

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

**EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE
LINGONBERRY SOBRE O SISTEMA PURINÉRGICO
E ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO
DE RATOS DIABÉTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Karine Paula Reichert

Santa Maria, RS, Brasil

2015

EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *LINGONBERRY* SOBRE O SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO DE RATOS DIABÉTICOS

Karine Paula Reichert

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Maria Melchiors Morsch
Co-orientador: Dr.^a Jessié Gutierres

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

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

**EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE LINGONBERRY SOBRE O
SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA
NERVOSO DE RATOS DIABÉTICOS**

elaborada por
Karine Paula Reichert

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof.^a Dr.^a Vania Lúcia Loro

Prof.^a Dr.^a Roberta Schmatz

Santa Maria, 23 de outubro de 2015.

Dedico este trabalho, para as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Alberi e Redir e minha irmã Jaqueline, meus grandes exemplos de vida, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos e, principalmente, nunca desistir.

Dedico esta vitória a vocês, com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus passos e me dar força e coragem para sempre seguir em frente.

A minha família, meu pai Alberi, minha mãe Redir e minha irmã Jaqueline, pois sem o incentivo e apoio dessas pessoas tão especiais eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada pelo amor e confiança a mim depositados. Vocês são meus maiores exemplos de vida, e sei que nunca estarei sozinha tendo vocês!

A minha orientadora, professora Vera, pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação e por todos os ensinamentos transmitidos. A ti tenho grande admiração, tanto pessoal quanto profissionalmente. Muito obrigada!

A professora Maria Rosa, pela oportunidade que me deste, junto com minha orientadora, em fazer parte deste grupo de pesquisa. Agradeço pela atenção, confiança e apoio.

Ao meu co-orientador Jessié, pelo incentivo, atenção e dedicação que tiveste comigo. Por todos os aprendizados, que contribuíram em grande parte para o sucesso desta etapa.

E claro, não poderia deixar de agradecer a minha amiga e agora membro da minha banca, Roberta. Pelo auxílio e incentivo que sempre me deste. Por todos os ensinamentos e momentos de alegria. Tens um lugar especial no meu coração!

As meninas do mestrado Ali, Ani, Di, Lu e Nathi que tornaram meus dias muito mais divertidos e hoje, minhas grandes amigas! Adoro vocês!

Um agradecimento especial a Luana, minha colega e amiga, pela dedicação e grande ajuda neste trabalho. Com certeza aprendemos muito juntas.

As meninas do doutorado, Carla, Juci, Naiara e Pauline, que me ajudaram e aconselharam no decorrer do mestrado. Muito obrigada pela amizade e pelos momentos compartilhados.

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram neste trabalho, especialmente Camille e Thauan.

A todo pessoal do lab Enzitox, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos membros da banca examinadora deste trabalho, professoras Vania e Roberta, pelos ensinamentos, disponibilidade e contribuições fundamentais para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A UFSM e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

Meu carinho e gratidão!

*“Descobri como é bom chegar, quando se tem paciência.
E para se chegar onde quer que seja, aprendi que
não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer”.*

(Amyr Klink)

RESUMO

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

EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *LINGONBERRY* SOBRE O SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVOS NO SISTEMA NERVOSO DE RATOS DIABÉTICOS

AUTORA: KARINE PAULA REICHERT
ORIENTADORA: VERA MARIA MELCHORS MORSCH
CO-ORIENTADOR: JESSIÉ GUTIERRES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de outubro de 2015.

O diabetes *mellitus* é considerado uma desordem metabólica, que afeta grande parte da população mundial. A hiperglicemia do diabetes causa prejuízos cognitivos associados a alterações fisiológicas e estruturais no sistema nervoso central (SNC) bem como na sinalização purinérgica. A superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) contribui significativamente para as complicações desta patologia. Frutos que possuem uma variedade de compostos polifenólicos, como o *Lingonberry* (*Vaccinium vitis-idaea* L.), podem modular os componentes envolvidos no sistema purinérgico, bem como prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo. Desta forma, pretende-se investigar o efeito do tratamento com extrato de *Lingonberry* (LB) sobre o sistema purinérgico e estresse oxidativo em córtex de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. Os ratos machos Wistar foram divididos em cinco grupos (n=10): controle/salina, controle/LB 50 mg/kg, diabético/salina, diabético/LB 25 mg/kg e diabético/LB 50 mg/kg, tratados via oral durante 30 dias. Após este período foram eutanasiados e o córtex cerebral retirado para análises. Os nossos resultados demonstram uma redução na hidrólise do ATP, ADP e AMP no grupo diabético/salina quando comparado ao grupo controle/salina e o tratamento com LB na dose de 50 mg/ kg foi capaz de prevenir essa redução. Para a atividade da adenosina desaminase não foram encontrados resultados significativos. A expressão do receptor P2X7 aumentou no grupo diabético/salina e quanto ao receptor A1 esteve diminuída no diabetes e o tratamento em ambas as doses foi capaz de manter a expressão destes receptores próximos ao grupo controle/salina. Também foi observado um aumento nas EROs bem como nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no grupo diabético/salina em comparação ao controle/salina, o tratamento na dose de 50 mg/ kg foi capaz de reverter este aumento no grupo diabético para a EROs e quanto ao TBARS as duas doses de LB foram eficientes. Desta forma, os resultados nos indicam que o LB foi capaz de modular a atividade das ectonucleotidases bem como a expressão dos receptores P2X7 e A1 e prevenir o aumento do estresse oxidativo. Isto evidencia as propriedades benéficas do extrato de *Lingonberry*, sugerindo que este fruto pode ser um coadjuvante no tratamento do diabetes.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Sinalização purinérgica. *Lingonberry*. Estresse oxidativo. Receptor P2X7. Receptor A1.

ABSTRACT

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

PROTECTOR EFFECT OF *LINGONBERRY* EXTRACT ON PURINERGIC SYSTEM AND OXIDATIVE STRESS IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN DIABETIC

AUTHOR: KARINE PAULA REICHERT
ADVISER: VERA MARIA MELCHORS MORSCH
CO-ADVISER: JESSIÉ GUTIERRES

Date and Place of the Defense: Santa Maria, October 23th, 2015.

Diabetes mellitus (DM) is considered a metabolic disorder that affects large part of worldwide. The hyperglycemia of diabetes cause cognitive impairments associated with physiological and structural changes in the central nervous system (CNS) as well as purinergic signaling. The overproduction of reactive oxygen species (ROS) contributes significantly to the complications of this disease. Fruits that have a variety of polyphenolic compounds, such as *Lingonberry* (*Vaccinium vitis-idaea* L.), can modulate the components involved in the purinergic system and prevent damage caused by oxidative stress. Thus, it is intended to investigate the effect of treatment with *Lingonberry* extract (LB) on the purinergic system and oxidative stress in the cortex of streptozotocin induced diabetic rats. The male Wistar rats were divided into five groups (n = 10): control/saline control/LB 50 mg/kg, diabetic/saline, diabetic/LB 25 mg/kg and diabetic/LB 50 mg/kg treated orally for 30 days. After they were euthanized and the cerebral cortex removed for analysis. Our results demonstrate a reduction in hydrolysis of ATP, ADP and AMP in the diabetic group/saline compared to the control/saline, and treatment with LB at a dose of 50 mg/kg was able to prevent this reduction. For the activity of adenosine deaminase were not found significant results. The expression of P2X7 receptor increased in the diabetic group/saline and as the A1 receptor was decreased in diabetes, treatment at both doses was able to maintain expression of these receptors near the control/saline group. It was also observed an increase in ROS and levels of lipid peroxidation (TBARS) in the diabetic/saline group compared to the control/saline, treatment at a dose of 50 mg/kg was can reverse this increase in diabetic group for EROs, while the TBARS both doses were effective. Thus, the results indicate that the LG was able to modulate the activity of ectonucleotidases well as the expression of P2X7 and A1 receptors and prevent the increase of the oxidative stress. This evidences the beneficial properties of *Lingonberry* extract, suggesting that this fruit may be coadjuvant in the treatment of diabetes.

Keywords: Diabetes *mellitus*. Purinergic signaling. *Lingonberry*. Oxidative stress. P2X7 receptor. A1 receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

- Figura 1- Número de pessoas acometidas por Diabetes *mellitus* no mundo. Fonte: Atlas da Federação Internacional de Diabetes, 2013..... 17
- Figura 2- Estruturas químicas da glicose, estreptozotocina e aloxano, respectivamente. Fonte: Adaptado de WU & YAN, 2015.21
- Figura 3- Representação do sistema purinérgico, envolvendo nucleotídeos e nucleosídeo de adenina, enzimas de degradação e receptores. Fonte: Adaptado de PETRILLI, 2012.....24
- Figura 4 - Diferenças entre os receptores P2X1-6 e P2X7. Fonte: Adaptado de Di VIRGÍLIO et al., 199826
- Figura 1 - Adenosina e seus receptores no SNC. Fonte: LANDOLT et al., 2012.....28
- Figura 6 - Cascata das ectonucleotidases. Fonte: Adaptado de YEGUTKIN, 2008.....29
- Figura 7 - Formação de espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo a biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA. Fonte: Adaptado de SHAH et al., 2014.....32
- Figura 8 - Peroxidação de lipídeos insaturados. A variedade de lipídeos e a natureza aleatória de reações de radicais livres conduz a muitos produtos, incluindo 4-hidroxicineno, 2-alceno e, quando há 3 ou mais ligações insaturadas, ao malondialdeído (MDA). Fonte: UCHIDA et al., 1999.....33
- Figura 9 – Ação integrada dos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Fonte: FERREIRA et al., 2008.....34
- Figura 10 - Estruturas químicas das subclasses de flavonóides. Com base na variação do tipo de heterociclo envolvido, flavonóides são divididos em seis grandes subclasses: flavonóis, flavanonas, flavonol, flavonas, isoflavonas e antocianinas. Fonte: PANDEY & RIZVI, 2009.....35
- Figura 11 - *Lingonberry*. Fonte: <http://healthybenefits.info/the-health-benefits-of-lingonberry-vaccinium-vitis-idaea/>.....36

MANUSCRITO

Figura 1 - NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activity in cerebral cortex synaptossomes from STZ- induced diabetic rats treated whit *Lingonberry* extract using ATP (A), ADP (B), AMP (C) and adenosine (D) as substrate. Different letters represent significant differences between groups. Values are expressed as mean \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 10$). ANOVA Newman-Keuls's test.....50

Figura 2 - Western blot quantification of P2X7 (A) and A1 (B) receptors in total membranes of cerebral cortex of rats treated with *Lingonberry* extract and STZ-induced diabetes. β -actin loading control antibody was used to normalize the levels of protein. Values are expressed as mean \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 5$). ANOVA Newman-Keuls's test.....51

Figura 3 - Intracellular reactive oxygen species (ROS) production by 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) levels (A) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (B) in the cerebral cortex from STZ- induced diabetic rats treated whit *Lingonberry* extract. Different letters represent significant differences between groups. Values are expressed as mean \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 10$). ANOVA Newman-Keuls's test.....52

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1 - The effect of different doses of <i>Lingonberry</i> extract (LB) on body weight and fasting blood glucose levels at the end of the experiment (30 days after <i>Lingonberry</i> extract treatment).....	49
--	----

LISTA DE ABREVIações

- ADA-** Adenosina desaminase
- ADP-** Adenosina difosfato
- AMP-** Adenosina monofosfato
- AMPc-** Adenosina monofosfato cíclico
- ATP-** Adenosina trifosfato
- CAT-** Catalase
- DM-** Diabetes *mellitus*
- DM1-** Diabetes *mellitus* tipo 1
- DM2-** Diabetes *mellitus* tipo 2
- DNA-** Ácido desoxirribonucléico
- E-5'-nucleotidase-** Ecto-5'-nucleotidase
- E-NPP-** Ecto- nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase
- E-NTPDase-** Ecto- nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- EROs-** Espécies reativas de oxigênio
- GPx-** Glutathiona peroxidase
- IL-1 β -** Interleucina 1 β
- MDA-** Malondialdeído
- NAD⁺-** Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- SNC-** Sistema nervoso central
- STZ-** Estreptozotocina
- TNF α -** Fator de necrose tumoral α
- TOTG-** Teste oral de tolerância a glicose

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A- Carta de Aprovação pelo Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal – UFSM.....	71
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3. MANUSCRITO	39
3.1 MANUSCRITO 1	39
4. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS	71

APRESENTAÇÃO

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

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As Referências equivalem somente às citações que aparecem no item Introdução desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para a qual será submetido: Life Sciences.

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea, devido a defeitos na secreção e/ou ação da insulina (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014). Esta patologia representa um dos maiores problemas de saúde pública e vem tomando proporções epidêmicas nos últimos anos. Estima-se que há cerca de 382 milhões de casos de diabetes em todo o mundo (Figura 1) e que no ano de 2035 este número alcance 592 milhões, o que representa um alto custo econômico sobre os pacientes, bem como aos sistemas de saúde. O Brasil é o 4º país com maior número de portadores de diabetes, apresentando 13,4 milhões de casos, cerca de 7% da população (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2013).

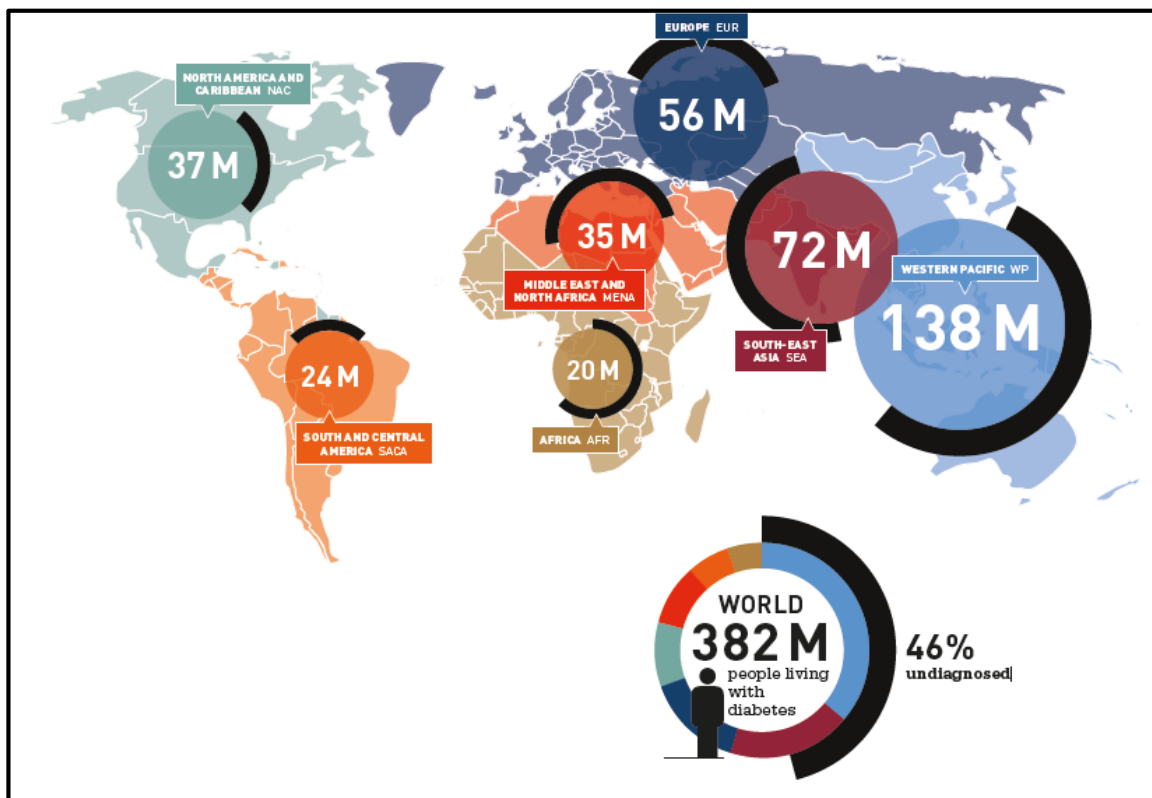


Figura 2- Número de pessoas acometidas por Diabetes *mellitus* no mundo.
Fonte: Atlas da Federação Internacional de Diabetes, 2013.

Sob condições metabólicas normais, os níveis de glicose sanguínea são rigorosamente controlados através de mecanismos hormonais a fim de mantê-los dentro de seu limite aceitável (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014).

Este processo é realizado através dos hormônios glucagon e insulina, produzidos pelas células α e β , respectivamente, das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Em períodos de jejum, o glucagon exerce regulação estimulando as vias produtoras de glicose (gliconeogênese e glicogenólise), enquanto que em situações nas quais as taxas de glicose estão altas, a insulina entra em ação, estimulando a captação da glicose para dentro das células e reduzindo a produção de glicose hepática (TIWARI & RAO, 2002).

Quando o organismo apresenta resistência à insulina ou quando ocorrem defeitos na secreção deste hormônio, em decorrência da destruição das células β pancreáticas, a glicose deixa de se internalizar nas células, ficando em altas concentrações no sangue. Esta condição é conhecida como hiperglicemia, principal característica do DM (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014).

O DM possui etiologia múltipla, e a classificação atual de acordo com a Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1999) e Associação Americana de Diabetes (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014) inclui quatro classes: diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de diabetes *mellitus* e diabetes *mellitus* gestacional.

O DM1 compreende cerca de 5 a 10% do total de casos e ocorre na maioria das vezes na infância ou adolescência, mas também pode ser diagnosticada em adultos. Esta condição clínica se dá pela destruição das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, que produzem insulina, levando ao estágio de deficiência absoluta deste hormônio. Geralmente esta condição é causada por um processo autoimune, em que os anticorpos atacam equivocadamente as células secretoras de insulina (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013-2014). Além da autoimunidade, o DM1 está relacionado com determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), alelos que podem proteger ou favorecer o desenvolvimento da doença (TOOD et al., 1987; ERLICH et al., 2008).

O diabetes tipo 1 pode ser oriundo de fatores genéticos em conjunto com fatores ambientais, desencadeando a autoimunidade das células β . Porém há evidências em que as causas para a destruição das células produtoras de insulina pode ocorrer por fatores idiopáticos, cujas causas não são totalmente esclarecidas e não possuem um embasamento científico. O tratamento do DM1 se dá obrigatoriamente pela administração de insulina exógena, por isso esta forma

também é conhecida como insulín dependente (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013-2014).

A segunda forma do diabetes compreende cerca de 90% do total de casos e resulta principalmente da resistência à insulina e/ou da deficiência na secreção deste hormônio pelas células β pancreáticas, é a forma mais comum desta patologia e geralmente há uma pré-disposição em adultos com idade superior a 45 anos. O DM2 está associado principalmente a fatores como a obesidade e idade e não é dependente de terapia insulínica. A resistência a insulina pode ser contornada, primeiramente, através da adoção de hábitos de vida saudáveis, ou ainda pela inclusão de uma variedade de antidiabéticos orais (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013-2014).

Outros tipos específicos de diabetes *mellitus* é a forma bem menos comum da doença, em que os defeitos ou processos causadores da patologia podem ser identificados. Nesta classe estão incluídos defeitos genéticos das células β ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções, síndromes genéticas além de ser induzida por medicamentos ou agentes químicos. Já o diabetes gestacional é uma condição temporária que ocorre durante a gravidez, mas aumenta o risco para a mãe e o bebê desenvolverem diabetes posteriormente, geralmente é detectado no rastreamento pré-natal a partir da 24ª semana de gravidez e atinge cerca de 2 a 4% das gestantes (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013-2014).

As doenças metabólicas, como o diabetes geralmente já estão presentes antes de serem diagnosticadas clinicamente e muitas vezes algumas das complicações comuns já estão sendo manifestadas. Os sintomas clássicos desta patologia são: poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso, porém o diabetes é assintomático na maioria dos casos, o que retarda o diagnóstico e o tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; ATKINSON & EISENBARTH, 2001).

O diagnóstico do DM é realizado através dos seguintes testes de glicemia: glicose de jejum de no mínimo 8 horas e teste oral de tolerância à glicose (TOTG), realizado 2 horas após uma sobrecarga de 75g de glicose. Atualmente, são três os critérios usados para identificar o DM partindo destes testes:

- Sintomas clássicos da doença (poliúria, polidipsia, perda de peso) acrescidos de glicemia casual (realizada a qualquer hora do dia) \geq 200mg/ dl;

- Glicemia de jejum ≥ 126 mg/ dl (7mmol/ l);
- TOTG ≥ 200 mg/ dl.

Todos aceitos pela Associação Americana de Diabetes e Organização Mundial da Saúde (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1999).

Além destes exames clínicos, nos últimos anos, também foi acrescentado o teste de hemoglobina glicada como critério diagnóstico do DM, que avalia o grau de exposição à glicemia durante os últimos meses (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; JOHN, 2012).

As anormalidades hormonais do diabetes geram uma hiperglicemia crônica que causa alterações em diversas vias metabólicas, especialmente no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Os sintomas decorrentes da hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva. Em casos mais graves, pode ocorrer a cetoacidose, e se não for controlada, pode levar ao coma e até a morte (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014).

Em longo prazo, o desequilíbrio metabólico do diabetes pode levar a danos, disfunções ou até falência em vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos (RAHIMI et al., 2005). Desta forma, pacientes com DM estão mais susceptíveis a desenvolver complicações macro e microvasculares, que são as principais causas de morbidade e mortalidade do diabetes. Dentre as complicações macrovasculares estão a doença arterial coronariana, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral, enquanto que as conseqüências microvasculares englobam a neuropatia, nefropatia e retinopatia (FOWLER, 2008).

O DM1 é uma das doenças crônicas mais comuns na infância, e sua alta incidência principalmente em faixas etárias menores, a torna um importante alvo de estudos (POCIOT & McDERMOTT, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Devido as diversas limitações encontradas em pesquisas com seres humanos, estudos envolvendo modelos de experimentação animal são uma alternativa bastante versátil no sentido de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos nesta patologia, bem como auxiliar no tratamento dos pacientes.

Dentre os protocolos de promoção do DM experimental, existem os modelos espontâneos e aqueles induzidos quimicamente. As espécies de modelo espontâneo incluem linhagens de camundongos diabéticos não obesos e ratos *Biobreading*, os

quais desenvolvem o DM1 por defeitos imunológicos e/ou predisposição genética (MORDES et al., 2004; ROEP & ATKINSON, 2004; SAKATA et al., 2012). A indução química do DM é a forma mais utilizada, e envolve o uso de drogas diabetogênicas como a estreptozotocina (STZ) e aloxano, as quais destroem uma grande porcentagem de células β endógenas, conduzindo a hiperglicemia e posteriores sintomas da doença. Estes fármacos são capazes de induzir o DM1, por apresentarem grande semelhança com a molécula de glicose (Figura 2), deste modo, animais em estado de jejum tornam-se mais vulneráveis ao ataque destes agentes químicos, adquirindo a patologia (ISAAC et al., 2004; LENZEN, 2008).

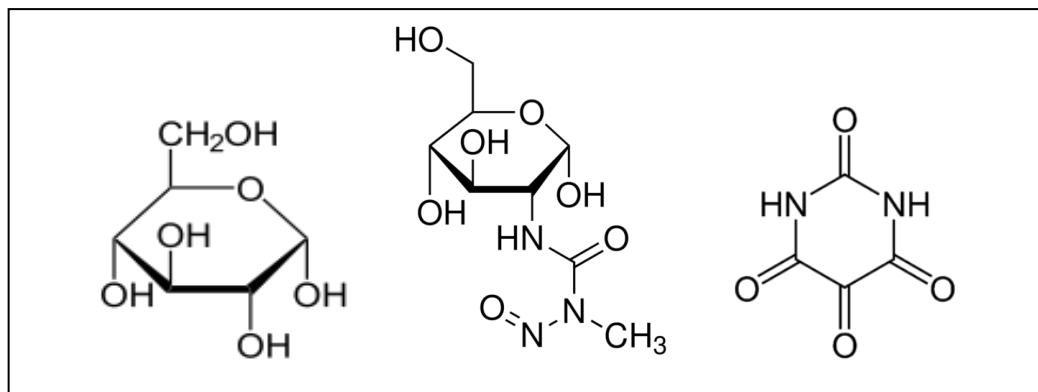


Figura 3- Estruturas químicas da glicose, estreptozotocina e aloxano, respectivamente.
Fonte: Adaptado de WU & YAN, 2015.

Estudos comparativos entre ambos modelos de indução química, indicam que a STZ é utilizada em 70% dos casos de DM1 experimental, devido principalmente ao fato de ter maior estabilidade quando comparada ao aloxano (LENZEN & MUNDAY, 1991; SHARMA et al., 2013).

A STZ [2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureído)-D-glicopirranose] é um antibiótico derivado da *Streptomyces achromogenes* e quando administrada em animais é capaz de desenvolver o quadro característico do diabetes (SHARMA et al., 2013). O efeito diabetogênico e citotóxico deste composto foi descoberto em 1963 (RAKIETEN et al., 1963), mas o mecanismo através do qual isso acontece ainda gera muitos estudos e controvérsias.

Acredita-se que a principal razão da toxicidade desta molécula é devido a sua propriedade alquilante. Após administração da STZ, ela entra nas células β do pâncreas através de um transportador de glicose (GLUT-2) e causa danos nas bases do DNA (SZKUDELSKI, 2001), levando a depleção da nicotinamida adenina

dinucleotídeo (NAD⁺) a qual inibe a síntese e secreção da insulina (SANDLER & SWENNE, 1983) destruindo irreversivelmente as células β das ilhotas de Langherans do pâncreas, o que resulta no quadro clínico de DM1 (BENNET & PEGG, 1981; BOLZAN & BIANCHI, 2002; AKBARZADEH et al., 2007). Além disso, a STZ é uma fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), fato que contribui ainda mais para os danos no DNA e morte celular (TAKASU et al., 1991; RESS & ALCOLADO, 2005).

Estudos sugerem que uma dose única e elevada de STZ (40 a 80 mg/kg) pode produzir um modelo experimental de DM1 em roedores (KUMAR et al., 2007; SCHMATZ et al., 2009; CALGAROTO et al., 2015, STEFANELLO et al., 2015), provavelmente devido aos efeitos tóxicos. Assim como em portadores de DM, os animais que adquirem a patologia induzida quimicamente, também apresentam danos em rins, fígado, olhos, cérebro e no sistema cardiovascular (SCHAAN, 2004; WU & HUAN, 2008; SCHMATZ et al., 2012).

Por mais que estudos voltem preferencialmente a atenção para as complicações do diabetes relacionadas ao sistema cardiovascular, esta patologia provoca graves prejuízos ao sistema nervoso central (SNC), uma vez que o metabolismo da glicose está estreitamente relacionado com a fisiologia e funcionamento do cérebro (MERGENTHALER et al., 2013). As reservas de energia deste tecido são extremamente baixas quando comparada com sua elevada taxa metabólica, de modo que carece de suprimento contínuo de glicose (DICKINSON, 1996), sendo que os neurônios são as células do cérebro que mais requerem energia, por realizarem as atividades sinápticas (BIESSELS, 1999; HARRIS et al., 2012).

O metabolismo da glicose fornece a energia na forma de ATP para o funcionamento cerebral, incluindo a manutenção celular neuronal e não neuronal (MERGENTHALER et al., 2013). Além disso, também é fonte para a biossíntese de outros compostos exigidos pelo cérebro, como os carboidratos complexos que são componentes de glicoproteínas e glicolípidos, aminoácidos, doadores de carbono para reações de metilação e o fornecimento de precursores para a síntese de neurotransmissores (DIENEL, 2012). Desta forma, uma deficiência no metabolismo energético do cérebro pode levar a um comprometimento na funcionalidade normal desse tecido (BOLANOS et al., 2009).

No caso do DM, a desregulação metabólica da glicose, pode causar danos ao cérebro devido tanto a hipo quanto a hiperglicemia. A hipoglicemia causa danos diretamente ao cérebro. Já a hiperglicemia pode causar modificações não-enzimáticas em diversas moléculas, gerando os produtos de glicação avançada, altamente reativos, que favorecem o dano oxidativo celular. (WESSELS et al., 2008; SCHEEN, 2010).

Estudos têm demonstrado que pacientes diabéticos apresentam um risco elevado em desenvolver doenças cerebrovasculares como o acidente vascular cerebral, encefalopatia diabética, doença de Alzheimer e outras demências (LUSCHSINGER, 2008; KAPOGIANNIS & MATTSON, 2011; YANG & SONG, 2013). A encefalopatia diabética é uma das complicações mais comuns do diabetes, sendo caracterizada por anormalidades fisiológicas e estruturais cerebrais que causam disfunções cognitivas, podendo afetar a velocidade psicomotora, atenção e memória (BRANDS et al., 2004; MIJNHOUT et al., 2006; DUINKERKEN et al., 2009; ZHANG et al., 2015).

Além disso, a insulina também exerce um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de tecidos e está envolvida em processos de aprendizagem e memória. A diminuição na concentração de insulina no sistema nervoso central contribui para o declínio cognitivo, uma vez que os receptores de insulina encontram-se amplamente distribuídos em estruturas cerebrais como córtex e hipocampo (ZHAO & ALKON, 2001; BONDY & CHENG, 2004; CHIU et al., 2008).

Evidências demonstram que as concentrações de insulina e de seus receptores reduzem com o envelhecimento, como foi observado em pacientes com a doença de Alzheimer (CRAFT et al., 1998; BOMFIM et al., 2012). Como o diabetes apresenta deficiência na sinalização de insulina, acredita-se que isto pode ser uma das principais causas para o declínio cognitivo e o risco em desenvolver a demência (ZG et al., 2002).

Neste contexto, tendo em vista a variabilidade de desordens encontradas no sistema nervoso central durante o diabetes, torna-se importante investigar vias de comunicação celular envolvidas nos processos fisiológicos e patológicos. Uma importante via que apresenta consideráveis alterações na condição diabética é a sinalização purinérgica, a qual envolve três constituintes principais: os nucleotídeos de adenina e seu nucleosídeo correspondente; os receptores através dos quais se

ligam e exercem suas funções e as ectoenzimas responsáveis pela hidrólise e controle dos níveis extracelulares destas moléculas (Figura 3) (ATKINSON 2006).

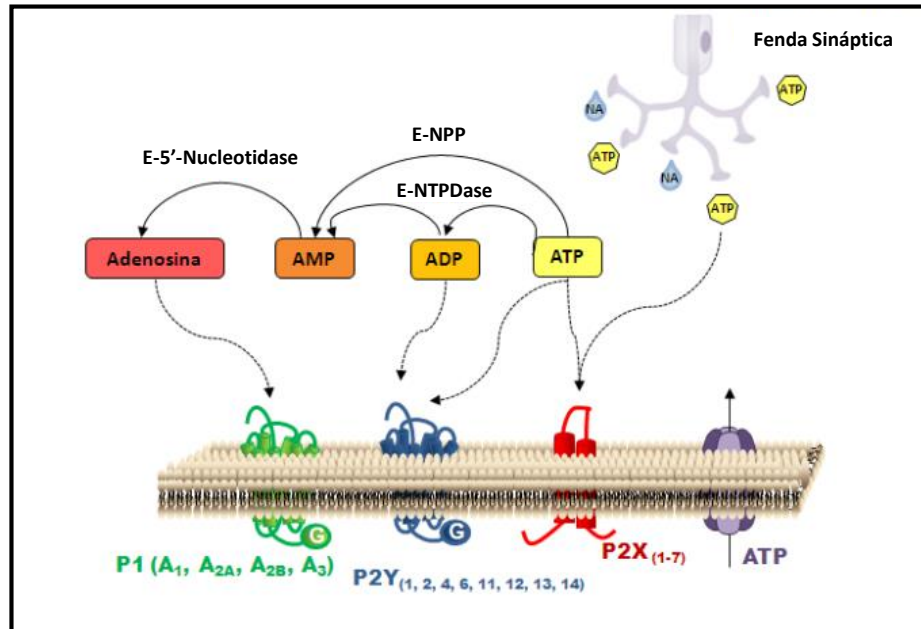


Figura 4- Representação do sistema purinérgico, envolvendo nucleotídeos e nucleosídeo de adenina, enzimas de degradação e receptores.
Fonte: Adaptado de PETRILLI, 2012.

Os nucleotídeos extracelulares de adenina ATP, ADP e AMP e seu nucleosídeo correspondente, a adenosina, representam um grupo de moléculas sinalizadoras, que modulam diversos processos biológicos, incluindo a neurotransmissão, função cardiovascular, respostas imunológicas, dor, agregação plaquetária, vasodilatação, proliferação e diferenciação celular (RALEVIC et al., 1998; MARCUS et al., 2003; BOURS et al., 2006; ROBSON et al., 2006; BURNSTOCK, 2007).

O ATP é um neurotransmissor (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998) e atua como um co-transmissor na maioria dos nervos, tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (BURNSTOCK, 1972). No SNC, este nucleotídeo é liberado principalmente pelos neurônios nas sinapses e possui importante papel na plasticidade sináptica e em respostas a alguma patologia ou lesão (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004).

Os nucleotídeos de adenina exercem os seus efeitos através dos receptores do tipo P2, largamente distribuídos no SNC, e pertencem a duas famílias principais: uma família de receptores P2X, que são receptores de canais iônicos dependentes de ligantes (receptores ionotrópicos) e uma família de receptores P2Y, os quais se

encontram acoplados à proteína G (receptores metabotrópicos) (ABBRACCHIO E BURNSTOCK, 1994; BURNSTOCK, 2007).

Os receptores P2X são proteínas de membrana que formam canais para íons na camada lipídica da membrana celular, estes canais são seletivos a cátions como Ca^{2+} , Na^+ e K^+ . Desta forma, a principal via de sinalização ativada por estes receptores é o aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, que leva a despolarização da membrana e ativação de várias proteínas quinases (KOLES et al., 2008). O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} faz com que ocorra uma liberação de transmissores das células neuronais e gliais, promovendo a liberação de hormônios além de ativar cascatas de sinalização em muitas células (NORTH, 2002).

Atualmente, já foram caracterizados sete diferentes subtipos de receptores P2X, identificados como $\text{P2X}_{(1-7)}$, de acordo com a ordem em que foram clonados e encontram-se distribuídos nos neurônios centrais e periféricos (RALEVICK & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2004). Esta família de receptores apresenta em comum suas regiões carboxi e amino-terminais localizadas no espaço intracelular, e são formadas por subunidades na forma de duas alfas-hélices transmembrana unidas por uma alça extracelular, onde podem se ligar os agonistas, antagonistas e moduladores (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004).

Os receptores do tipo P2Y são compostos por sete domínios transmembrana e possuem a parte carboxi-terminal localizada intracelularmente e a porção amino-terminal localizada no meio extracelular. Já foram identificados oito subtipos deste receptor em humanos: P2Y_1 , PY_2 , P2Y_4 , P2Y_6 , P2Y_{11} , P2Y_{12} , P2Y_{13} e P2Y_{14} . Os números que faltam representam subtipos que não existem em mamíferos (ABBRACHIO et al., 2006).

Dentre todos os receptores do tipo P2, o receptor P2X_7 , anteriormente conhecido como receptor P2Z, vem atraindo cada vez mais a atenção de pesquisadores, devido ao seu envolvimento na inflamação, apoptose celular e por se diferenciar, em parte, de outros receptores da mesma família (SURPRENANT et al., 1996; Di VIRGÍLIO et al., 2000). Enquanto os receptores P2X são ativados em concentrações nanomolares de ATP, o P2X_7 necessita de concentrações mais altas, na faixa de micromolar, para exercer sua ativação. Estudos demonstraram que concentrações ainda maiores de ATP ou uma exposição prolongada, podem induzir a formação de um poro não seletivo na membrana plasmática, permeável a

moléculas de peso molecular de até 800 Da, levando a morte celular (GORDON 1986; RALEVIC; COLLO et al 1997; BURNSTOCK 1998). Além disso, este receptor possui a extremidade carboxi-terminal mais longa (240 aminoácidos), região que é essencial para a formação de poros citolíticos através da ativação do receptor (Figura 4) (SURPRENANT et al 1996; RASSENDREM et al 1997).

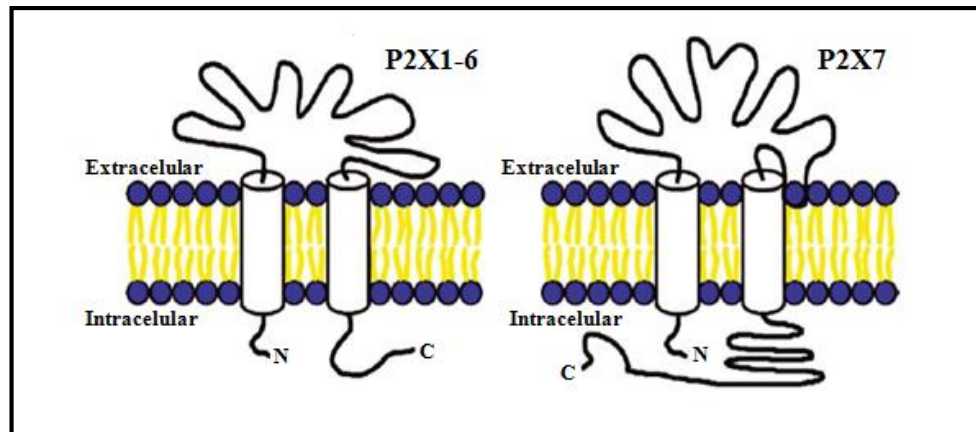


Figura 5 - Diferenças entre os receptores P2X1-6 e P2X7. (Fonte: Adaptado de Di VIRGÍLIO et al., 1998).

No SNC, o receptor P2X7 está expresso em muitas células, incluindo a microglia (FERRARI et al 1996; Di VIRGILIO et al 1999), astrócitos (BALLERINI et al 1996; KUKLEY et al 2011) e neurônios (BRANDLE et al 1998; DEUCHARS 2001). O P2X7 parece desempenhar um papel importante na modulação de neurotransmissores, por estar localizado nos terminais pré-sinápticos dos neurônios, uma vez que sua ativação induz a liberação de glutamato (DEUCHARS et al., 2001).

Na microglia, células imunes do SNC, a ativação do receptor P2X7 pode levar a liberação de interleucinas como a interleucina 1 β (IL-1 β) (SOLINI et al., 2008) e citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF α) que possuem efeitos pró-inflamatórios (HIDE et al., 2000). Desta forma, um desequilíbrio na ativação deste receptor, pode levar a processos de morte celular, principalmente, por apoptose, favorecendo condições para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (SOLINI et al., 2008).

Outra molécula importante deste sistema é a adenosina, um nucleosídeo de purina encontrado em todas as células, e está envolvida em vias principais do metabolismo primário, tem um papel importante na homeostase eletrofisiológica celular controlando as atividades dos canais de íons, além de ser um mensageiro

intracelular que sinaliza desequilíbrio metabólico (FREDHOLM et al., 1998; CUNHA, 2001; 2005). Além disso, esta molécula medeia a vasodilatação no cérebro e o fluxo sanguíneo em células corticais (FORRESTER et al., 1979), também atua como um neuromodulador a nível sináptico e possui importantes efeitos neuroprotetores (CUNHA, 2001).

Este nucleosídeo atua através de receptores do tipo P1, divididos em quatro subtipos conforme suas estruturas moleculares, distribuição tecidual e afinidade pelo ligante: A1, A2A, A2B e A3, os quais estão todos acoplados a proteínas G (Figura 5) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Assim como os receptores metabotrópicos P2Y, os receptores de adenosina apresentam sete segmentos transmembrana, com a porção amino terminal voltada para o meio extracelular e a porção carboxi-terminal voltada para o meio intracelular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

A ativação destes receptores reflete principalmente na modulação das concentrações intracelulares de AMPc, mensageiro secundário que tem importante função na transdução de sinal na célula. A ligação da adenosina aos receptores A1 e A3 inibe a produção do AMPc, já os receptores A2A e A2B estimulam a produção desta molécula por ativar a adenilato ciclase. Além disso, o AMPc formado controla os fluxos iônicos de membrana através da ativação de proteína-quinases que fosforilam, em seguida, as proteínas que regulam a condutância da membrana (Figura 5) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

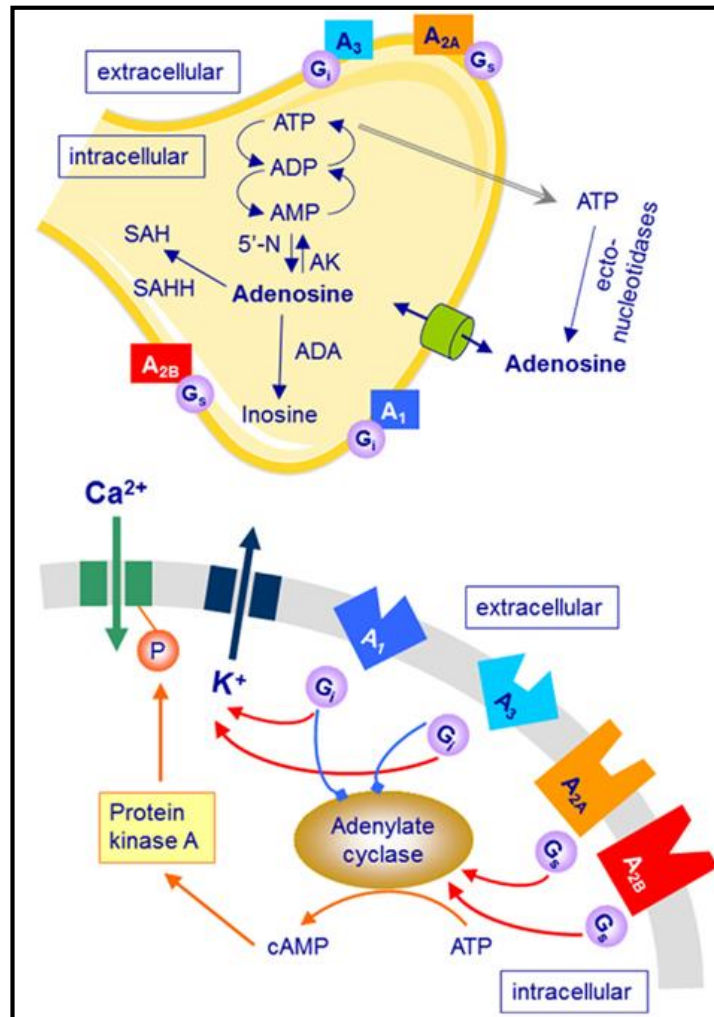


Figura 6 - Adenosina e seus receptores no SNC.
 Fonte: LANDOLT et al., 2012.

O receptor A1 é o mais abundante no SNC e medeia efeitos inibitórios através da inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (DUNWIDDIE & MASINO, 2001). Enquanto os receptores A2A possuem efeitos excitatórios, facilitando a liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos (LI & HENRY, 1998).

Após a liberação no meio extracelular, a concentração dos nucleotídeos de adenina e de seu nucleosídeo correspondente, adenosina, podem ser controladas pela atividade de algumas enzimas como a trifosfato difosfohidrolase ectonucleosídeo (E-NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterase (E-NPP), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-nucleotidase) e adenosina desaminase (ADA). Estas enzimas são conhecidas como ectonucleotidases, e agem em conjunto, formando uma cascata (Figura 6). Primeiramente, as enzimas E-NTPDase e E-NPP degradam

conservadas da apirase que desempenham um papel fundamental na formação do sítio catalítico (ZIMMERMANN, 1999).

Dentre as NTPDases vinculadas a membrana plasmática, a NTPDase 1 hidrolisa igualmente tanto o ATP, quanto ADP e sua expressão já foi observada em várias estruturas nervosas cerebrais (KEGEL et al., 1997; WANG et al., 1997; VLAJKOVIC et al., 2002). Além de modular a concentração de nucleotídeos em muitos tecidos, esta enzima também está envolvida na neurotransmissão. Estudos indicam que a NTPDase 1 pode estar associada em processos como aquisição de memória, melhora na lesão cerebral, circulação sanguínea e tônus vascular (BONAN et al., 1998; 2000; ZIMMERMANN et al., 2007).

Seguindo a cascata enzimática, a E-5'-nucleotidase tem um papel fundamental na degradação de nucleotídeos monofosfatados tendo como produto final a formação de adenosina (ZIMMERMANN, 2001). Assim como as NTPDases, a E-5'-nucleotidase também encontra-se ligada à membrana celular, mas através de uma molécula de glicosil fosfatodilinositol, e apresenta seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (HUNSUCKER et al., 2005).

Já foram identificados sete subtipos desta ectoenzima, amplamente distribuídos em vários tecidos, incluindo o tecido nervoso (COLGAN et al., 2006). A principal função E-5'-nucleotidase está na formação da adenosina, uma molécula envolvida em importantes processos relacionados ao SNC, como a neuroproteção e neuromodulação (BRUNDEGE & DUNWIDDIE, 1997) dentre outros já descritos anteriormente. Assim, as ectonucleotidases têm a função de remover o ATP e gerar adenosina, também exibem constante controle nas concentrações dos nucleotídeos de adenina, bem como duração e extensão da respectiva ativação do receptor (ZIMMERMANN, 2001).

A enzima que hidrolisa a adenosina a inosina é a adenosina desaminase, desta forma controla os efeitos e a concentração de adenosina no meio (BLACKBURN & KELLEMS, 2005). Uma vez que a concentração deste nucleosídeo é essencial na seleção da ativação de seus receptores. Trabalhos mostram que o receptor A1 é ativado em baixas concentrações de adenosina extracelular, enquanto que o A2A é ativado em altas concentrações desta molécula (CORRÉIA-DE-SÁ & RIBEIRO, 1996).

Estudos já têm demonstrado que a sinalização purinérgica é alterada em virtude da condição diabética (LUNKES et al., 2004; DUARTE et al., 2005;

SCHMATZ et al., 2009). Mas, o que de fato acontece nesta patologia, que desencadeia esta modificação, ainda não está totalmente definido. Além disso, em nosso grupo de pesquisa já foram desenvolvidos alguns trabalhos relacionando o diabetes com a suplementação de produtos naturais, mostrando que estes compostos têm a capacidade de modular a atividade de enzimas, incluindo as ectonucleotidasas, bem como reverter os danos observados no diabetes em virtude do estresse oxidativo (SCHMATZ et al., 2009; STEFANELLO et al., 2014; CALGAROTO et al., 2015).

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre os níveis de defesa antioxidante e as espécies reativas de oxigênio (EROs), em favor destes últimos (STOKER & KEANEY, 2004). Já está bem esclarecido na literatura que em condições patológicas ocorre uma superprodução das EROs e consequente estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). Porém os mecanismos envolvidos neste processo são multifatoriais e complexos, compreendendo múltiplas vias de sinalização celular como o aumento da via dos polióis, a glicação não-enzimática de proteínas e formação de produtos terminais de glicação avançada. Pesquisas demonstram que o estresse oxidativo, derivado principalmente da hiperglicemia, é um fator crucial no desenvolvimento e na progressão do diabetes, sendo responsável pelas complicações mais graves desta patologia (VALKO et al., 2007; RAINS & JAIN, 2011).

As EROs como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) estão envolvidas em muitas funções fisiológicas, desempenhando um papel benéfico na defesa contra agentes infecciosos, sinalização e defesa celular quando em concentrações balanceadas no organismo (VALKO et al., 2007).

Quando as EROs estão presentes em altas concentrações, podem interagir com componentes celulares incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos danificando estas biomoléculas (Figura 7) (SCANDALIOS, 2005).

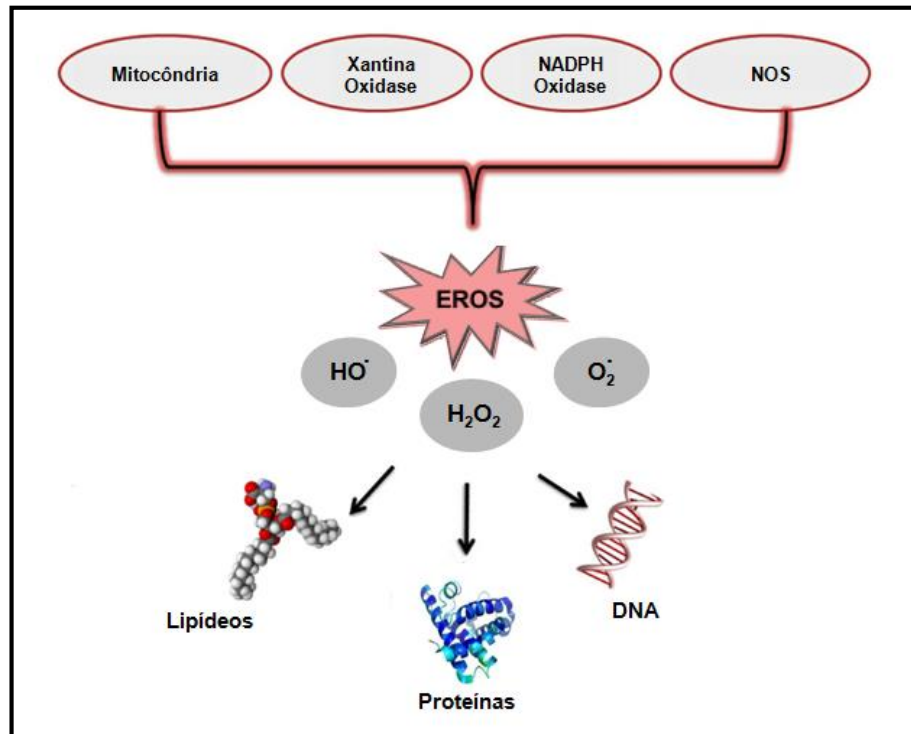


Figura 8 - Formação de espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo a biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA.
 Fonte: Adaptado de SHAH et al., 2014.

Os sistemas biológicos possuem condições favoráveis para a ocorrência de reações oxidativas, devido à existência de ácidos graxos poliinsaturados de fosfolipídeos na membrana celular. As insaturações destes ácidos graxos são alvos da ação oxidante das EROs, resultando num processo de reações químicas em cadeia, conhecido como peroxidação lipídica (URSO 2003; GODWIN, 2006).

Um dos produtos finais da degradação enzimática dos ácidos graxos poliinsaturados é o malondialdeído (MDA) e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em células e tecidos de sistemas biológicos (Figura 8) (BONES & GUÉRIN, 1992; CHERUBINI, 2005).

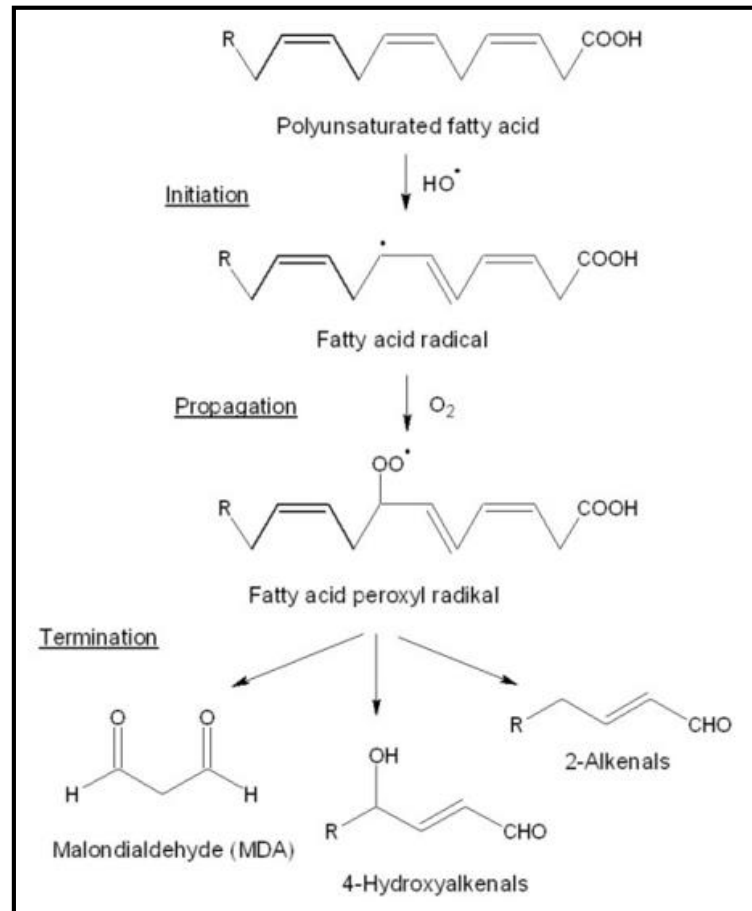


Figura 8 - Peroxidação de lipídeos insaturados. A variedade de lipídeos e a natureza aleatória de reações de radicais livres conduz a muitos produtos, incluindo 4-hidroxiceno, 2-alceno e, quando há 3 ou mais ligações insaturadas, ao malondialdeído (MDA).

Fonte: UCHIDA et al., 1999.

A presença de fosfolipídeos nas membranas celulares é muito importante na permeabilidade seletiva de pequenas moléculas e íons entre os meios intra e extracelular. A peroxidação lipídica provoca alterações na estrutura desta camada lipídica, desestabilizando-a e resultando na perda de sua função como uma barreira seletiva, acarretando na perda da fluidez da membrana, colocando em risco a integridade das organelas e da própria célula (KUHN, 2002).

As células e os tecidos contêm mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que neutralizam os efeitos deletérios induzidos pelo ambiente oxidativo (Figura 9) (VALKO et al., 2007). A linha primária de defesa antioxidante do organismo é composta pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) que agem em conjunto, num mecanismo altamente cooperativo, metabolizando as EROs a fim de manter a homeostase celular (NORDEBERG et al., 2001; BARREIROS & DAVID, 2006).

Seguidos da defesa antioxidante não-enzimática, que inclui a glutatona reduzida (GSH), vitaminas A, C e E e ácido úrico (VALKO et al., 2007).

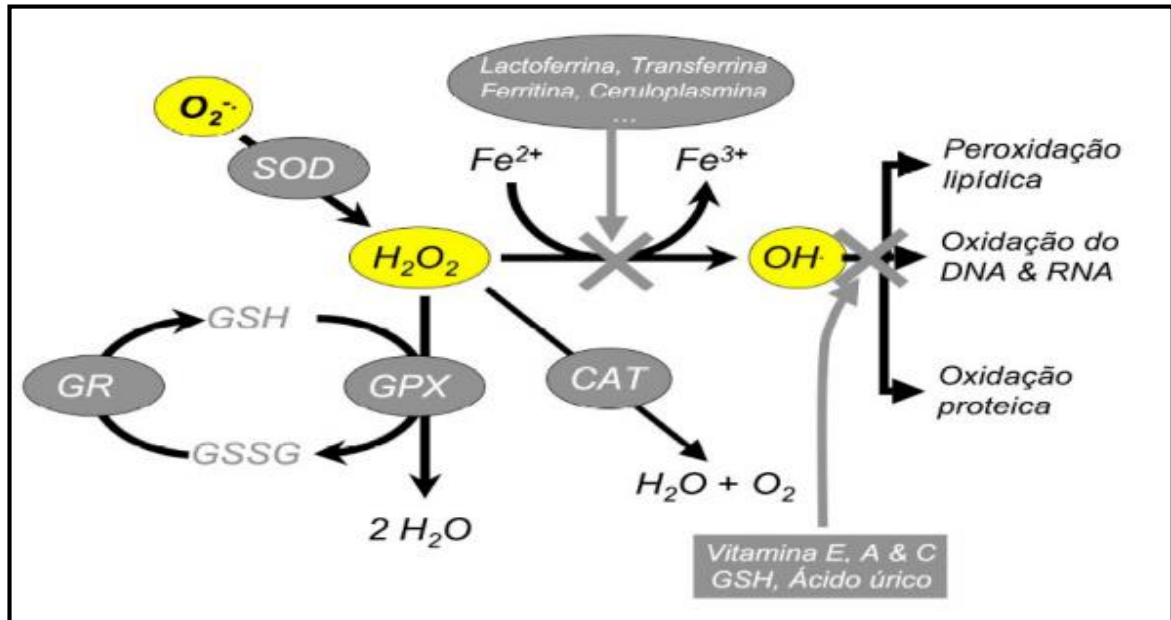


Figura 9 – Ação integrada dos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.
Fonte: FERREIRA et al., 2008.

Tendo em vista que o DM está associado com uma superprodução de EROs, principalmente devido a hiperglicemia característica e que isso pode causar várias complicações em longo prazo, o estudo de moléculas com potencial terapêutico que visam estratégias preventivas e/ou que retardem a progressão de doenças tem sido muito relevante nos últimos anos.

Vários estudos demonstram que a utilização de compostos naturais obtidos na alimentação pode contribuir no tratamento e prevenção de patologias. Uma importante classe deste tipo de moléculas são os polifenóis, metabólitos secundários que ocorrem naturalmente nas plantas e possuem um considerável poder antioxidante, função pela qual tem se tornado alvo de estudos (BRAVO, 1998).

Os flavonóides constituem um dos grupos mais importantes dos polifenóis, com mais de 5000 compostos já descritos e sua estrutura básica consiste de dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos, que usualmente formam um anel heterocíclico oxigenado, além de possuir um ou mais grupos hidroxilas, espécies doadoras de prótons ou elétrons, que lhes confere a função antioxidante. Estes compostos podem atuar em diferentes fases da oxidação, tanto na iniciação quanto na propagação e término através de diferentes mecanismos que envolvem a

inativação de EROs, eliminação de produtos secundários como os peróxidos, elevação de antioxidantes endógenos, quelação de metais, modulação de enzimas envolvidas em diferentes vias de sinalização dentre outros (HARBORNE, 1993; GOLLUCKE et al., 2013; TERAHARA, 2015).

Os compostos fenólicos possuem propriedades químicas dos fenóis, sendo solúveis em água e de caráter polar além de serem degradados facilmente na presença de oxigênio. Evidências sugerem que os flavonóides ocorrem largamente em frutas e sucos de frutas, principalmente as subclasses que incluem flavonóis, flavanonas e antocianinas (Figura 9) (WILLET, 2006; AHMED et al., 2012).

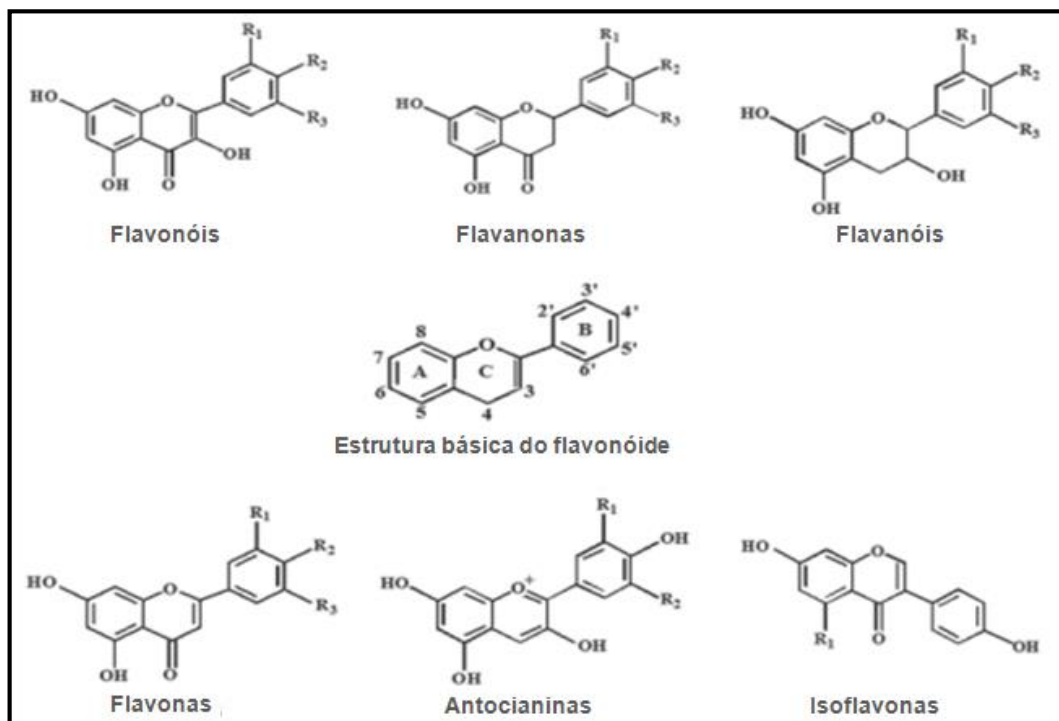


Figura 10 - Estruturas químicas das subclasses de flavonóides. Com base na variação do tipo de heterociclo envolvido, flavonóides são divididos em seis grandes subclasses: flavonóis, flavanonas, flavanol, flavonas, isoflavonas e antocianinas.

Fonte: PANDEY & RIZVI, 2009.

Um popular grupo de frutas que apresentam muitos efeitos antioxidantes são os *berries*, também conhecidos como frutas vermelhas, provenientes da Europa e América do Norte. Dentre eles, destaca-se o *Lingonberry* (*Vaccinium vitis-idaea L.*), uma pequena baga vermelha da família *Ericaceae* provenientes de países nórdicos (Rússia e Canadá), onde é utilizado na dieta humana (MANE et al., 2011).



Figura 11 – *Lingonberry*.

Fonte: <http://healthybenefits.info/the-health-benefits-of-lingonberry-vaccinium-vitis-idaea/>).

O fruto, não é apenas rico em compostos funcionais, como fibras ou minerais, mas também em antioxidantes. A análise cromatográfica, já descrita na literatura, demonstrou que a classe de polifenóis mais abundante no extrato de *Lingonberry* são os flavanóis como a catequina e epicatequina representando 5,8% de sua composição, e em menores quantidades os flavonóis (2,9%) como a quercetina, seguido de ácidos fenólicos (1,9%) incluindo os ácidos caféico, p-cumárico, felúrico e clorogênico, e finalmente as antocianinas (1,5%) sendo a cianidina-3-O-galactosídeo a mais abundante delas (MANE et al., 2011).

Estudos envolvendo as atividades farmacológicas do *Lingonberry* asseguram suas propriedades antioxidantes (KAHKONEN et al., 2003; VILJANEN et al., 2004; MANE et al., 2011), vasodilatadoras (KIVIMA, 2011) e antidiabéticas (SPOOR et al., 2007; HARBILAS et al., 2009). Além de possuir efeito sobre a modulação da função vascular e hipertensão (KIVIMA et al., 2013; 2014) e na proliferação de células cancerígenas (OLSSON et al., 2004).

Nosso grupo de pesquisa já avaliou o potencial de uma variabilidade de compostos fenólicos, incluindo o resveratrol, quercetina, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, ácido caféico e antocianinas (SCHMATZ et al., 2009; ABDALLA et al., 2014; SANTI et al., 2014; STEFANELLO et al., 2015; MUSHTAQ et al., 2014; ANWAR et al., 2013; GUTIERRES et al., 2014). Estes compostos tiveram a capacidade de modular a atividade de enzimas, reduzir o estresse oxidativo, contribuir nas anormalidades da função vascular observados em algumas patologias, bem como reverter danos causados ao SNC. Estudos relacionando o DM com a atividade antioxidante de compostos fenólicos têm sido amplamente relatados

na literatura, porém é importante observar o efeito conjunto destas moléculas, como no extrato de *Lingonberry*, sendo que esta é a forma mais comum no tratamento com compostos naturais.

Neste contexto, tendo em vista os inúmeros efeitos benéficos produzidos pelos flavonóides presentes nos *berries*, e o envolvimento do diabetes em complicações do SNC e como fonte de EROS, torna-se relevante investigar se o extrato de *Lingonberry* tem a capacidade de regular as alterações encontradas no sistema purinérgico e em reverter os danos oxidativos em córtex de animais experimentalmente induzidos ao diabetes tipo I.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito do tratamento com extrato de *Lingonberry* sobre a densidade de receptores purinérgicos, a atividade de ectonucleotidasas e parâmetros de estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos induzidos experimentalmente ao diabetes tipo I.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito do tratamento com extrato de *Lingonberry* na atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA em sinaptossomas de córtex de ratos diabéticos.
- Analisar a densidade dos receptores P2X7 e A1 em membranas totais de córtex de ratos diabéticos tratados com extrato de *Lingonberry*.
- Avaliar os níveis de peroxidação lipídica e EROs em córtex de ratos diabéticos tratados com extrato de *Lingonberry*.

3. MANUSCRITO

3.1 Manuscrito 1

Protective effect of *Lingonberry* extract on purinergic system and oxidative stress in diabetic rats.

Protective effect of *Lingonberry* extract on purinergic system and oxidative stress in diabetic rats.

Karine Paula Reichert^a, Jessie Martins Gutierres^a, Luana Paula Pelinson^a, Naiara Stefanello^a, Diéssica Padilha Dalonegare^a, Jucimara Baldissarelli^a, Thauan Faccin Lopes^a, Maria Rosa Chitolina Schetinger^a, Vera Maria Morsch

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

*Corresponding authors:

Vera Maria Morsch

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

Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Jessié Martins Gutierres

E-mail address: jessiegutierres@hotmail.com (J.M.Gutierres)

Laboratório de Enzimologia Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. Tel./fax: +55-55 3220 9557

Abstract

Aims: Investigate the protective effect of *Lingonberry* extract (LB) on NTPDase (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase), 5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA), density of P2X7 and A1 receptors and reactive oxygen species (ROS) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats.

Main methods: Animals were divided into five groups (n = 10): control/saline; control/LB 50 mg/kg; diabetic/saline; diabetic/LB 25 mg/kg and diabetic/LB 50 mg/kg. After 30 days of treatment with LB, the animals were euthanized and the cerebral cortex was removed for assays.

Key findings: NTPDase and 5'-nucleotidase activities were significantly decreased in the diabetic/saline group compared to control/saline group. Treatment with LB significantly increased NTPDase and 5'-nucleotidase activities in the diabetic/LB 50 group compared to diabetic/saline group. ADA activity no showed significant results. Western blot analyses demonstrated an increase in P2X7 receptor in the diabetic/saline compared to control/group, and LB in both doses was able to reverse this increase. In addition A1 receptor density was decreased in the diabetic/saline group compared to control/group, and LB elevated A1 receptor density. Also was found an increase of ROS and TBARS levels in the diabetic/group compared to control group, and LB can prevent this increase.

Significance: Diabetes cause changes on purinergic neurotransmission and increases the oxidative stress, conditions which may explain some long-term consequences of this pathology, such as cognitive impairment. LB can reverse these modifications observed in the diabetic state, suggesting that this fruit may be coadjuvant to treatment of diabetic patients.

Keywords: *Lingonberry* extract, cerebral cortex, NTPDase, 5'-nucleotidase, oxidative stress, A1 receptor, P2X7 receptor.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder that has taken considerable proportions in the worldwide. One the most common complications of diabetes is diabetic encephalopathy (DE), characterized by electrophysiological and structural abnormalities brain [1-3], that may contribute to cognitive dysfunctions as well as reported in diabetic state [4].

Adenine nucleotides and its nucleoside derivate, adenosine, are signaling molecules involved in several functions in central nervous system (CNS), including neurotransmission, synaptic plasticity, neuroprotection and neuromodulation [5-8]. ATP acts via the activation of specific ionotropic (P2X₁₋₇) and metabotropics (P2Y₁₋₁₅) receptors [9]. While the adenosine acts also through metabotropics receptors (A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃), and exerts its neuroprotective and neuromodulators effects mainly through the A₁ and A_{2A} receptors [9, 10].

Studies have shown that diabetes induced modifications in activation of purinergic and adenosinergic receptors [11, 12]. P2X₇ receptor (P2X_{7R}) is widely distributed in immune cells [13, 14] and also has an important role in development of neurologic disorders [15], being activated by high concentrations of ATP [16]. Furthermore, prolonged activation of P2X_{7R} causes the opening of a transmembrane pore, permeable to molecular weight molecules up to 800Da, leads to cellular death [16, 17].

A₁ receptors (A_{1R}) is the predominant subtype in the cortical areas, and is the key to the neuroprotection [9]. However, in brain damaging conditions the increased regulation of A_{2A} receptors (A_{2AR}) are responsible for decline in memory performance, according previous studies [9, 12, 18].

This molecules of purinergic system can be controlled by the activity of some enzymes localized on the cell surface, such as the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA). These enzymes are known as ectonucleotidases, and act together forming a cascade. E-NTPDase degrades ATP and ADP to AMP, which is then hydrolyzed by adenosine and 5'-nucleotidase and adenosine is finally deaminated to inosine by ADA [19-21].

In addition, chronic hyperglycemia of diabetes can significantly contribute to the overproduction of pro-oxidant molecules, leading to oxidative stress, a crucial

factor in the development and progression of diabetes [22, 23]. High levels of reactive oxygen species (ROS) are connected to cellular damage in the biomolecules including lipids, membranes, proteins, nucleic acids and eventually cell death [24].

Contrary to deleterious effects of oxidative stress, the polyphenolic compounds have a high ability to remove these reactive species and facilitate enhanced action antioxidant system [24]. More recently it has been demonstrated the important role of berries and fruits with high content of phenolic compounds, including a popular group of fruits that have many antioxidant effects called *Lingonberry* (*Vaccinium vitis-idaea* L.) [25], of family *Ericaceae*, which is used in the human diet. These fruit is rich in antioxidants and some studies shown benefic actions of Lingonberry [26-31] including modulation of the oxidant system [25, 27].

In this context, considering the numerous beneficial effects produced by phenolic compounds, it is relevant to investigate whether *Lingonberry* extract (LB) has the ability to regulate the alterations found in the purinergic system and reverted oxidative damage in cerebral cortex from streptozotocin-induced diabetic rats.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Nucleotides, nucleoside, Trizma Base, Percoll and Coomassie Brilliant Blue G were purchased from Sigma Chemical Co (St Luis, MO, USA). Streptozotocin (STZ) was purchased from Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Germany), and *Lingonberry* extract was gently donated by Christian Hansen A/S (with the main polyphenolic compounds analyzed by HPLC, representing 5.8% (w/w) of flavanols, 2.9% of flavonols, 1.9% of phenolic acids and 1.5% of anthocyanins [25]). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2. Animals

Adult male Wistar rats (70–90 days; 250–280 g) from the Central Animal House of the University Federal of Santa Maria (UFSM) were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23 ± 1 °C) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were

approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 3895051214).

2.3. Experimental induction of diabetes

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 55 mg/kg streptozotocin (STZ) diluted in 0.1M sodium-citrate buffer (pH 4.5). The age-matched control rats received an equivalent amount of the sodium-citrate buffer. STZ-treated rats received 5% of glucose instead of water for 24 h after diabetes induction in order to reduce death due to hypoglycemic shock. Blood samples were taken from the tail vein 7 days after STZ or vehicle injection to measure glucose levels [33, 34]. Glucose levels were measured with a portable glucometer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO, USA). Only animals with fasting glycemia over 250 mg/dl were considered diabetic and used for the present study.

2.4. Treatment with Lingonberry extract

The animals were randomly divided into five groups (ten rats per group): control/saline; control/LB 50 mg/kg; diabetic/saline; diabetic/LB 25 mg/kg and diabetic/LB 50 mg/kg [25]. *Lingonberry* extract was diluted in distilled water and administrated via gavage between 11 and 12 a.m. once a day during 30 days, at a volume not exceeding 1 ml/kg.

2.5. Brain tissue preparation

After treatment, the animals were anesthetized under isoflurane atmosphere before being killed by decapitation and brain was removed and separated into cerebral cortex (CC) and placed in a solution of Tris-HCl 10mM, pH 7.4, on ice. The cerebral cortex was gently homogenized in a glass potter in Tris-HCl solution. Aliquots of resulting CC homogenates were stored at -20°C until utilization [35]. Protein was determined previously in a strip that varied between 0.7 mg/ml - 0.8 mg/ml, as determined by the Coomassie blue method according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard solution [36].

2.6. Synaptosomes preparation

Synaptosomes were isolated essentially as previously described by Nagy and Delgado-Escueta (1984) [37], using a discontinuous Percoll gradient. The CC was gently homogenized in 10 volumes of an ice-cold medium (medium I) containing 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, pH 7.5, in a motor driven Teflon-glass homogenizer and then centrifuged at 1000xg for 10 min. An aliquot of 0.5 mL of the crude mitochondrial pellet was mixed with 4.0 mL of an 8.5% Percoll solution and layered into an isosmotic discontinuous Percoll/sucrose gradient (10%/16%). The synaptosomes that banded at the 10/16% Percoll interface were collected with a wide-tip disposable plastic transfer pipette. The synaptosomal fraction was washed twice with an isosmotic solution consisting of 320 mM sucrose, 5.0 mM HEPES, pH 7.5, and 0.1mM EDTA by centrifugation at 15,000 g to remove the contaminating Percoll. The pellet of the second centrifugation was resuspended in an isosmotic solution to a final protein concentration of 0.4-0.6 mg/ml. Synaptosomes were prepared fresh daily and maintained at 0°- 4° throughout the procedure and used for NTPDase, 5'-nucleotidase and Adenosine Deaminase (ADA) assays.

2.7. NTPDase and 5'-nucleotidase activities assays

The NTPDase enzymatic assay of the synaptosomes was carried out in a reaction medium containing 5mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 0.1mM EDTA, 10mM glucose, 225mM sucrose and 45mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200µl as described in a previous work from our laboratory [38]. Twenty microliters of enzyme preparation (8–12µg of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0mM and incubation proceed for 20 min in either case. The 5'-nucleotidase activity was determined essentially by the method of Heymann et al. [39] in a reaction medium containing 10mM MgSO₄ and 100mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200µl. Twenty microliters of enzyme preparation (8–12µg of protein) were added to the reaction mixture and pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 2.0mM and proceeded for 20 min. In all cases, reaction was

stopped by the addition of 200µl of 10% trichloroacetic acid (TCA) to obtain a final concentration of 15%. Following, the plates were chilled on ice for 10 min. The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan et al. [40] using malachite green as colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the synaptosomal fraction after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in triplicate. Enzyme activities are reported as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.8. ADA activity assays

The ADA activity in synaptosomes of cerebral cortex was determined according to Guisti and Galanti, (1984) [41] 50 µL of synaptosomes cortex will react with 21 mmol / L adenosine pH 6.5 and incubated at 37 ° C for 60 min. This method is based on the direct production of ammonia when ADA operates in excess of adenosine. The results are expressed in U/L of protein for ADA. One unit (1 U) of ADA is defined as the amount of enzyme required to release one mmol of ammonia per minute from adenosine, under standard test conditions.

2.9. Western blot

The determination of the density of P2X7 and A1 receptors were carried out by Western blot analysis, as previously described by Duarte et al. (2005) [42]. Briefly, each sample was diluted with five volumes of SDS-PAGE buffer containing 30% (v/v) glycerol, 0.6 M dithiothreitol, 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate and 375 mM Tris-HCl pH 6.8, and boiled at 95 ° C for 5 min. These diluted samples were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (7.5% separation gel with a 4% concentrating gel in the top) under reducing conditions, in two or three different protein concentrations, together with pre-stained molecular weight markers (Biorad, USA), and then electro transferred to polyvinylidene difluoride membranes (0.45 µm, from Amersham Biosciences, UK). After blocking for 1 h at room temperature with 5% milk in Tris-buffered saline (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.6), containing 0.1% Tween 20 (TBS-T), the membranes were incubated overnight at 4 ° C with the primary antibodies against P2X7R (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Brazil) and A1R (1:800, Santa Cruz Biotechnology, Brazil). The

selectivity of the tested antibodies against cerebral cortex P2X7 and A1 receptors has previously been validated. After three 15 min washing periods with TBS-T containing 0.5% milk, the membranes were incubated with the alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG or anti-goat IgG secondary antibody (dilution 1:10,000) in TBS-T containing 1% milk during 90 min at room temperature. After three 20 min washes in TBS-T with 0.5% milk the membranes were incubated with enhanced chemi-fluorescent substrate (Amersham Biosciences) and then analyzed with a Amersham Imager 600 (GE Healthcare life Sciences). The membranes were then reprobed and tested for β -actin immunoreactivity to confirm that similar amounts of protein were applied to the gels. Briefly, the membranes were incubated at room temperature for 30 min with 40% (v/v) methanol and 1 h with 0.1 M glycine buffer pH 2.3, and then blocked as previously described before incubation with an anti- β -actin antibody (dilution 1:10,000) for 2 h at room temperature. The membranes were then washed, incubated with an anti-mouse IgG alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody and analyzed as described above.

2.10. Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) production

2'-7'-Dichlorofluorescein (DCF) levels were determined as an index of the reactive species production by the cellular components [43]. The cerebral cortex was homogenized in medium containing Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) and aliquots (50 μ l) of brain supernatants were added to a and 2'-7'-dichlorofluoresceindiacetate DCFH-DA (1 mM). After DCFH-DA addition, the medium was incubated in the dark for 1 h until fluorescence measurement procedure (excitation at 488 nm and emission at 525 nm, and both slit widths used were at 1.5 nm). DCF levels were determined using a standard curve of DCF, and results were corrected by the protein content.

2.11. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) measurement

TBARS levels were determined according to Ohkawa et al. [44] by measuring of the concentration of malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Briefly, the reaction mixture, containing 200 μ l of cerebral cortex supernatants or standard (0.03mMMDA), 200 μ l

of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 500 μ l of 0.8% TBA and 500 μ l of acetic acid solution (2.5 M HCl, pH 3.4) was heated at 95 °C for 120min. The absorbance was measured at 532 nm. TBARS tissue levels were expressed as nmol MDA/mg of protein.

2.12. Protein determination

Proteins of ectonucleotidase assay was measured by the Coomassie blue method according to Bradford [36], and the western blot samples was measured by BCA kit assay, both using serum albumin as standard.

2.13. Statistical analysis

Statistical analysis used was *one-way ANOVA*, following by student Newman-Keuls test. $p < 0.05$ was considered to represent significant difference in all experiments. All data were expressed as mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1. Body weight and blood glucose

The body weight and blood glucose levels determined at the end of the experiment are shown in Table 1. As can be observed, the body weight at the onset of the study showed no significant differences among the groups [F(4,44) = 0,6715]. The body weight was significantly decreased in diabetic/saline, diabetic/LB 25, diabetic/LB 50 groups compared to control/saline group at the end of experiment [F(4, 44) = 27.79, $p < 0.0001$]. In relation to blood glucose levels no significant differences among the groups were observed at the onset of the experiment [F(4,44) = 1,8223]. In the diabetic rats were observed a significantly increased when compared with control groups [F(4,44)= 39,9; $p < 0,0001$]. However, the treatment with *Lingonberry* extract had no effects on body weight in diabetic/LB 25 and diabetic/LB 50 groups at the end of the study, which remained reduced in relation to the control/saline group. Treatment with *Lingonberry* extract per se also had no

effects on body weight in control/LB 50 group when compared to the control/saline group at the end of the study.

Table 1 The effect of different doses of *Lingonberry* extract (LB) on body weight and fasting blood glucose levels in control and diabetic rats at the onset (before induction) and the end of the experiment (30 days after *Lingonberry* extract treatment).

Groups	Body weight (g)		Blood glucose levels (mg/dL)	
	Onset	End	Onset	End
Control/saline	271 ± 2.05 ^a	383 ± 12.01 ^a	85 ± 8.21 ^a	81 ± 5.12 ^a
Control/LB 50 mg/kg	268 ± 5.23 ^a	368 ± 9.05 ^a	80 ± 12.04 ^a	89 ± 10.18 ^a
Diabetic/saline	273 ± 4.76 ^a	222 ± 7.72 ^b	79 ± 10.43 ^a	324 ± 12.41 ^b
Diabetic/LB 25 mg/kg	269 ± 8.17 ^a	230 ± 11.28 ^b	80 ± 9.92 ^a	315 ± 15.81 ^b
Diabetic/LB 50 mg/kg	275 ± 5.86 ^a	225 ± 9.57 ^b	83 ± 4.01 ^a	320 ± 14.21 ^b

Values are expressed as mean ± S.E.M. ($p < 0.0001$; $n = 10$). ANOVA-Newman-Keuls's test.

Different letters represent significant differences between groups.

3.2 NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activity in cerebral cortex synaptosomes

The results obtained for NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activity are shown in Figure 1. As can be observed, NTPDase activity with ATP as substrate was significantly decreased in the diabetic/saline group when compared to the control/saline group (Fig. 1A). Treatment with *Lingonberry* extract significantly increased ATP hydrolysis in the diabetic/LB 50 group when compared to the diabetic/saline group, but in the diabetic/LB 25 group no has significantly difference when compared to diabetic/ saline group. *Lingonberry* extract per se, no demonstrated a significant difference in ATP hydrolysis in the control/LB 50 group compared with the control/saline group [$F(4,44) = 4.966$; $p < 0.05$]. For ADP hydrolysis, a significant decrease in the diabetic/saline group was observed when compared to the control/saline group (Fig. 1B). *Lingonberry* extract significantly increased ADP hydrolysis in the diabetic/LB 50 group when compared to the diabetic/saline group, but in the diabetic/LB 25 group no has significantly difference when compared to diabetic/saline group. On the other hand, *Lingonberry* extract per se, no demonstrated a significant decrease in ADP hydrolysis in the control/LB 50 group compared to the control/saline group ($F(4,44) = 3.309$; $p < 0.05$). The results obtained for 5'-nucleotidase activity were similar to those found for NTPDase activity (Fig. 1C). Post hoc analysis revealed that AMP hydrolysis was also significantly decreased in the diabetic/saline group when compared with the control/saline group. Treatment with

Lingonberry extract significantly increased AMP hydrolysis in the diabetic/LB 50 group when compared to the diabetic/saline group, but, the treatment with *Lingonberry* extract in the diabetic/LB 25 group no has significantly difference when compared to diabetic/ saline group. Besides, the treatment with *Lingonberry* extract per se no provoked a significant effect in AMP hydrolysis in the control/LB 50 when compared to the control/saline group [F(4,44)= 9.844; $p < 0.05$]. In relation to the ADA activity (Fig. 1D) no has showed significant difference for any group [F(4,44)= 0.2105].

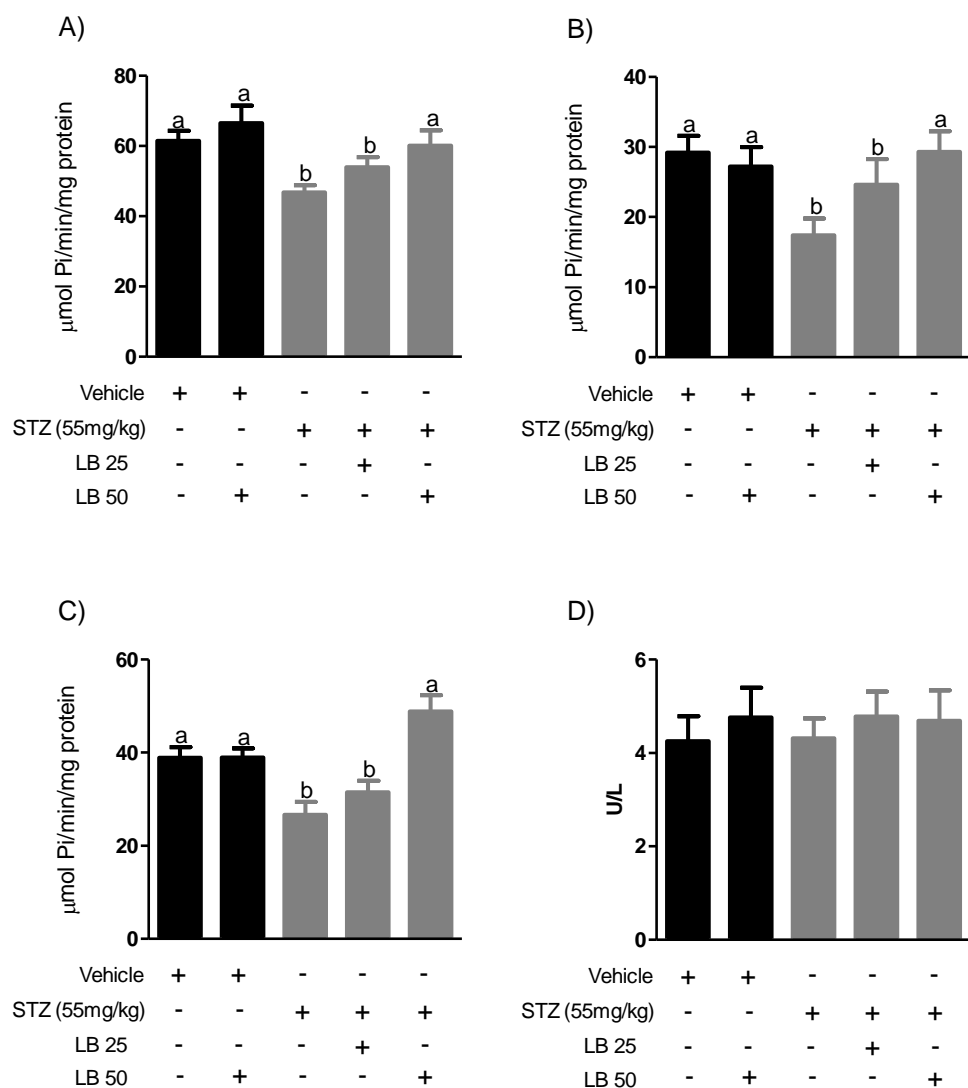


Fig. 1. NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activity in cerebral cortex synaptosomes from STZ-induced diabetic rats treated with *Lingonberry* extract using ATP (A), ADP (B), AMP (C) and adenosine (D) as substrate. Different letters represent significant differences between groups. Values are expressed as mean \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 10$). ANOVA Newman-Keuls's test.

3.3. Western Blot analysis of P2X7 and A1 receptors in total membranes of cerebral cortex

The results obtained for Western Blot analysis of P2X7 and A1 receptors are shown in Figure 2. Western blot analysis for P2X7 receptor density in cerebral cortex showed a significant increase in diabetic/saline in comparison all groups. Both diabetic/LB 25 and diabetic/LB 50 showed a significant decrease in P2X7 receptor density in comparison to diabetic group ($16.15 \pm 4.5\%$ and $18.54 \pm 5.2\%$, respectively, $n=5$, $p < 0.05$). As well as, control/LB 50 compared to control/saline ($15.4 \pm 4.34\%$, $n=5$, $p < 0.05$) (Fig. 2A). The cerebral cortex density for A1 receptor showed a significant decrease in A1 of STZ-induced diabetes in comparison to control/saline group ($48.14 \pm 8.4\%$, $n=5$, $p < 0.05$). Both diabetic/LB 25 and diabetic/LB 50 showed a significant increase in A1 receptor density in comparison to diabetic group ($80.39 \pm 14.0\%$ and $75.57 \pm 13.1\%$, respectively, $n=5$, $p < 0.05$). As well as, control/LB 50 showed a significant increase in comparison to control/group ($45.36 \pm 7.8\%$, $n=5$, $p < 0.05$) (Fig. 2B).

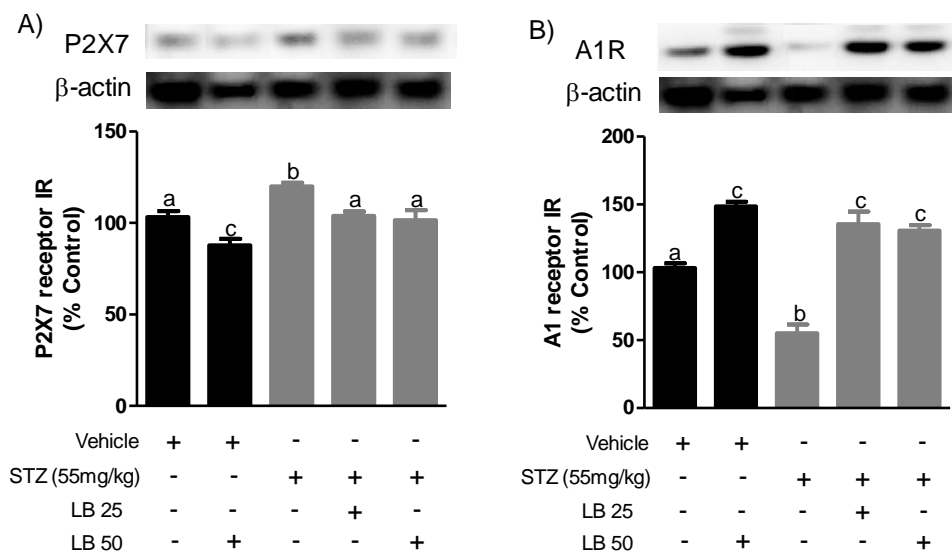


Fig 2. Western blot quantification of P2X7 (A) and A1 (B) receptors in total membranes of cerebral cortex of rats treated with *Lingonberry* extract and STZ-induced diabetes. β -actin loading control antibody was used to normalize the levels of protein. Values are expressed as mean \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 5$). ANOVA Newman-Keuls's test.

3.4. Analysis of reactive oxygen species in samples of cerebral cortex

The results obtained for ROS showed in Figure 3A. As can be observed that ROS production was significantly increased in cerebral cortex in the diabetic/saline group when compared control/saline group. The treatment with *Lingonberry* extract decreased ROS production in the diabetic/LB 50 group when compared with diabetic/saline group, but in the diabetic/LB 25 no has significant difference when compared diabetic/saline group. The treatment with *Lingonberry* extract per se also no has significant differences when compared with control/saline group [F(4,44)= 5.042; $p < 0.05$].

3.5. Analysis of Thiobarbituric acid reactive substances in samples of cerebral cortex

The results obtained for TBARS showed in Figure 3B. As can be observed that TBARS levels was significantly increased in cerebral cortex in diabetic/saline group when compared control/saline group. The treatment with *Lingonberry* extract decreased TBARS levels in both diabetic/LB 25 and diabetic/LB 50 groups when compared with diabetic/ saline group. However the treatment with *Lingonberry* extract per se no has significant differences when compared with control/saline group [F(4,44)= 6.166; $p < 0.05$].

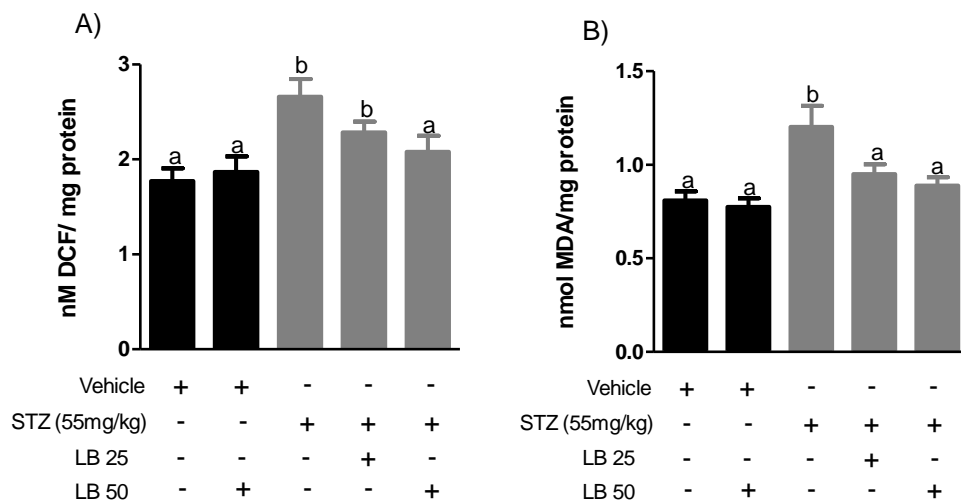


Fig. 3. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production by 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) levels (A) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (B) in the cerebral cortex from STZ- induced diabetic rats treated whit *Lingonberry* extract. Different letters represent significant differences between groups. Values are expressed as mean \pm S.E.M. ($p < 0.05$; $n = 10$). ANOVA Newman-Keuls's test.

4. Discussion

Diabetes mellitus is well recognized by induced cerebral damage causing cognitive impairments, accompanied by functional and neurochemical abnormalities [2, 45, 46]. In addition, studies have demonstrated that polyphenolic compounds can prevent or reverse the cerebral complications of diabetes [47]. However, the effects of Lingonberry extract, which presents a wide variety of phenolic compounds, on purinergic neurotransmission in experimental model of diabetes are unknown. In the present study we investigate the effects of Lingonberry extract on purinergic system and oxidative stress in cerebral cortex synaptosomes from STZ-induced diabetic rats.

Our results demonstrated alterations in purinergic signaling during diabetes. Western blot analysis showed that the density of P2X7 receptor increased in DM and treatment with *Lingonberry* extract, in both doses, was able to reverse this effect. It is well established that P2X7R is involved in immunological functions [14] stimulating proinflammatory cytokines release (IL-1 β), also expressed by neurons and is activated in response to injury [48] and has potent cytotoxic activity by evokes glutamate release [49]. Moreover, enhanced P2X7R activity plays a function in complications associated with diabetes, including renal inflammation, vascular damage and retinopathy [50-53]. And these modifications in density of P2X7R may lead to decreased of the physiological actions of ATP such as long-term potentiation (LTP), contributing to cognitive decline diabetes-induced [11].

In addition, were observed a significant decreased for A1R expression in diabetic group, however, the treatment with *Lingonberry* extract in all groups was able to increase this expression (Fig. 2B). It is well recognized that a down-regulation for A1R is associated with cognitive impairment, since this receptor is involved in neuroprotection and memory formation [10]. Considering that A1R is activated in low adenosine concentrations [54], it is believed that have high adenosine concentrations in the middle extracellular and we suggest that *Lingonberry* extract can alter the adenosine levels, or promoting an enhanced expression of A1R, as observed in control and diabetic groups treated with *Lingonberry* extract.

The results for ATP, ADP, and AMP hydrolysis was decreased in the STZ-induced diabetic rats (Fig. 1A, B and C), while the ADA had no significant difference. The treatment with *Lingonberry* extract at the dose of 50 mg/ kg reversed the effects in the NTPDase and 5'-nucleotidase activity and, approaching the control group or

was even better than the control group. The extracellular catabolism of ATP is an important pathway signaling clearly identified in the brain and regulates several physiological functions [55]. ATP acts both as a fast excitatory neurotransmitter and as a neuromodulator thus are involved in mechanisms of synaptic transmission and memory formation as well as protective role in several diseases [56, 57].

On the other hand, ATP is liberating in most quantities during neuronal injury can promote an increase intracellular calcium levels, causing neuronal dysfunction and cell death [58]. Considering that the P2X7R is activated in high ATP concentrations and then nucleotide is liberating in most quantities during neuronal injury, this increased of P2X7R is in accordance with that [15]. In addition, this increase in intracellular calcium levels may occur due to the fact that P2X7 receptor induces the formation of transmembrane pores, by which may occur by intrusion of calcium into cells [17, 59].

In relation to adenosine levels resulting from the action of 5'-nucleotidase, it is believed that it is being formed in higher quantities in diabetes, due to a lower expression of A1R in diabetic group. But, not possible say if adenosine degraded faster or not because there were not found significant results for ADA activity. Adenosine, is a molecule that has an important role in the control of brain damage, acting through the A1 and A2A receptors. Activation of A1Rs appear to be related to modulation of cognitive responses such as memory, learning and neuroprotection [60], a decrease of this receptor may contribute to the cognitive impairments associated with DM [61]. Studies indicate a modification in density of adenosine receptors in hippocampus of streptozotocin-induced diabetes, in particular down-regulation of inhibitory A1R and an up-regulation of facilitatory A2AR [12]. Thus, it is believed that the decrease A1R expression in diabetic/saline group may contribute to deficits in cognition well described in diabetes.

Furthermore, it is well established in the literature that during the diabetes occur overproduction of reactive oxygen species, leading to oxidative stress, which causes noxious damage to the brain [22, 62-65]. *Lingonberry* extract, rich in polyphenolic compounds, can revert this increase as observed in diabetic/LB 25 and diabetic/LB 50 groups (Fig. 3A), demonstrating its potential antioxidant and, preventing the prevalence of oxidative damage in cortical neurons and consequently can improve synaptic plasticity.

In addition to these findings, previous studies have shown that P2X7R activation in immune cells induces ROS production mainly through of the NADPH oxidase complex 2 (NOX2), as well as in microglia and these events may be attenuated in the presence of antioxidants as N-acetylcysteine and ascorbic acid [66].

Contributing to this data, we also found an increase in lipid peroxidation in diabetic group when compared with control group (Fig. 3B). This increase has been reverted by *Lingonberry* extract treatment in both doses (25 and 50 mg/kg). Thus, we believe that the peroxidation of membrane can lead to decrease in density of receptors and ectoenzymes since most are located in the membrane, as can be seen in the results of the activities of ectonucleotidases and density of the A1 receptor. In addition, some studies demonstrated that lipid peroxidation decrease number of A1 binding sites, this might imply that A1R mediated neuromodulation and neuroprotection may be reduced in consequence of oxidative damage of membrane constituents [67].

5. Conclusion

The results of our study demonstrate that diabetes causes modifications NTPDase and 5'-nucleotidase activities, as well as on density of P2X7 and A1 receptors in cerebral cortex, indicating that the purinergic neurotransmission may be impaired, it can even be one of main cause of cognitive decline observed in both patients and diabetic animals. Furthermore, in diabetic condition also have an overproduction of ROS, mainly due the hyperglycemia, and contribute for damage in biomolecules important to several biological functions. In addition, the treatment with *Lingonberry* extract can prevent the damage associated to oxidative stress and purinergic signaling, suggesting that this fruit has many beneficial properties and that their consumption may help minimize some of the major consequences resulting from the diabetes. However, more studies are necessary to clarify the mechanisms by which this occurs.

Acknowledgments

This study was supported by the Christian Hansen LTDA, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à

Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] E. van Duinkerken, M. Klein, N. S. Schoonenboom, R. P. Hoogma, A. C. Moll, F. J. Snoek, C. J. Stam, M. Diamant, Functional brain connectivity and neurocognitive functioning in patients with long-standing type 1 diabetes with and without microvascular complications: a magnetoencephalography study, *Diabetes*. 10 (2009) 2335-43.
- [2] A. M. A. Brands, R. P. C. Kessels, E. H. F. de Haan, L. J. Kappelle, G. J. Biessels, Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk factors and bloodglucose levels, *Eur. J. Pharmacol.* 490 (2004) 159–168.
- [3] A. A. Sima, Encephalopathies: the emerging diabetic complications, *Acta Diabetol.* 47 (2010) 279-93.
- [4] G. J. Biessels, Cerebral complications of diabetes: clinical findings and pathogenetic mechanisms, *Neth J Med.* 54 (1999) 35-45.
- [5] G. Burnstock, Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission, *Physiol Rev.* 87 (2007) 659-797.
- [6] G. Burnstock, Historical review: ATP as a neurotransmitter, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 166–176.
- [7] A. Wieraszko, Y. H. Ehrlich, On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus, *J Neurochem.* 63 (1994) 1731-8.
- [8] R. A. Cunha, Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors, *Neurochem. Int.* 38 (2001) 107–125.
- [9] V. Ralevic, G. Burnstock, Receptors for Purine and Pyrimidines. *Pharmacol. Rev.*, 50 (1998) 413-492.
- [10] R. A. Cunha, Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal.* 1 (2005)111–134.
- [11] J.M. Duarte, J.P. Oses, R.J. Rodrigues, R.A. Cunha, Modification of purinergic signaling in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats, *Neurosci.* 149 (2007) 382–391.
- [12] J. M. N. Duarte, C. R. Oliveira, A. F. Ambrosio, R. A. Cunha, Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Int.* 48 (2006) 144–150.

- [13] F. Di Virgilio, J. M. Sanz, P. Chiozzi, S. Falzoni, The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. *Prog Brain Res.* 120 (1999) 355-68.
- [14] F. di Virgilio F, P. A. Borea, P. Illes, P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol Sci*, 22 (2001) 5-7.
- [15] B. Sperlágh, E. S. Vizi, K. Wirkner, P. Illes, P2X7 receptors in the nervous system, *Prog Neurobiol.* 78 (2006) 327-46.
- [16] G. Collo, S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R. A. North, G. Buell, Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacol.* 36 (1997) 1277–1283.
- [17] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, G. Buell, The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7), *Science*, 272 (1996) 735-8.
- [18] P. D. Morrison, M. W. Mackinnon, J. T. Bartrup, P. G. Skett, T. W. Stone, Changes in adenosine sensitivity in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Br J Pharmacol.* 105 (1992) 1004-8.
- [19] S. Robson, J. Sévigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance, *Purinergic Signal.* 2 (2006) 409–430.
- [20] H. Zimmermann, Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.*, 52 (2001) 44–56.
- [21] G.G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 673–694.
- [22] J. L. Rains, S. K. Jain, Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 50 (2011) 567-75.
- [23] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, 414 (2001) 813-20.
- [24] A. C. Maritim, R. A. Sanders, J. B. Watkins, 3rd, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *J Biochem Mol Toxicol.* 17 (2003) 24-38.
- [25] C. Mane, M. Loonis, C. Juhel, C. Dufour, C. Malien-Aubert, Food grade lingonberry extract: polyphenolic composition and in vivo protective effect against oxidative stress, *J Agric Food Chem.* 59 (2011) 3330-9.
- [26] A. S. Kivimäki, P. I. Ehlers, A. M. Turpeinen, H. Vapaatalo, R. Korpela, Lingonberry juice improves endothelium-dependent vasodilatation of mesenteric arteries in spontaneously hypertensive rats in a long-term intervention, *Journal of Functional Foods* , 3 (2011) 267-274.

- [27] A. S. Kivimäki, A. Siltari, P. I. Ehlers, R. Korpela, H. Vapaatalo, Lingonberry juice negates the effects of a high salt diet on vascular function and low-grade inflammation, *Journal of Functional Foods*, 7 (2014) 238–245.
- [28] A. S. Kivimäki, A. Siltari, P. I. Ehlers, R. Korpela, H. Vapaatalo, Lingonberry juice lowers blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR), *Journal of Functional Foods*, 5 (2013) 1432–1440.
- [29] M. E. Olsson, K. E. Gustavsson, S. Andersson, A. Nilsson, R. D. Duan, Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels, *J Agric Food Chem*. 52 (2004) 7264-71.
- [30] D. Harbilas, L. C. Martineau, C. S. Harris, D. C. Adeyiwola-Spoor, A. Saleem, J. Lambert, D. Caves, T. Johns, M. Prentki, A. Cuerrier, J. T. Arnason, S. A. Bennett, P. S. Haddad, Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II, *Can J Physiol Pharmacol*. 87 (2009) 479-92.
- [31] H. M. Eid, P. S. Haddad, Mechanisms of Action of Indigenous Antidiabetic Plants from the Boreal Forest of Northeastern Canada, *Advances in Endocrinology*, 2014 (2014) 1- 11.
- [32] K. Viljanen, P. Kylli, R. Kivikari, M. Heinonen, Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics, *J Agric Food Chem*. 52 (2004) 7419-24.
- [33] R. Schmatz, C. M. Mazzanti, R. Spanevello, N. Stefanello, J. Gutierrez, P. A. Maldonado, M. Correa, V.M. Morsch, Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin induced diabetic rats and treated with resveratrol, *Brain Res. Bull*. 80 (2009) 371-376.
- [34] A. Kumar, R. K. Kaundal, S. Iyer, S. S. Sharma, Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci*, 80 (2007) 1236–1244.
- [35] J. M. Gutierrez, R. R. Kaizer, R. Schmatz, C. M. Mazzanti, J. M. Vieira, M. V. Rodrigues, J. Jaques, F. Carvalho, D. Zanini, V. M. Morsch, M. R. C. Schetinger, R. M. Spanevello, α -Tocopherol regulates ectonucleotidase activities in synaptosomes from rats fed a high-fat diet. *Cell Biochemistry and Function*, 30 (2012) 286-92.
- [36] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72 (1976) 248–54.
- [37] A. Nagy, A.V. Delgado Escueta, Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using non-toxic isosmotic gradient material (Percoll), *J. Neurochem*. 43 (1984) 1114–1123.
- [38] M.R.C. Schetinger, N.M. Porto, M.B. Moretto, V.M. Morsch, J.B.T. da Rocha, V. Vieira, F. Moro, R.T. Neis, S. Bittencourt, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, New

benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities, *Neurochem. Res.* 25 (2000) 949–955.

[39] D. Heymann, M. Reddington, G. W. Kreutzberg, Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J Neurochem* 43 (1984) 971–8.

[40] K. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -NTPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–378.

[41] G. Guist, B. Galanti, Colorimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, (1984) 315–323.

[42] J. M. Duarte, R. A. Carvalho, R. A. Cunha, R. Gruetter, Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem*, 111 (2009) 368-79.

[43] O. Myhre, J. M. Andersen, H. Aarnes, F. Fonnum, Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol.* 65 (2003) 1575–82.

[44] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95 (1979) 351–8.

[45] M. Huang, L. Gao, L. Yang, F. Lin, H. Lei, Abnormalities in the brain of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging, *Neuroimage Clin.* 1(2012) 57–65.

[46] J. P. Hernández-Fonseca, J. Rincón, A. Pedrañez, N. Viera, J. L. Arcaya, E. Carrizo, J. Mosquera, Structural and Ultrastructural Analysis of Cerebral Cortex, Cerebellum, and Hypothalamus from Diabetic Rats, 2009 (2009) 1-12.

[47] K. B. Pandey, S. I. Rizvi. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxid Med Cell Longev*, 2:5 (2009) 270-278.

[48] S. A. Deuchars, L. Atkinson, R. E. Brooke, H. Musa, C. J. Milligan, T. F. Batten, N. J. Buckley, S. H. Parson, J. Deuchars, Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems, *J Neurosci.* 21 (2001) 7143-52.

[49] A. Doble, The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy, *Pharmacol Ther.* 81 (1999) 163-221.

- [50] A. Solini, S. Menini, C. Rossi, C. Ricci, E. Santini, F. C. Blasetti, C. Iacobini, G. Pugliese, The purinergic 2X7 receptor participates in renal inflammation and injury induced by high-fat diet: possible role of NLRP3 inflammasome activation, *J Pathol.* 231 (2013) 342-53.
- [51] A. Solini, P. Chiozzi, A. Morelli, E. Adinolfi, R. Rizzo, O. R. Baricordi, F. Di Virgilio, Enhanced P2X7 activity in human fibroblasts from diabetic patients: a possible pathogenetic mechanism for vascular damage in diabetes, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24 (2004) 1240-5.
- [52] A. Solini, P. Chiozzi, S. Falzoni, A. Morelli, R. Fellin, F. Di Virgilio, High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts, *Diabetologia.* 43 (2000) 1248-56.
- [53] T. Sugiyama, M. Kobayashi, H. Kawamura, Q. Li, D. G. Puro, Enhancement of P2X(7)-induced pore formation and apoptosis: an early effect of diabetes on the retinal microvasculature, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45 (2004) 1026-32.
- [54] P. Correia-de-Sá, J. A. Ribeiro, Adenosine uptake and deamination regulate tonic A2a-receptor facilitation of evoked [3H]-ACh release from the motor nerve terminals. *Neurosci.* 73,(1996) 85-92.
- [55] M. P. Abbracchio, G. Burnstock, Purinergic signalling: pathophysiological roles, *Jpn J Pharmacol.* 78 (1998) 113-45.
- [56] M.R. Schetinger, V.M.Morsch, C. Bonan, A. Wyse, NTPDase and 5_-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health, *Biofactors* 31 (2008) 77–98.
- [57] H. Zimmermann, Nucleotide signaling in nervous system development, *Pflugers Arch.* 452 (2006) 573-88.
- [58] G.J. Biessels, M.P. Laak, F.P.T. Hamers, W.H. Gispen, Neuronal Ca²⁺ dysregulation in diabetes mellitus, *Eur. J. Pharmacol.* 447 (2002) 201–209.
- [59] M. Fumagalli, R. Brambilla, N. D'Ambrosi, C. Volonté, M. Matteoli, C. Verderio, M. P. Abbracchio, Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors, *Glia.* 43 (2003) 218-03.
- [60] J. A. Ribeiro, A. M. Sebastião, A. de Mendonça, Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications, *Prog Neurobiol.* 68 (2002) 377-92.
- [61] R. D. Prediger, L.C. Batista, R. N. Takahashi, Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors, *Neurobiol Aging.* 26 2(005) 957-64.

- [62] N. S. Calgaroto, P. da Costa, A. M. Cardoso, L. B. Pereira, J. M. Vieira, D. Dalenogare, L. P. Pelinson, J. Baldissarelli, V. M. Morsch, M. R. C. Schetinger, Vitamin D₃ prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats, *Mol Cell Biochem.* 405 (2015) 11-21.
- [63] C. F. Wang, D. Q. Li, H. Y. Xue, B. Hu, Oral supplementation of catalpol ameliorates diabetic encephalopathy in rats, *Brain Res.* 1307 (2010) 158-65.
- [64] R. Schmatz, C. M. Mazzanti, R. Spanevello, N. Stefanello, J. Gutierrez, M. Corrêa, M. M. da Rosa, M.A. Rubin, M. R. C. Schetinger, V. M. Morsch, Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats, *Eur J Pharmacol.* 610 (2009) 42-8.
- [65] A. Kuhad, K. Chopra, Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences, *Eur J Pharmacol.* 576 (2007) 34-42.
- [66] Z. A. Pfeiffer, A. N. Guerra, L. M. Hill, Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 42 (2007) 1506–1516.
- [67] J. C. Oliveira, M. D. Constantino, A. M. Sebastião, J. A. Ribeiro, Ascorbate/Fe(3+)-induced peroxidation and inhibition of the binding of A1 adenosine receptor ligands in rat brain membranes, *Neurochem Int.* 26 (1995) 263-8.

4. CONCLUSÃO

- 1) O extrato de *Lingonberry* reverteu as reduções das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase.
- 2) O extrato de *Lingonberry* reduziu a expressão do P2X7R.
- 3) O extrato de *Lingonberry* aumentou a expressão do A1R.
- 4) O extrato de *Lingonberry* reduziu os níveis de EROs.
- 5) O extrato de *Lingonberry* diminuiu a peroxidação lipídica.

Tomando em conjunto todos esses dados, e tendo em vista que uma ativação do P2X7R pode causar danos às células, e que uma redução na expressão do A1R está fortemente ligada a disfunções cognitivas, uma vez que este receptor possui propriedades neuroprotetoras e neuromoduladoras, pode-se afirmar que o extrato de *Lingonberry* possui propriedades benéficas que agem sinergicamente no organismo, conferindo proteção e prevenção contra as anormalidades oriundas do DM. Desta forma, este fruto pode ser um alvo terapêutico na contribuição do tratamento de pacientes diabéticos.

REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P. et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 281-341, 2006.
- ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, p. 445-475, 1994.
- ABDALLA, F. H. et al. Protective effect of quercetin in ecto-enzymes, cholinesterases, and myeloperoxidase activities in the lymphocytes of rats exposed to cadmium. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 396, p. 201-211, 2014.
- AHMED, S. et al. A facile electrochemical analysis to determine antioxidant activity of flavonoids against DPPH radical. **The Electrochemical Society**, v.159, p. 103-109, 2012.
- AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, p. 60-64, 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, p. 2442-2450, 2014.
- ANWAR, J et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 459-466, 2013.
- ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: potential as therapeutic targets. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 36, p. 217-222, 2006.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **The Lancet**, v. 358, p. 221-229, 2001.
- BALLERINI, P. et al. Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. **Neuroreport**, v. 7, p. 2533-7, 1996.
- BARREIROS, A.; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARRIE, A.P.; NICHOLLS, D.G. Adenosine A1 receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, p. 1081-1086, 1993.
- BENNETT, R. A.; PEGG, A. E. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. **Cancer Research**, v. 41, p. 2786-2790, 1981.
- BIESSELS, G.J. et al. Cerebral metabolism in streptozotocin-diabetic rats: an in vivo magnetic resonance spectroscopy study. **Diabetologia**, v. 44, p. 346-353, 2001.

BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Advances in Immunology**, v. 86, p. 1-41, 2005.

BOLAÑOS, J.P. et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1299–1315, 2009.

BOLZAN, A. D.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutation Research**, v. 512, p. 121-134, 2002.

BOMFIM, T. R. et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1339-53, 2012.

BONAN, C.D. et al. Inhibitory avoidance learning ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. **Neurochemical Research**, v. 23, p. 979–984, 1998.

BONAN, C.D. et al. Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. **Brain Research**, 854, 253–256, 2000.

BONDY, C. A.; CHENG, C.M. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, p. 25-31, 2004.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**. vol. 112, p. 358–404, 2006.

BRANDLE, U.; KOHLER, K.; WHEELER-SCHILLING, T. H. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. **Brain Res Molecular Brain Research**, v. 62, p. 106-9, 1998.

BRANDS, A. M. A. Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk factors and bloodglucose levels. **European Journal Pharmacology**, v. 490, p. 159–168, 2004.

BRANDS, A.M. et al. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 28, p. 726–735, 2005.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRUNDEGE, J. M.; DUNWIDDIE, T. V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. **Advances in Pharmacology**, v. 39, p. 353-391, 1997.

BURNSTOCK, G. Cotransmission. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 47–52, 2004.

BURNSTOCK, G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. **Physiological reviews**, v. 87, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24, p. 509-81, 1972.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31-304, 2004.

CALGAROTO, N. S. et al. Vitamin D3 prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats. **Molecular Cellular and Biochemistry**, v. 405, p. 11–21, 2015.

CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 39, p. 841-852, 2005.

CHIU, S. L.; CHEN, C. M.; CLINE, H. T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. **Neuron**, v. 58, n. 5, p. 708–719, 2008.

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

COLLO, G. et al. Tissue distribution of the P2X7 receptor. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1277–1283, 1997.

CORREIA-DE-SÁ, P.; RIBEIRO, J. A. Adenosine uptake and deamination regulate tonic A2a-receptor facilitation of evoked [3H]-ACh release from the motor nerve terminals. **Neuroscience**, v. 73, p. 85-92, 1996.

CRAFT, S. et al. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. **Neurology**, v. 50, p. 164–168, 1998.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 2, p. 107-25, 2001.

CUNHA, R.A. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 111–134, 2005.

DEUCHARS, S. A. et al. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 7143-52, 2001.

Di VIRGILIO, F. et al. The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. **Progress in Brain Research**, v. 120, p. 355-68, 1999.

DICKINSON, C.J. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. **Clinical Science**, v.91, p.539-550, 1996.

DIENEL, G. A. Fueling and imaging brain activation. **ASN Neuro**, v. 4, n. 5, 2012.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Classificação etiológica do diabetes *mellitus*, 2013-2014.

DUARTE, J. M. et al. Modification of purinergic signaling in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuroscience**, v. 149, p. 382–391, 2007.

DUINKERKEN, E. van. et al. Functional Brain Connectivity and Neurocognitive Functioning in Patients With Long-Standing Type 1 Diabetes With and Without Microvascular Complications. **Diabetes**, v. 58, p. 2335–2343, 2009.

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

ERLICH, H. et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, p.1084, 2008.

FERRARI, D. et al. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 1531-9, 1996.

FORRESTER, T. et al. Effect of adenosine triphosphate and some derivatives on cerebral blood flow and metabolism. **The Journal of Physiology**, v. 296, p. 343-355, 1979.

FOWLER, M. J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 26, p. 77-82, 2008.

FREDHOLM, B.B. et al. Neuromodulatory roles of purines. **Drug Development Research**, v. 28, p. 349–353, 1993.

GODWIN, A.; PRABHU, H. Lipid peroxidation of fish oils. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 202-204, 2006.

GOLLUCKE, A. P. et al. Polyphenols: a nutraceutical approach against diseases. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 214-9, 2013.

GORDON, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. **Biochemical Journal**, v. 233, p. 309-19, 1986.

HARBORNE, J. B. The flavonoids: advances in research since 1986. **Phytochemical Analysis**, v. 6, n. 1, p. 55, 1995.

HARRIS, J. J. et al. Synaptic energy use and supply. **Neuron**, v. 75, p. 762–777, 2012.

HIDE, I. et al. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia. **Journal of Neurochemistry**, 75, 965-72, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Facts & Figures**. <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>. Acessado em agosto de 2014.

JOHN, W. G. UK Department of Health Advisory Committee on Diabetes. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK. The implementation **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

KAPOGIANNIS, D.; MATTSON, M. P. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Lancet Neurology**, v. 10, p. 187–198, 2011.

KEGEL, B. et al. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1189–1200, 1997.

KIVIMAKI, A. S. et al., Lingonberry juice lowers blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1432-1440, 2013.

KIVIMAKI, A. S. et al., Lingonberry juice negates the effects of a high salt diet on vascular function and low-grade inflammation. **Journal of Functional Foods**, v.7, p. 238-245, 2014.

KÖLES, L. et al. Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. **Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology**, v. 377, p. 1-33, 2007.

KUKLEY, M., BARDEN, J. A., STEINHAUSER, C. & JABS, R. Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. **Glia**, v. 36, p. 11-21, 2001.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 2, p. 216-26, 2008.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its *N*-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 7, p. 1385-91, 1991.

LI, H.; HENRY, J. L. Adenosine A2 receptor mediation of pre- and postsynaptic excitatory effects of adenosine in rat hippocampus in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 347, p. 173-82, 1998.

Li, Z. G. et al. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. **Brain Research**, v. 946, n. 2, p. 221-231, 2002.

LUCHSINGER, J. A. Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. **European Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 119-29, 2008.

MANE C. et al., Food grade lingonberry extract: polyphenolic composition and in vivo protective effect against oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 3330-9, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**, v. 36, p. 19-30, 2013.

MORDES, J. P. et al. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. **ILAR Journal**, v. 45, p. 278-91, 2004.

MUSHTAQ, N. et al. Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 32, p. 287-293, 2014.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews**, v. 82, p.1013-67, 2002.

OLSSON, M. E. et al., Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7264-71, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation. **World Health Organization**, 2011.

POCIOT, F., MCDERMOTT, M. F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. **Genes and Immunity**, v. 3, p. 235-249, 2002.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-75, 2011.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 29, p. 91–98, 1963.

RASSENDREN, F. et al. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 5482-6, 1997.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 22, p. 359-370, 2005.

ROEP, B. O.; ATKINSON, M. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes: 1. In support of this proposal. **Diabetologia**, v. 47, pg. 1650-6, 2004.

SAKATA, N. et al. Animal Models of Diabetes Mellitus for Islet Transplantation. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p.1-11, 2012.

SANDLER, S.; SWENNE, I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. **Diabetologia**, v. 25, p. 444-447, 1983.

SANTI, A. et al. Effects of Quercetin on Oxidative Stress Biomarkers in Methimazole - Induced Hypothyroid Rats. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 122, p. 533-539, 2014.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHAAN, B. D. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1895-1902, 2004.

SCHEEN, A. J. Central nervous system: a conductor orchestrating metabolic regulations harmed by both hyperglycaemia and hypoglycaemia. **Diabetes & Metabolism**, v.36, p. 31–38, 2010.

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

SHARMA, R. et al. Experimental Models on Diabetes: A Comprehensive Review. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 01-08, 2013.

SOLINI, A. et al. Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: anew potential marker of the disease? **Journal of Endocrinology**, v.149, p. 389-96, 2008.

STEFANELLO, N. et al. Chlorogenic acid, caffeine and coffee reverse damages in liver, kidney and pancreas parameters of diabetic rats. **Journal of Diabetes and Health**, v. 108, p. 7519-3753, 2015.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. **Physiology**, v.50, p.536-546, 2001.

TAKASU, N. et al. Streptozotocin- and alloxan-induced H_2O_2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H_2O_2 as mediator for DNA fragmentation. **Diabetes**, v. 40, p. 1141-1145, 1991.

TERAHARA, N. Flavonoids in foods: a review. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 3, p. 521-8, 2015.

TIWARI, A.K.; RAO, J.M. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. **Current Science**, v. 83, n.1, p. 30-38, 2002.

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

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VILJANEN, K. et al., Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7419-24, 2004.

VLAJKOVIC, S.M. et al. Distribution of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. **Hearing Research**, v. 170, p. 127–138, 2002.

WANG, T. F.; ROSENBERG, P. A.; GUIDOTTI, G. Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only one ecto-apyrase (CD39) gene. **Molecular Brain Research**, v. 47, p. 295–302, 1997.

WESSELS, A. M. et al. Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 88-96, 2008.

WILLETT, W. C. The Mediterranean diet: science and practice. **Public Health Nutritional**, v. 9, p. 105-110, 2006.

WU, K.K.; HUAN, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v.40, p.1-5, 2008.

ZHANG, D.; JIANG, S.; MENG, H. Role of the Insulin-Like Growth Factor Type 1 Receptor in the Pathogenesis of Diabetic Encephalopathy. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, pg 5-9, 2015.

ZHAO, W. 1.; ALKON, D. L. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, p. 125-34, 2001.

ZIMMERMANN, H. et al. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 73, p. 537-566, 2007.

ANEXOS