 diabetes: a prospective review. **PharmaNutrition.** vol. 1(4), p. 105-114, 2013.

ANWAR, J.; SPANEVELLO, R. M.; THOMÉ, G.; STEFANELLO, N.; SCHMATZ, R.; GUTIERRES, J.; VIEIRA, J.; BALDISSARELLI, J.; CARVALHO, F. B.; DA ROSA, M. M.; RUBIN, M. A.; FIORENZA, A.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R.C. Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** vol. 103, p. 386-394, 2012.

ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** vol. 2, p. 1-18, 2012.

AZEVEDO, M. F.; LIMA, C. F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; ALMEIDA, M. J.; WILSON, J. M.; PEREIRA-WILSON, C. Rosmarinic acid, major phenolic constituent of Greek sage herbal tea, modulates rat intestinal SGLT1 levels with effect on blood glucose. **Mol. Nutr. Food Res.** vol. 55, p. 15-25, 2011.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders.** vol. 12, p. 1-9, 2013.

BAUMANN, B.; SALEM, H. H.; BOEHM, B. O. Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes. **Curr. Diab. Rep.** vol. 12, p. 499-509, 2012.

BEGUM, A.; SANDHYA, S.; ALI, S. S.; VINOD, K. R.; REDDY, S.; BANJI, D. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta Sci. Pol.** vol. 12(1), p. 61-73, 2013.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature.** vol. 464, p. 1293-1300, 2010.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **J. Allergy Clin. Immunol.** vol. 125(2), p. 33-40, 2010.

BOURNE, Y.; TAYLOR, P.; RADIC, Z.; MARCHOT, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase anionic peripheral site. **EMBO J.** vol. 22(1), p. 1-12, 2003.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of nuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.** vol. 97, p. 77-89, 1968.

BROM, F. W. A. Science and society: different bioethical approaches towards animal experimentation. **ALTEX.** vol. 19, p. 78-82, 2002

BURGOYNE, F. H. The pathology of diabetes mellitus. **Canad. M. A. J.** vol. 84, p. 1415-1417, 1961.

CALIFORNIA BIOMEDICAL RESEARCH ASSOCIATION (CBRA). **Why are animals necessary in biomedical research?** Disponível em: < <http://ca-biomed.org/>>. California, 2014. Acessado em: 20 Ago. 2014.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.D.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food. Chem.** vol. 113, p. 859-871, 2009.

CHAPLIN, D. D. Overview of the human immune response. **J. Allergy Clin. Immunol.** vol. 117(2), p. 430-435, 2006.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet.** vol. 307, p. 847-858, 2006.

DARVESH, S.; HOPKINS, D. A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Rev. Neurosci.** vol. 4, p. 131-138, 2003.

DELFINO, V. D. A.; FIGUEIREDO, J. F.; MATSUO, T.; FAVERO, M. A.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J. Bras. Nefrol.** vol. 24(1), p. 31-36, 2002.

DEMPSEY, P. W.; VAIDYA, S. A.; CHENG, G. *The art of war: Innate and adaptive immune responses*. **Cell. Mol. Life Sci.** vol. 60, p. 26-04-2621, 2003.

DUTRA, E. J. M. **Avaliação *in vitro* de novos compostos pirimidínicos como potenciais inibidores colinesterásicos**. 2013. 55 p. Monografia (Graduação em Química Bacharelado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

EL-ABHAR, H. S.; SCHAALAN, M. F. Phytotherapy in diabetes: review on potential mechanistic perspectives. **World J. Diabetes.** vol. 5(2), p. 176-197, 2014.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** vol. 7, p. 88-95, 1961.

ERICSSON, A. C.; CRIM, M. J.; FRANKLIN, C. L. A brief history of animal modeling. **Mo. Med.** vol. 103, p. 201-205, 2013.

FAIDEAU, B.; LARGER, E.; LEPAULT, F.; CAREL, J. C.; BOITARD, C. Role of β -cells in type 1 diabetes pathogenesis. **Diabetes.** vol. 54(2), p. 87-96, 2005.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta. Cirurg. Bras.** vol. 20(2), 28-34, 2005.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA Jr, W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Rev. Bras. Pl. Med.** vol. 16(2), p. 290-298, 2014.

FITZGERALD, B. B.; COSTA, L. G. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. **Fund. Appl. Toxicol.** vol. 20, p. 210-216, 1993.

FRANCO, N. H. Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. **Animals.** vol. 3, p. 238-273, 2013.

FRIEDMAN, M. Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. **J. Agric. Food Chem.** vol. 54, p. 8655-8681, 2006.

FUJII, T.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, K.; KAWASHIMA, K. Expression of acetylcholine in lymphocytes and modulation of an independent lymphocytic

cholinergic activity by immunological stimulation. **Biogenic Amines**. vol. 17, p. 373-386, 2003.

GHARRAS, H. L. Polyphenols – food sources, properties and applications: a review. **Int. J. Food Sci. Technol.** vol. 44, p. 2512-2518, 2009.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ**. vol. 175(2), p. 165-170, 2006.

GOMES, P. S. **Efeito dos estímulos adrenérgico e colinérgico na produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e fagocitose por granulócitos de pacientes diabéticos do tipo 2**. 2013. 52 p. Dissertação (Mestrado em Biomedicina) – Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 2013.

HE, J.; GIUSTI, M. M.; Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** vol. 1, p. 163-187, 2010.

IERI, F.; INNOCENTI, M.; ANDRENELLI, L.; VECCHIO, V.; MULINACCI, N. Rapid HPLC/DAD/MS method to determine phenolic acids, glycoalkaloids and anthocyanins in pigmented potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and correlations with variety and geographical origin. **Food Chem.** vol. 125, p. 750-759, 2011.

JAIQUES, J. A. S.; REZER, J. F. P.; RUCHEL, J. B.; GUTIERRES, J.; BAIRROS, A. V.; FARIAS, I. L. G.; DA LUZ, S. C. A.; BERTONCHELI, C. M.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LEAL, D. B. R. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. **Anal. Biochem.**, vol. 410, p. 34-39, 2011.

JAYANTHY, G.; SUBRAMANIAN, S. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet – STZ induced experimental diabetes mellitus. **Biomed. Prev. Nutri.** vol. 4, p. 431-437, 2014.

KAWASHIMA, K; FUJII, T. Extraneural cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacol. Therap.** vol. 86, p. 29-48, 2000.

KAWASHIMA, K; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**. vol. 74, p. 675-696, 2003.

KARUNAKARAN, U.; PARK, K. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. **Diabetes Metab. J.** vol. 37, p. 106-112, 2013.

KEANEY, J. F.; LOSCALZO, J. Diabetes, oxidative stress and platelet activation. **Circulation.** vol. 99, p. 189-191, 1999.

KONTOGIANNI, V. G.; TOMIC, G.; NIKOLIC, I.; NERANTZAKI, A. A.; SAYYAD, N.; STOSIC-GRUJICIC, S.; STOJANOVIC, I.; GEROTHANASSIS, I. P.; TZAKOS, A. G. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. **Food Chem.** vol. 136, p. 120-129, 2013.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 available studies. **Am. J. Clin. Nutr.** vol. 81(1), p. 2305-2425, 2005.

MULINACCI, M.; IERI, F.; GIACCHERINI, C.; INNOCENTI, M.; ANDRENELLI, L.; CANOVA, G.; SARACCHI, M.; CASIRAGHI, M. C. Effect of cooking on the anthocyanins, phenolic acids, glycoalkaloids, and resistant starch content in two pigmented cultivars of *Solanum Tuberosum* L. **J. Agric. Food Chem.** vol. 56, p. 11830-11837, 2008.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Front. Immunol.** vol. 3, p. 1-2, 2012.

MUSHTAQ, N.; SCHMATZ, R.; PEREIRA, L. B.; AHMAD, M.; STEFANELLO, N.; VIEIRA, J. M.; ABDALLA, F.; RODRIGUES, M. V.; BALDISSARELLI, J.; PELINSON, L. P.; DALENOGARE, D. P.; REICHERT, K. P.; DUTRA, E. J. M.; MULINACCI, N.; INNOCENTI, M.; BELLUMORI, M.; MORSCH, V. M. M.; SCHETINGER, M. R. C. Rosmarinic acid prevent lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem. Funct.** vol. 32(3), p. 287-293, 2014.

NGUYEN, Q. T.; THOMAS, K. T.; LYONS, K. B.; NGUYEN, L. D.; PLODKOWSKI, R. A. Current therapies and emerging drugs in the pipeline for type 2 diabetes. **Am. Health Drug Benefits.** vol. 4(5), p. 303-311, 2011.

OLIVEIRA, P. A. G. **Expressão de factores colinérgicos em monócitos/macrófagos na inflamação.** 2009. 43 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular Humana) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**. vol. 357, p. 1777-1789, 2001.

PAVLOV, V. A.; PARRISH, W. R.; ROSAS-BALLINA, M.; OCHANI, M.; PUERTA, M.; OCHANI, K.; CHAVAN, S.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K. J. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain Behav. Immun.** vol. 23, p. 42-45, 2009.

PICCIRILLO, L. J.; GONÇALVES, M. F. R.; CLEMENTE, E. L. S.; GOMES, M. B. Marcadores de inflamação em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** vol. 48(2), p. 253-260, 2004.

PINTO, B. S. A. N. **Sistema imunitário**. Mora, 2011. Disponível em: <<http://biologicamentefalando.blog.com/>> Acesso em: 22 out. 2014.

RAGHVENDRA; SHARMA, V. SHAKYA, A.; HEDAYTULLAH, M. D.; ARYA, G. S.; MISHRA, A.; GUPTA, A. D.; PACHPUTE, A. P.; PATEL, D. Chemical and potential aspects of anthocyanins – a water-soluble vacuolar flavonoid pigments: a review. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.** vol. 6(1), p. 28-33, 2011.

ROCHA, F. D.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C. *Diabetes mellitus* e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Rev. Bras. Farm.** vol. 87(2), p. 49-54, 2006.

SANTARPIA, L.; GRANDONE, I.; CONTALDO, F.; PASANISI, F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. **J. Cachexia Sarcopenia Muscle**. vol. 4(1), p. 31-39, 2013.

SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarínico (dal *Rosmarinus off.*). **Ric. Sci.**, vol. 28, p. 2329-2333, 1958.

SCHALKWIJK, C. G.; POLAND, D. C. W.; VAN DJIK, W.; KOK, A.; EMEIS, J. J.; DRÄGER, A. M.; DONI, A.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; STEHOUER, C. D. A. Plasma concentration of C-reactive protein is increased in Type I diabetic patients without clinical macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation. **Diabetologia**. vol. 42, p. 351-357, 1999.

SCHMATZ, R.; PEREIRA, L. B.; STEFANELLO, N.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; GUTIERRES, J.; BATANI, M.; MARTINS, C. C.; ABDALLA, F. H.;

SERRES, J. D. S.; ZANINI, D.; VIEIRA, J. M.; CARDOSO, A. M.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**. vol. 30, p. 1-10, 2011.

SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; DA ROSA, M. M.; RUBIN, M. A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. vol. 610, p. 42-48, 2009.

SERRES, J. D. S. **Avaliação, *in vitro*, dos parâmetros cinéticos da enzima acetilcolinesterase cerebral de ratos frente a alguns compostos azóis**. 2011. 89 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SHARMA, R.; DAVE, V.; SHARMA, S.; JAIN, P.; YADAV, S. Experimental models on diabetes: a comprehensive review. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**. vol. 4, p. 1-8, 2013.

SILVA, M.; DE LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** vol. 55(1), p. 46-53, 2011.

SINGARAM, S.; LAWRENCE, R. S.; HORNEMAAN, U. Studies on the biosynthesis of the antibiotic streptozotocin (streptozocin) by *Streptomyces achromogenes* var. *streptozoticus*. **J. Antibiot.** vol. 32(4), p. 379-385, 1978.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico de diabetes**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>>. Acesso em 22 nov. 2014.

TAI, H. H.; WORALL, K.; PELLETIER, Y.; DE KOEYER, D; CALHOUN, L. A. Comparative metabolite profiling of *Solanum tuberosum* against six wild *Solanum* species with Colorado potato beetle resistance. **J. Agric. Food Chem.** vol. 62(36), p. 9043-9055, 2014.

TAYLOR, P. The cholinesterases. **J. Biol. Chem.** vol. 266, p. 4025-4028, 1991.

TONIN, A. A. **Componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico nos processos inflamatórios e neurológicos em roedores infectados**

experimentalmente com *Toxoplasma gondii*. 2014. 179 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

ULBRICHT, C.; ABRAMS, T. R.; BRIGHAM, A.; CEURVELS, J.; CLUBB, J.; CURTISS, W.; KIRKWOOD, C. D.; GIESE, N.; HOEHN, K.; IOVIN, R.; ISAAC, R.; RUSIE, E.; SERRANO, J. M.; VARQHESE, M.; WEISSNER, W.; WINDSOR, R. C. An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. **J. Diet. Suppl.** vol. 7(4), p. 351-423, 2010.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 available studies. **Am. J. Clin. Nutr.** vol. 81(1S), p. 243S-255S, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Facts sheets nº 312**. Suíça, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/>>. Acesso em 27 nov. 2014.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M.G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol. Rev.** vol. 91, p. 79-118, 2011.

ZIMMER, H. Otto Loewi and the chemical transmission of vagus stimulation in the heart. **Clin. Cardiol.** vol. 29, p. 135-136, 2006.