

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA  
FOLHA DE *Syzygium cumini* EM MODELO DE  
TOXICIDADE AGUDA POR ETANOL *IN VIVO***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lariane Oliveira Cargnelutti**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA  
FOLHA DE *Syzygium cumini* EM MODELO DE TOXICIDADE  
AGUDA POR ETANOL *IN VIVO***

**Lariane Oliveira Cargnelutti**

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

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Moretto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cargnelutti, Lariane Oliveira  
Avaliação do efeito do extrato aquoso da folha de  
Syzygium cumini em modelo de toxicidade aguda por etanol  
in vivo. / Lariane Oliveira Cargnelutti.-2015.  
82 f.; 30cm

Orientadora: Maria Beatriz Moretto  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Etanol 2. Adenosina Desaminase 3. Mediadores  
inflamatórios 4. Óxido Nítrico I. Moretto, Maria Beatriz  
II. Título.

---

©2014

Todos os direitos autorais reservados a Lariane Oliveira Cargnelutti. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização do autor.

E-mail: [larianecargnelutti@yahoo.com.br](mailto:larianecargnelutti@yahoo.com.br)

---

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

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DE  
*Syzygium cumini* EM MODELO DE TOXICIDADE AGUDA POR  
ETANOL IN VIVO**

elaborada por  
**Lariane Oliveira Cargnelutti**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Maria Beatriz Moretto, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Glaecir Roseni Mundstock Dias, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. (UFRJ)**

**Natália Brucker, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 30 de janeiro, 2015.

Ao meu amado avô Rubem Charão, que hoje é uma estrela no céu e sempre será um dos meus exemplos de vida.

*“Perco as pessoas que eu amo, mas nunca o meu amor por elas...”*

## AGRADECIMENTOS

Àquele que sempre guiou e ilumina os meus caminhos, que nem sempre são fáceis, mas a fé em Deus me fornece forças para enfrentar os obstáculos mais difíceis e que não me permite desistir, pois confio nos Seus planos para minha vida.

Àquela que foi e sempre será a minha maior professora.  
Querida Maria Beatriz, obrigada pela oportunidade de orientação deste trabalho. Serei eternamente grata por toda sua dedicação e comprometimento, por todo o aprendizado científico. Carrego comigo o conceito de que sabemos que estamos fazendo o certo quando nos orgulhamos disso, e eu tenho muito orgulho de ter sido orientada por essa pessoa de qualidades admiráveis. Também agradeço por muitas vezes ter sido mãe, amiga e conselheira, levarei teus ensinamentos comigo por toda a minha vida. Muito obrigada por tudo!!

Àquela que permitiu que eu vivesse os 10 melhores anos da minha vida. Obrigada UFSM, por proporcionar uma educação de qualidade. Desde o ensino médio no Colégio Politécnico, passando pela graduação e finalmente a pós-graduação no PPG Ciências Farmacêuticas. Certamente, tive os melhores professores. Orgulho-me muito por ter iniciado e agora estar finalizando minha formação nesta instituição.

As professoras Glaecir Dias, Natália Brucker e Karine De Bona por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação. Certamente suas opiniões e sugestões serão importantes para o aprimoramento desse trabalho.

Àquela que me ensinou, guiou e dedica a sua vida para que a minha seja a mais bela possível. Que não poupa amor nem carinho. A mulher mais importante na minha vida. Mãe, obrigada por cada abraço apertado, colo, apoio e também por cada cobrança. Àquele que me entende como ninguém, que é o meu melhor professor “das coisas da vida”. Pai, obrigada por vibrar em cada conquista minha. O senhor sabe que és muito mais que um pai, és meu herói, meu exemplo. Vocês são os melhores pais que eu poderia querer. Tudo que faço é pensando em vocês. Vocês são tudo na minha vida!!!

Àquelas que completam a minha vida e a nossa família. Que enchem a casa de alegria e amor. Um dos amores mais verdadeiros e sinceros, o amor de irmãs. Vocês três são muito importantes para mim. Obrigada por me apoiarem nas escolhas que fiz e por estarem sempre ao meu lado!!!!

Àquele que se fez sempre presente e que só de estar ao meu lado acalma as minhas angústias e me dá forma para enfrentar todos os desafios que a vida vai nos propor. A pessoa que escolhi para ficar para sempre do meu lado. O meu melhor amigo, meu namorado, meu noivo: Felipe. Obrigada por ser essa pessoa tão especial. Te amo!!

Àqueles que são origem de tudo. Em especial ao meu amado avô, que enquanto esteve ao meu lado, sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a sempre investir nos estudos e a minha amada vó Clô, que apesar dos puxões de orelha, sempre entendeu minhas ausências!

Àqueles que me viram crescer, aos dos risos nas festas na casa da vó e aos dos choros nas noites de natal. Tios, tias, primos e primas: muito obrigada pelo carinho!

Àqueles que meus pais escolheram para serem meus segundos pais. Em especial aos dindos Alberto e Mery pelo incentivo durante todos esses anos de estudo, desde o ensino médio até hoje! Dinda, obrigada por todo o carinho e empenho em ajudar em qualquer situação, és uma pessoa de um coração maravilhoso. Dindo, obrigada por representar um exemplo de professor e pesquisador, meus primeiros passos no mundo científico foram espelhados em você!!

Àqueles que posso tratar como família, família 1207. Minhas queridas colegas e amadas amigas Paula, Pri, Karine, Gabi, Rapha e Carol... muito obrigada por todo incentivo e apoio, com toda a certeza ter vocês nos meus dias fizeram desses anos muito especiais e foram essenciais para a realização deste trabalho. Em especial a Paula, que posso chamar de amigona: tu és um dos maiores presentes que a farmácia e que o lab 1207 me deram. Eu vou ser eternamente agradecida por ter você ao meu lado. Obrigada pelas risadas, conselhos, puxões de orelhas e também pelos elogios. Estou deixando de ser tua colega, mas tu vai ser minha amiga para sempre!!!!

Àqueles que a genética não fez família, mas o coração fez irmãs. Renata, Luiza, Nanda, Luma, Natália, Anelise: vocês fizeram dos meus caminhos os mais bonitos e divertidos. E que mesmo sem a mesma frequência de encontros, nunca deixaram diminuir o carinho. Quero vocês para sempre em minha vida!!

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

## RESUMO

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

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DE *Syzygium cumini* EM MODELO DE TOXICIDADE AGUDA POR ETANOL *IN VIVO***

Autor(a): Lariane Oliveira Cargnelutti  
Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Moretto  
Santa Maria, 30 de janeiro de 2015

Do uso recreacional aos problemas sociais, o etanol é a droga mais consumida no mundo. Ao atingir praticamente todos os sistemas fisiológicos, o consumo de etanol provoca inúmeras alterações fisiológicas. Os efeitos farmacológicos e toxicológicos do etanol dependem de suas concentrações e de seus metabólitos no organismo, e da duração da exposição a estas substâncias. Adenosina desaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4) é considerada uma enzima chave no metabolismo das purinas. Ela auxilia na regulação extracelular de adenosina, que desempenha um importante papel de neuromodulação no sistema nervoso central e também na liberação de mediadores inflamatórios agindo nos receptores presentes nas células do sistema imune. Além disso, a adenosina pode desempenhar um papel crucial na mediação de muitos efeitos neuronais do etanol. O *Syzygium cumini* (*S. cumini*), conhecido popularmente como jambolão, é uma planta que apresenta propriedades hipoglicêmicas, antiinflamatórias, antipiréticas e antioxidantes. Considerando as inúmeras alterações provocadas pelo consumo agudo de álcool em excesso associado à importância que a utilização de plantas medicinais representa para grande parte da população juntamente com o grande potencial de alternativas terapêuticas relacionadas às mesmas, este estudo teve como objetivo avaliar, através da realização de um modelo animal de intoxicação aguda, o efeito que uma alta dose de etanol pode provocar à atividade da ADA e aos níveis de mediadores inflamatórios. Simultaneamente, verificar o efeito protetor do extrato aquoso das folhas de *S. cumini* (ASc) sobre as possíveis alterações provocadas nos parâmetros avaliados. Os resultados demonstraram que após 6 horas da intoxicação aguda por etanol, na dose de 5g/Kg, a atividade da ADA do soro e nos linfócitos do baço aumenta, enquanto no córtex cerebral observa-se uma redução desta atividade. Ao analisarmos os níveis de mediadores de inflamação no soro, os resultados mostram que o etanol provoca um aumento na liberação dos mediadores de inflamação IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e NO $_x$  e uma redução da citocina anti-inflamatória IL-10. Beneficamente, observamos que o tratamento com ASc na dose de 0,4g/Kg, foi capaz de prevenir as alterações provocadas pelo etanol sobre a atividade da ADA e os níveis de NO $_x$  e IL-10. Assim, nossos resultados sugerem que a ação do etanol sobre o sistema purinérgico pode ser um dos mecanismos pelo quais o etanol exerce seus efeitos sobre a liberação de mediadores inflamatórios e o sistema nervoso central, bem como, que o ASc pode minimizar as alterações decorrentes de exposição aguda ao etanol, uma vez que a redução na atividade da ADA pode afetar vários processos fisiológicos e patológicos.

**Palavras-chave:** Etanol. Adenosina Desaminase. Mediadores inflamatórios. Óxido Nítrico.



## ABSTRACT

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

### EVALUATION OF THE EFFECT OF *Syzygium cumini* LEAF EXTRACT IN ACUTE ETHANOL TOXICITY MODEL IN VIVO

Author: Lariane Oliveira Cargnelutti  
Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Moretto  
Santa Maria, January 30, 2015

From the social use to problematic, ethanol is the most commonly drug used in the world. As it reaches almost all physiological systems, the ethanol consumption causes many physiological changes. The pharmacological and toxicological effects of ethanol depend on their concentration and their metabolites in the body, and the exposure time to these substances. Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) is considered a key enzyme in the metabolism of purines. It assists in the regulation of extracellular adenosine, which plays an important role in neuromodulation in the central nervous system and also in the release of inflammatory mediators acting on receptors in cells of the immune system. Furthermore, adenosine may play a crucial role in the mediation of many neuronal effects of ethanol. The *Syzygium cumini* (*S. cumini*), popularly known as jambolan, is a plant that has hypoglycemic, anti-inflammatory, antipyretic and antioxidant properties. Considering the many changes caused by acute excessive consumption of alcohol associated with the importance that the use of medicinal plants is to a great part of the population along with the great potential of therapeutic alternatives related to these plants, this study aimed to evaluate, by conducting an animal model of acute intoxication, the effect that a high dose of ethanol may cause to the ADA activity and to the levels of inflammatory mediators. At the same time, check the protective effect of the aqueous extract of the leaves of *S. cumini* (ASc) on the possible changes caused in the evaluated parameters. The results showed that after 6 hours of acute intoxication with ethanol, at a dose of 5g /Kg, the serum ADA activity, as well as of the spleen lymphocytes increases, whereas in the cerebral cortex was observed a decrease in this activity. When analyzing the levels of inflammatory mediators, the results showed that ethanol causes an increase in the release of inflammatory mediators IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and NOx and a reduction of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Beneficially, we found that the treatment with ASc, at a dose of 0.4g / kg, was able to prevent the changes caused by ethanol in the ADA activity and NOx and IL-10 levels. Thus, our results suggest that the action of ethanol on the purinergic system may be a mechanism by which ethanol exerts its effects on the release of inflammatory mediators and on the central nervous system, and that the ASC can minimize changes resulting from acute exposure to ethanol, since the reduction of ADA activity can affect various physiological and pathological.

**Keywords:** Ethanol. Adenosine Deaminase. Inflammatory mediators. Nitric oxide.

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

- Tabela 1 – Composition of the aqueous leaf extract of *Syzygium cumini* ..... 62
- Tabela 2 – Effect of the acute ethanol intoxication on AST, ALT and AOPP levels. 63

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estrutura química do etanol .....	15
Figura 2 – Metabolismo oxidativo do etanol .....	19
Figura 3 – Via de síntese, degradação e recaptação da adenosina .....	28
Figura 4 – Interação da adenosina e seus receptores .....	30
Figura 5 – Estrutura da enzima Adenosina Desaminase .....	31
Figura 6 – <i>Syzygium cumini</i> (jambolão) .....	36

### MANUSCRITO

Figura 1 – Effect of the acute ethanol intoxication and/or ASc treatment on ADA activity in serum (a) and lymphocytes (b) of rats .....	59
Figura 2 – Effects of the acute ethanol administration and/or ASc treatment on inflammatory parameters of rats .....	60
Figura 3 – Effect the acute ethanol intoxication and or ASc treatment on ADA activity in the cerebral cortex of rats .....	61

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	Etanol .....	15
2.2	Consumo de etanol .....	13
2.3	Dados epidemiológicos .....	16
2.4	Metabolismo do etanol .....	18
2.5	Manifestações clínicas do uso do etanol.....	21
2.6	Estresse oxidativo.....	22
2.7	Resposta Inflamatória.....	23
2.7.1	Estado inflamatório e o consumo de etanol .....	24
2.8	<b>Sistema purinérgico</b> .....	26
2.8.1	Adenosina .....	27
2.8.2	Adenosina e inflamação .....	29
2.8.3	Adenosina Desaminase (ADA) .....	30
2.8.4	Sistema purinérgico e o etanol .....	32
2.9	<b>Plantas Medicinais</b> .....	34
2.9.1	<i>Syzygium cumini</i> .....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
3.1	Geral .....	38
3.2	Específicos .....	38
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	39
4.1	<b>Syzygium cumini leaf extract protects against ethanol-induced acute injury in rats by inhibiting adenosine deaminase activity and proinflammatory cytokine production</b> .....	39
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65
	<b>ANEXO</b> .....	80

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** é feita uma abordagem geral sobre o tema desta Dissertação de Mestrado. No item **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** está descrita uma sucinta revisão sobre os temas trabalhados.

As seções materiais e métodos, resultados, discussão estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO** e representam a íntegra deste estudo.

Por fim, a seção **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** disposta no final desta dissertação referem-se somente às citações dos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.

# 1 INTRODUÇÃO

O grande interesse em etilismo, tanto do ponto de vista clínico quanto sociológico, resultou em um número impressionante de estudos sobre os efeitos do etanol. No entanto, os resultados não têm sido ainda unânimes, pois os modelos utilizados têm sido extremamente variáveis. A intoxicação aguda tem sido considerada a mais apropriada para estudos com finalidade de avaliar os efeitos diretos do etanol a nível celular e molecular (COPORTI et al., 2010).

O uso de etanol pode estar relacionado com uma variedade de danos à saúde, sendo alguns deles bem conhecidos como: hepatopatia alcoólica, pancreatite, cardiopatias, lesões no SNC e neoplasias (HAKULINEN et al., 1974; LUNDY et al., 1974; GRAMENZI et al., 2006). Além disso, o consumo de etanol contribui para modificações em respostas inflamatórias/imunológicas e os produtos gerados durante seu metabolismo tem sido associados a processos auto-imune (SZABO; MANDREKAR; MAYERLE, 2007).

A adenosina é liberada durante insultos metabólicos ou traumáticos, exercendo funções de proteção de órgãos e tecidos (HASKO; CRONSTEIN, 2004). Uma enzima chave do seu metabolismo é a Adenosina Desaminase (E.C. 3.5.4.4, ADA) que promove a desaminação irreversível da adenosina ou 2'-deoxiadenosina em inosina ou 2'-desoxinosina e amônia (FRANCO et al., 1997; ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005). A ADA possui um papel importante no sistema imune, alta atividade nos linfócitos e macrófagos e tem sido objeto de interesse devido ao seu papel na manutenção dos níveis intra e extracelulares de adenosina (GORGUNER; CERCI; GORGUNER, 2000).

O uso de plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças é prática comum, por ser uma alternativa terapêutica útil devido a sua eficácia aliada a um baixo custo operacional e a uma relativa facilidade para aquisição. Devido a essa ampla utilização, plantas medicinais tradicionais vêm sendo estudadas em relação as suas diversas propriedades farmacológicas (BHUIYAN et al., 2010).

O *Syzygium cumini* (Sc), pertencente à família das Myrtaceae e popularmente conhecida no Brasil como Jambolão, apresenta propriedades hipoglicêmicas, antiinflamatórias, antipiréticas, hipolipidêmicas e antioxidantes

(BRAGANÇA, 1996; STANELY et al., 2003). O Sc praticamente não tem sido explorado em relação às suas propriedades medicinais frente às alterações decorrentes do consumo de álcool.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Etanol

O etanol, também referido como "álcool etílico", apresenta uma estrutura química simples, composta de dois carbonos e um grupamento hidroxila ligado à um carbono saturado (Figura 1), sendo que esta ligação o caracteriza como uma molécula orgânica da família do álcool (GIGLIOTTI et al., 2008). Este composto orgânico é um componente básico e a molécula ativa de bebidas alcoólicas. A graduação alcoólica de uma bebida é definida pela porcentagem volumétrica de álcool puro nele contido. Assim, por exemplo: um vinho de 10<sup>o</sup> significa que 1L contém 10% de álcool, que representa 100 ml ou 80 gramas de álcool (MELLO et al., 2001).

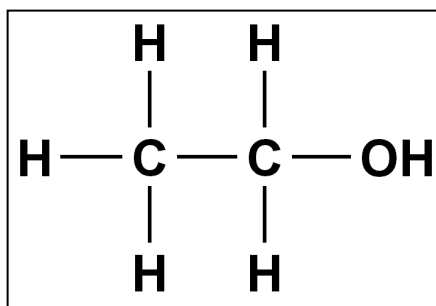


Figura 1 – Estrutura química do etanol. Adaptado de RUSSEL, JB. Química geral, v. 1, ed.2.

Por ser uma droga lícita, seu consumo é admitido e estimulado pela sociedade, o que o torna uma das drogas psicoativas mais usadas no mundo, apesar dos inúmeros problemas de saúde e sociais que estão relacionados ao seu uso (RUI; JUN, 2010).

O etanol é uma molécula amplamente estudada em muitos institutos de pesquisa em todo o mundo, o que tem sido frutífero em revelar uma grande variedade de alvos moleculares nos quais o etanol atua (COPORTI et al., 2010).



## 2.2 Consumo de etanol

O consumo de etanol provoca danos à sociedade como um todo. Fatores ambientais, tais como o desenvolvimento econômico, a cultura, a disponibilidade de álcool e o nível de eficácia das políticas do álcool são relevantes para explicar as diferenças e as tendências históricas no consumo de álcool e seus efeitos nocivos (BUCHELE; MARQUES; CARVALHO, 2004).

As bebidas alcoólicas fazem parte da história da humanidade, tendo o seu consumo integrado a muitas culturas por milhares de anos (McGOVERN, 2009). Anteriormente à era moderna, as bebidas alcoólicas eram produzidas em pequena escala como atividade doméstica ou artesanal para o consumo tradicional. Muitas vezes, desenvolvida como atividade ocasional e comunitária pelas sociedades tribais e aldeias (GUMEDE, 1995; PARRY; BENNET, 1998; SALA et al., 2002).

Com a industrialização, na era moderna, foram criados outros padrões de produção e consumo, assim como a obtenção de novas bebidas alcoólicas, tornando-as um bem de mercado, resultando em uma maior disponibilidade (JERNIGAN, 2000). Associado a isso, no século XIX, sociedades industrializadas na Europa e em outros lugares viram o aumento do consumo de etanol como um problema social e de saúde substancial. Uma vez que o consumo do etanol prejudicava a força de trabalho sóbria e atenta que era necessária, o consumo de etanol tornou-se um problema socialmente relevante (BERRIDGE, 2014), levando ao surgimento de movimentos sociais populares, contando com a participação e força política para limitar e até mesmo proibir o consumo de etanol (OMS, 2011). Foi neste século que a palavra alcoolismo foi usada pela primeira vez para se referir à síndrome da dependência do álcool (BAU, 2002).

Até o final da década de cinquenta, acreditava-se que as doenças provenientes do consumo excessivo de etanol estavam associadas exclusivamente à má nutrição (LIEBER, 1993). Di Luzio (1962) e Lieber e Davidson (1962) foram os pesquisadores pioneiros a postularem que o etanol afeta o equilíbrio antioxidante das células hepáticas, exercendo então, efeito tóxicos *per se*. A partir da década de sessenta, foi dado início a pesquisas cujo objetivo era a amplificação de conhecimentos acerca dos efeitos do etanol no organismo (KOCH et al., 2004).

O equilíbrio entre efeitos benéficos e adversos do consumo de álcool é complexo. Efeitos benéficos do consumo de quantidades moderadas de bebidas alcoólicas já foram postuladas como fator de proteção sobre doenças cardiovasculares (MOREIRA et al., 1996), porém o consumo abusivo leva a problemas sociológicos e toxicológicos de grande importância, como esteatose hepática, hepatite alcoólica e cirrose hepática (NANCHAHAL; ASHTON; WOOD, 2000; TUMA 2002; HINES; WHEELER, 2004; ALBANO, 2009).

### **2.3 Dados epidemiológicos**

Do uso social ao problemático, o etanol é a droga mais consumida no mundo. Segundo dados de 2004 da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente dois bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas. Contribuindo para a diminuição da saúde mundial, o consumo indevido de etanol foi responsável por 3,2% de todas as mortes e por 4% de todos os anos perdidos de vida útil no ano de 2004 (OMS, 2011). Já em 2012, 5,9% de todas as mortes no mundo foram atribuídas ao etanol, o que corresponde a uma em cada 20 pessoas ou a 3,3 milhões de vidas perdidas (OMS, 2014).

Quando esses índices são analisados em relação à América Latina, o álcool assume uma importância ainda maior. Cerca de 16% dos anos de vida útil perdidos neste continente estão relacionados ao uso indevido dessa substância, índice quatro vezes maior do que a média mundial (OMS, 2011).

Segundo dados mais recentes da OMS, existe uma grande variação no consumo de etanol em todas as regiões do mundo, sendo que os níveis mais altos continuam a ser encontrados nos países mais desenvolvidos, em particular, na região Europeia e na região das Américas. A nível mundial, os indivíduos acima de 15 anos de idade bebem em média 6,2 litros de álcool puro por ano, que equivalem a 13,5 g de álcool puro por dia. Estima-se que para os próximos cinco anos o consumo de etanol permaneça estável nas regiões Africana, Europeia e das Américas, apesar de alguns países da região Europeia e Africana relatarem reduções significativas no seu consumo (OMS, 2014).

Globalmente, 50,1% de álcool total registrado é consumido na forma de bebidas espirituosas, sendo também o tipo de bebida mais consumida nas regiões do Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. O segundo tipo de bebida mais consumida é a cerveja, o que representa 34,8% de todo o álcool consumido no mundo e é o tipo mais consumido na Região das Américas, representando 55,3% do total (OMS 2014).

O I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool realizado em 2007 mostrou que no Brasil 52% da população brasileira consome bebidas alcoólicas, tendo predomínio de homens (65%) em reação às mulheres (41%). Do conjunto dos homens, 11% bebem todos os dias e 28% consomem bebida alcoólica de 1 a 4 vezes por semana. Embora a maior porcentagem de pessoas que bebem esteja nas classes A e B e na Região Sul, é nos Estados do Norte, do Centro-Oeste e do Nordeste e na classe E que se consome o maior número de doses a cada vez que se bebe (BRASIL, 2007).

Ainda no Brasil, o consumo de etanol é responsável por mais de 90% das internações por dependência química, e está associado a mais da metade dos acidentes de trânsito, principal causa de morte na faixa etária de 16 a 20 anos (BRASIL, 2007).

## **2.4 Metabolismo do etanol**

O esclarecimento do metabolismo do etanol é essencial para a compreensão e controle das ações provocadas no organismo, visto que os efeitos farmacológicos e potencialmente patológicos do etanol dependem da concentração de etanol e de seus metabólitos no organismo, e também a duração da exposição a estas substâncias.

Etanol consumido por via oral é absorvido rapidamente a partir do trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado) para o sangue. A absorção é influenciada por fatores como concentração alcoólica da bebida ingerida, presença e composição dos alimentos no estômago, taxa de ingestão e esvaziamento gástricos. Ao ser absorvido, devido as suas características físico-químicas de ser uma molécula pequena e solúvel tanto em meio aquoso como meio lipídico, o etanol é

amplamente distribuído pelos tecidos do organismo e afeta a maioria das funções vitais (GILMAN et al. 1996; RAMCHANDANI et al. 2001).

Sendo o fígado o órgão responsável por aproximadamente 90% da oxidação do etanol, é este o mais susceptível aos efeitos tóxicos exercidos pelo consumo em excesso de bebidas alcoólicas (LIEBER, 1980).

O metabolismo do etanol ocorre através de três rotas enzimáticas, uma principal, através da álcool desidrogenase (ADH), e duas acessórias que representam apenas uma pequena fração do metabolismo do etanol, CYP2E1 e catalase (Figura 2).

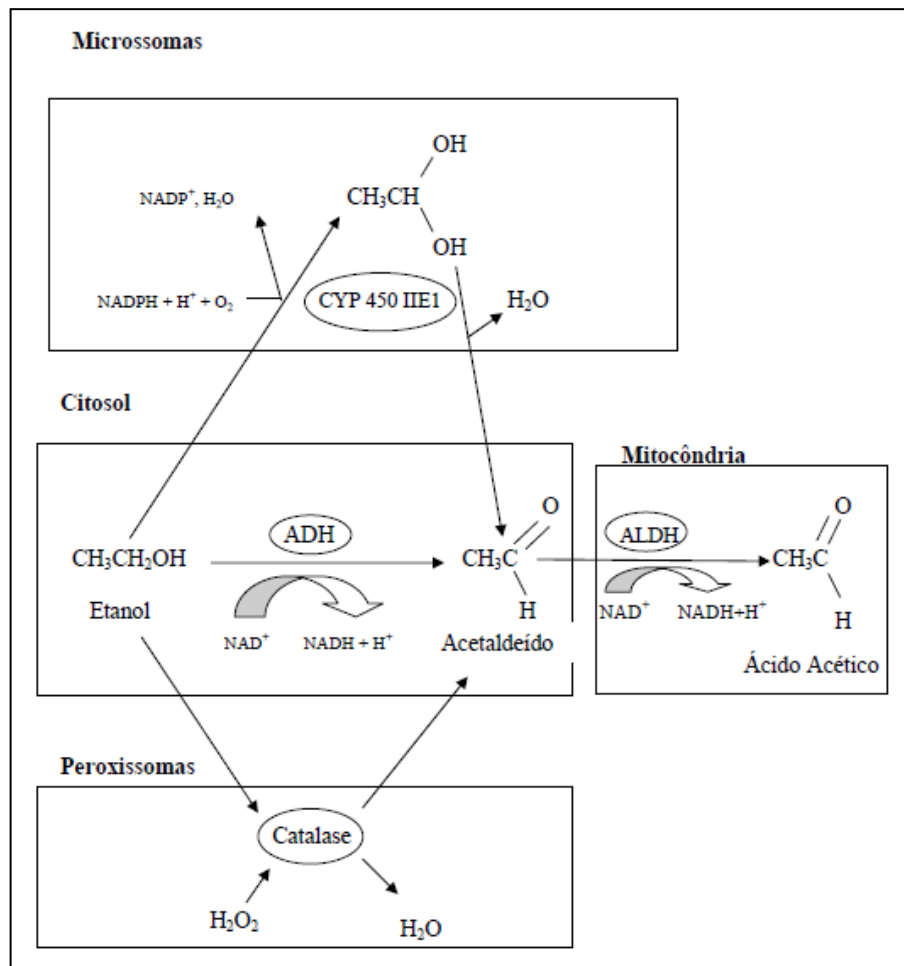


Figura 2. Metabolismo oxidativo do etanol, demonstrando as três vias enzimáticas envolvidas. Adaptado de BERMOND II; TOSE, 2000.

Através da ação da ADH, o etanol é transformado em acetaldeído, ocorrendo a liberação de um hidrogênio que é transferido para o cofator nicotinamida adenina di-nucleotideo ( $\text{NAD}^+$ ), que é convertido na sua forma reduzida (NADH). A principal via de biotransformação ocorre no citoplasma das células hepáticas, mas também é encontrada em outros órgãos como cérebro e estômago (KATZUNG, 2003).

O etanol também pode ser biotransformado pela catalase e CYP2E1 [principal componente do sistema microsomal hepático de oxidação do etanol (MEOS-Microsomal Ethanol Oxidation System)]. Esta via de metabolismo ocorre nos microsomas dos hepatócitos e requer como cofator NADPH, enquanto a catalase metaboliza o etanol utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e está localizada nos peroxissomas dos hepatócitos. Além dos metabólitos específicos, essas duas rotas enzimáticas também terão como produto o acetaldeído (ARTEEL et al., 2003). Posteriormente, o acetaldeído formado é metabolizado a acetato e água, pela ação da enzima acetaldeído desidrogenase, que esta localizada na matriz e membrana mitocondrial externa, nos microsomas e no citoplasma das células hepáticas (LIEBER e ABITTAN, 1999).

Finalmente, o acetato será convertido em acetil coenzima A, com consumo de adenosina trifosfato (ATP) e formação de adenosina monofosfato (AMP) que será novamente fosforilado ou degradado a purinas e ácido úrico (REIS e COPLE, 2003).

Assim, o metabolismo do etanol resulta na geração de acetaldeído, acetato e um excesso de equivalentes redutores no fígado. Estudos tem demonstrado que além do etanol, seus metabólitos também contribuem para o dano celular e tecidual (LIEBER, 2004).

Neste contexto, o acetaldeído, substância que induz uma variedade de respostas tóxicas, farmacológicas e comportamentais, é o principal metabólito ativo do álcool. O acetaldeído é uma molécula altamente reativa e extremamente tóxica (TUMA, 2002), capaz de se combinar com fosfolípidios, aminoácidos e grupos sulfidrílicos (BERTELLI; CONCI, 1997). Seus níveis elevados são responsáveis pelos efeitos mais comumente observados após a ingestão excessiva de etanol (HUNT, 1996).

A produção de acetaldeído resulta diretamente na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), em uma biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), na expressão de moléculas de adesão e na produção de citocinas pró-inflamatórias

(ZHANG et al., 2004; GUERRI; MONTOLIU; RENAUI-PIQUERAS, 1994; DENG; DEITRICH, 2007; PAI et al., 2006).

## **2.5 Manifestações clínicas do uso do etanol**

Ao atingir praticamente todos os sistemas fisiológicos, além da dependência alcoólica, o consumo de etanol provoca inúmeras alterações fisiológicas e está relacionado com o desenvolvimento de condições patológicas.

Fisiologicamente, uma das manifestações primárias observadas ao consumir bebidas alcoólicas é a sensação de prazer e bem estar, que estão relacionadas com os efeitos vasculares do etanol, ao aumentar a circulação sanguínea e os batimentos cardíacos. Posteriormente, à medida que a concentração sanguínea de etanol aumenta, os efeitos depressores predominam.

O etanol afeta muitos processos neuroquímicos provocando um desequilíbrio de vias excitatórias e vias inibitórias (HEINZ; GOLDMAN, 2000; RATSMA; VAN DER STELT; GUNNING, 2002; PIVAC et al., 2004). Através da atuação em diversos alvos celulares, como o sistema glutamatérgico, no qual o etanol atua inibindo, e também o GABAérgico, no qual atua de forma a ativar este sistema (CREWS et al., 1996, KUMARI; TICKU, 2000; VENGELIENE et al, 2008).

Os consumidores de bebidas alcoólicas em grandes quantidades estão mais sujeitos a apresentarem alguma alteração em detrimento do consumo de etanol, do que os consumidores moderados (ROMEO et al., 2007), já que o consumo de altas doses de etanol está relacionado com alterações do sistema neurológico, cardíaco, gastrointestinal, imunológico, hematológico e músculo-esquelético (STANDRIDGE; ZYLSTRA; ADAMS, 2004).

Em especial, estudos das últimas décadas têm revelado que o consumo de álcool, seja de forma crônica ou aguda, resulta em alterações em componentes celulares do sistema imune inato e adaptativo (NELSON; KOLLS, 2002). MATOS e colaboradores (2013) observaram que pacientes alcoólatras, independente da presença de alguma doença hepática, apresentam linfopenia decorrentes da redução tanto do número de células B quanto de células T (MATOS et al., 2013).

## 2.6 Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo é usado para descrever um desequilíbrio entre as reações envolvidas na geração de radicais livres e de outras moléculas reativas com seus respectivos sistemas de defesa (HALLIWELL, 1996; HARRISON et al., 2003).

As espécies radicalares, conhecidas como radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados (SLATER, 1984) que, juntamente com as espécies não-radicalares, são altamente reativas a outras biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (POLI et al., 2004).

As proteínas, um dos maiores componentes dos sistemas biológicos, podem sofrer modificações oxidativas através da ação direta de espécies radicalares ou indireta através de reações com produtos secundários do estresse oxidativo (DALLE-DONE et al., 2006). O dano oxidativo a estas proteínas pode prejudicar o funcionamento de receptores, transportadores e enzimas, afetando processos celulares essenciais (PENG et al., 1997). Existe uma variedade de biomarcadores que podem indicar danos causados pelo estresse oxidativo às macromoléculas. Entre eles, produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) formam uma classe de compostos gerados em consequência do estresse oxidativo, sendo considerados marcadores confiáveis e abrangentes para estimar o grau de modificações oxidativas de proteínas (PIWOMAR et al., 2007).

Para minimizar estes efeitos provocados pelo excesso de radicais livres, o organismo possui um complexo sistema de defesa antioxidante (FINKEL, 2003; SCANDALIOS, 2005). Estas defesas são classificadas em enzimáticas, representadas principalmente pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e em não enzimáticas como pequenas moléculas como vitaminas C e E, flavonoides, selênio, bilirrubina, ácido úrico e carotenoides (VASCONCELOS et al., 2007).

Estudos tem demonstrado que o estresse oxidativo contribui para a toxicidade do etanol. As evidências disponíveis indicam que, ao favorecer a transição da permeabilidade mitocondrial, o estresse oxidativo promove necrose e/ou apoptose de hepatócitos e está implicado na sensibilização de hepatócitos para a ação pró-apoptótica por TNF- $\alpha$  induzido por etanol. Também, por desencadear a liberação de

citocinas pró-fibróticas em células estreladas hepáticas, os mecanismos oxidativos podem contribuir para o desenvolvimento de fibrose hepática.

Além disso, as citocinas, ao reagirem com produtos de peroxidação lipídica e com proteínas hepáticas, estimulam reações imunes humorais e celulares. Assim, as respostas imunes pode representar o mecanismo pelo qual o estresse oxidativo induzido por álcool contribui para a perpetuação da inflamação hepática crônica (ALBANO, 2006).

## 2.7 Resposta Inflamatória

Reações inflamatórias estão associadas a um complexo padrão de respostas citotóxicas e imunológicas. A resposta inflamatória aguda desempenha um papel de proteção extremamente importante em situações nas quais o organismo sofra algum efeito nocivo, como durante infecções e lesões teciduais. Essa resposta é acionada por citocinas e quimiocinas que se ligam a receptores celulares e iniciam a ativação da sinalização celular e mobilização de células ao local da lesão. Por sua vez, essas células secretam mediadores inflamatórios que são responsáveis por promover a restauração dos danos teciduais causados. Em contrapartida, quando o agente causador permanece por mais tempo no organismo pode levar a uma resposta aguda desregulada que poderá evoluir para uma resposta inflamatória crônica (WANG et al., 2012).

Mediadores das respostas inflamatórias apresentam papel chave na ativação das respostas celulares do sistema imune inato e adaptativo. Estes mediadores, em condições de dano celular e em resposta a infecções, são produzidos em quantidades superiores as consideradas fisiológicas (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

Dentre estes mediadores, as citocinas são um pequeno grupo de proteínas com peso molecular que varia de 8 a 40000 Da e são produzidas por quase todas as células nucleadas (STANLEY; LACY, 2010). Existem mais de 200 citocinas que são classificadas em interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons, fator estimulador de hematopoiese e de colônias. Tradicionalmente as citocinas são divididas em pró-inflamatória (por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) e anti-



inflamatória (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-13). Um desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias tem sido observado em várias doenças (OPAL; DePATO, 2000).

O óxido nítrico (NO<sub>x</sub>), um radical livre, além de estar relacionado com alterações oxidativas, também está associado à inflamação aguda e crônica (MacMICKING; XIE; NATHAN, 1997; SENA; PEREIRA; SEICA, 2013), sendo produzido em quantidades significativas por macrófagos e outras células do sistema imune que expressam a isoforma induzível da NO sintase (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005).

### 2.7.1 Estado inflamatório e o consumo de etanol

Estudos experimentais e epidemiológicos tem demonstrado que o consumo de etanol exerce efeitos significativos sobre o estado inflamatório, influenciando a resposta inflamatória e os mecanismos dependentes (MOLINA, 2014; GOODMAN et al., 2013; WANG et al., 2012; Li et al., 2012).

As ações do etanol dependem de muitos fatores individuais e ambientais, como por exemplo o padrão de consumo (agudo ou crônico) e a quantidade consumida (moderado ou em excesso). Muitos dos efeitos do etanol sobre os mediadores inflamatórios acontecem de forma dose-dependente, sendo que o etanol age de forma distinta dependendo do padrão de consumo. O uso agudo ou moderado está associado com uma resposta inflamatória atenuada, enquanto o consumo pesado está relacionado com a exacerbação da produção de mediadores inflamatórios (GORAL et al., 2008; BAGBY et al., 1998; BOE et al., 2003; KHORUTS et al., 1991; McClain et al., 1993).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que, frente à exposição a vários patógenos, o tratamento agudo com etanol reduz a produção de mediadores inflamatórios.

Hideyuki e colaboradores avaliaram em ratos a resposta do organismo frente a um estímulo inflamatório após duas horas de exposição aguda a uma baixa dose de etanol (100 mg/Kg/h). Foi observado que o etanol inibiu a liberação da citocina plasmática TNF- $\alpha$  induzida pela endotoxina, mas não influenciou a liberação da IL-6 (HIDEYUKI et al., 2012).

Pruett e colaboradores (2010) observaram uma redução na produção de mediadores pró-inflamatórios em camundongos pré-tratados com etanol 30 min antes da indução de sepse com *Escherichia coli* (PRUETT et al., 2010).

Assim, o consumo agudo e moderado de etanol, ao inibir a produção dos mediadores inflamatórios, prejudica a sinalização e ativação das defesas do organismo, como a quimiotaxia de neutrófilos (ARBABI et al., 1999), bem como dificulta as interações entre as células linfoides e endoteliais, o que poderia resultar no recrutamento inadequado de células linfoides para os sítios de inflamação (SAEED et al., 2004). Usando modelo animal de inflamação, Saeed e colaboradores (2004) analisaram, entre outros fatores, o efeito do tempo de administração do etanol (5g/Kg) sobre o recrutamento de leucócitos, demonstrando que o etanol provoca efeito inibitório sobre a migração de leucócitos para o sítio inflamatório de forma tempo-dependente.

Em contrapartida, o consumo crônico e em excesso de etanol está relacionado com uma ruptura no balanço e função de citocinas (DOMINGUEZ-SANTALLA, 2001; CREWS et al., 2006). Como consequência do consumo crônico de etanol, foi observado um aumento dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$  e de outras citocinas pró-inflamatórias (DIEHL, 1999).

Neste contexto, em um experimento em que ratos receberam durante uma semana 3 doses de etanol (5g/Kg) foi observado um aumento nos níveis hepáticos de TNF- $\alpha$  (KHAN; NAFEES; SULTANA, 2011).

Romeo e colaboradores (2007) observaram que um aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como uma redução nos níveis de IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-2 têm sido frequentemente associados a pacientes dependentes de etanol com cirrose. Além disso, Heberlein e colaboradores (2014) observaram que mesmo durante o período de 14 dias de abstinência os níveis de TNF- $\alpha$  permanecem elevados em pacientes dependentes de etanol, enquanto a concentração de IL-6 reduz durante este período (HEBERLEIN et al., 2014).

O estado inflamatório tecidual quando prolongado e em excesso tem sido relacionado como mecanismo principal das injurias teciduais provocadas pelo etanol (McClain et al., 2004; SZABO et al., 2007). Níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 circulantes podem contribuir para a maior parte dos sinais e sintomas observados em pacientes com doença hepática alcoólica, como por exemplo, metabolismo aumentado, febre, perda de peso, diminuição da albumina sérica e os marcadores

de desnutrição (McCLAIN; COHEN, 1989; DEVIERE et al, 1989; KHORUTS et al, 1991). Além disso, os danos provocados por TNF- $\alpha$  sensibilizam os hepatócitos (HINES; WHEELER, 2004) e, assim, as células tornam-se mais suscetíveis a apoptose. Assim, o aumento de mediadores inflamatórios parece contribuir para a maioria das alterações fisiológicas em pacientes com hepatite alcoólica (DÍAZ et al, 2002).

Além da relação entre o aumento nos níveis circulantes de mediadores inflamatórios e as doenças hepáticas, as alterações inflamatórias provocadas pelo etanol também acometem outros órgãos. Alguns estudos tem relacionado o consumo de etanol com a neuroinflamação. Qin e colaboradores (2008) verificaram ao final de dez dias de tratamento com etanol (5g/Kg) o aumento nos níveis hepáticos de TNF- $\alpha$  e também observaram níveis elevados no tecido cerebral de ratos. Enquanto os níveis de IL-10 foram encontrados diminuídos no fígado e aumentados no cérebro.

Outros órgãos que sofrem os efeitos das mudanças no estado inflamatório proporcionado pelo etanol são os pulmões, nos quais o consumo de etanol está relacionado com uma redução das defesas a agentes infecciosos. A redução da resposta inflamatória observada em pacientes dependentes de etanol está associado a uma maior propensão destes pacientes em desenvolverem infecções pulmonares, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e Síndrome de Angústia Respiratória do Adulto (SARA) (LIANG; YELIGAR; BROWN, 2012; MOSS et al.,1996; PABST et al., 2011).

## **2.8 Sistema purinérgico**

O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, estando envolvido em mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). Componentes importantes desse sistema são os nucleotídeos extracelulares de adenina, Adenosina trifosfato (ATP), Adenosina monofosfato (AMP) e Adenosina difosfato

(ADP), e o nucleosídeo Adenosina. Esses representam uma importante classe de moléculas extracelulares de sinalização, que atuam modulando vias cruciais para o funcionamento normal do sistema imune, através de receptores purinérgicos (YEGUTKIN, 2008).

Metabolicamente, as ectonucleotidases, enzimas presentes na superfície das células, são responsáveis por regular os eventos de sinalização induzidos ATP, ADP e adenosina (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

### 2.8.1 Adenosina

Quimicamente, a adenosina é um ribonucleosídeo constituído por uma base púrica (adenina) ligada a uma pentose (D-ribose). Esse nucleosídeo é uma molécula sinalizadora endógena que regula numerosos processos fisiológicos e patológicos (FREDHOLM et al., 2007). No tecido cardíaco, a adenosina exerce função vasodilatadora e reduz a pressão cardíaca (SATO et al., 2005) e em outros sistemas apresenta funções como modulação da liberação de neurotransmissores e de citocinas, inibição da lipólise e indução de broncoconstrição (BOUMA; VAN DEN WILDENBERG; BUURMAN, 1997; VAN DER GRAAF et al., 1999). Tais funções são exercidas através da interação da adenosina com quatro receptores acoplados à proteínas, classificados como A1, A2A, A2B e A3 que são expressos na maioria das células em diferentes quantidades e combinações (FREDHOLM et al., 2011). Esta interação pode resultar na ativação ou supressão de funções celulares (JACOBSON; GAO, 2006).

As funções biológicas reguladas pela adenosina dependem da sua concentração extracelular. Esse nucleosídeo é formado de forma contínua tanto intracelularmente quanto extracelularmente, sendo encontrada em condições nanomolares (10 a 200 nM) sob condições normais. Todavia, em locais de dano tecidual, quantidades maiores são produzidas, atingindo concentrações micromolares (10 a 100  $\mu$ M) (FREDHOLM, 2001; FREDHOLM, 2007). Os níveis atingidos pela adenosina na biofase de seus receptores são estritamente regulados por mecanismos dinâmicos, como biossíntese intracelular e extracelular, transporte e

metabolismo, e eles estão intimamente ligados ao estado de energia disponível nos tecidos (ANTONIOLI et al., 2012).

A fonte mais importante para o aumento dos níveis de adenosina extracelular durante situações de estresse metabólico é a liberação de ATP intracelular, seguido do catabolismo extracelular desse nucleotídeo, até a geração de adenosina por ação das ectonucleotidases (HASKÓ; PACHER, 2008).

Como podemos observar na Figura 3, a principal via de produção de adenosina no meio extracelular é através da atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase (5'NT) que converte o 5'-AMP em adenosina. Já no meio intracelular, a adenosina também pode ser formada através da quebra de 5'-AMP pela 5'NT e também através hidrólise de S-adenosilhomocisteína (SAH) pela ação da enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (LLOYD et al., 1988; PAK et al., 1994). Finalmente, a adenosina pode ser transformada em AMP pela adenosina kinase ou inativada através da ação da adenosina desaminase, sendo convertida a inosina (LATINI; PEDATA, 2001).

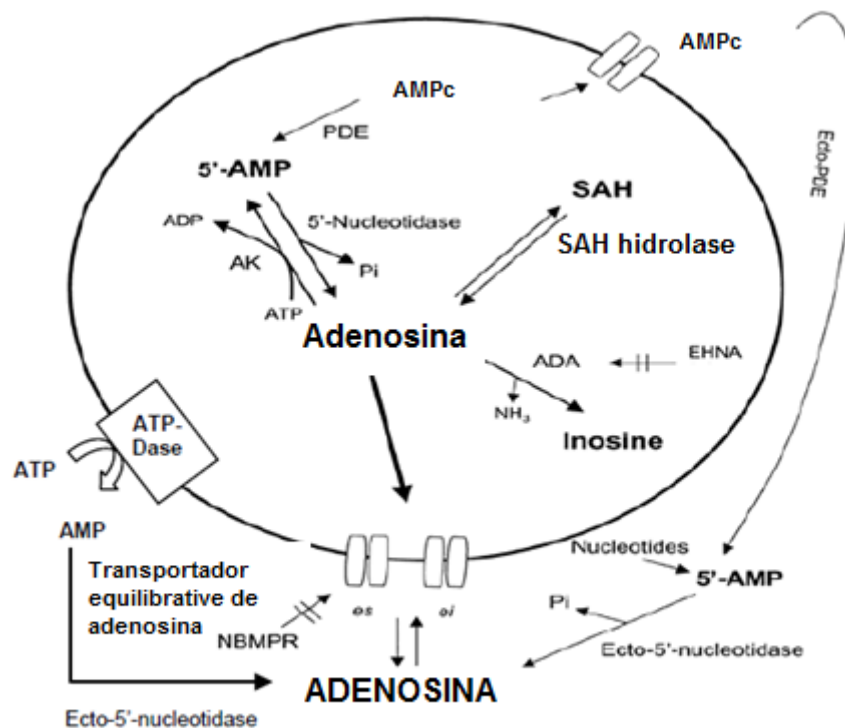


Figura 3. Vias de síntese, degradação e recaptação da adenosina. Adaptado de LATINI & PEDATA, 2001

### 2.8.2 Adenosina e inflamação

Diversos estudos indicam que os níveis de adenosina extracelular estão sujeitos a variações acentuadas na presença de diferentes condições adversas (SITKOVSKY, OHTA, 2005; THIEL, CALDWELL, SITKOVSKY, 2003). Existem evidências de que o sistema adenosinérgico apresenta um importante papel na regulação de processos relacionados com a resposta inflamatória e proteção de tecidos lesionados (SITKOVSKY; OHTA, 2005; HASKÓ; CRONSTEIN, 2004; FREDHOLM, 2007; ANTONIOLI et al., 2008). Por exemplo, em condições adversas como na hipóxia, foi demonstrado que um aumento agudo dos níveis de adenosina exercia ação protetora por meio da atenuação do edema e inflamação excessiva (VAN LINDEN, ELTZSCHIG, 2007).

A adenosina, através do aumento local da sua concentração, age como um freio natural de funções celulares imunológicas, limitando assim as respostas inflamatórias exacerbadas à insultos nocivos em condições metabólicas adversas (SITKOVSKY; OHTA, 2005; GESSI et al., 2008).

Em particular, a adenosina desempenha funções anti-inflamatórias via receptores presentes nas células do sistema imune, através dos quais regula a liberação de mediadores inflamatórios (Figura 4). Ao ativar receptores presentes na superfície dos macrófagos e monócitos, a adenosina estimula a liberação de IL-10 e inibe a liberação de IL-12, TNF- $\alpha$  e nos macrófagos a liberação de óxido nítrico. Esses efeitos favorecem um ambiente de estado anti-inflamatório (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004)

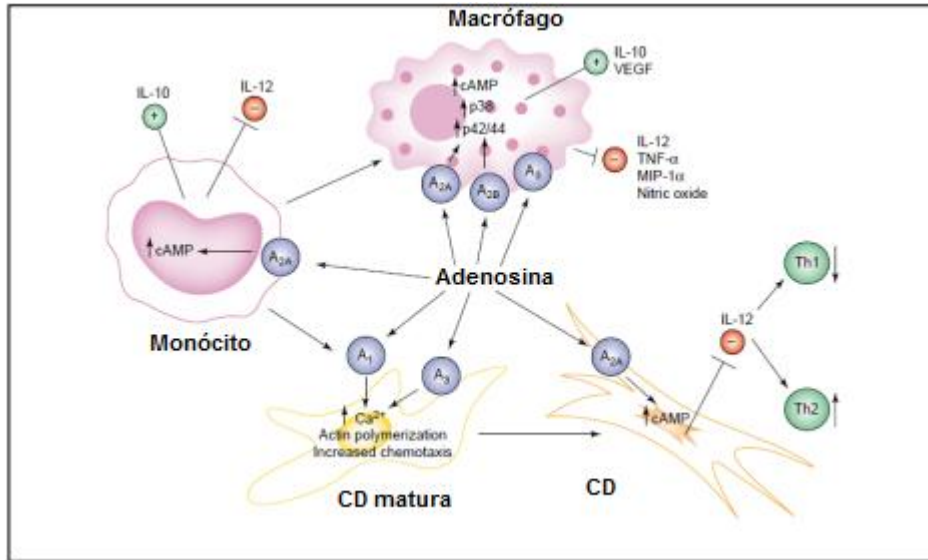


Figura 4. Interação do nucleosídeo adenosina com seus receptores presentes na superfície de células do sistema imune e os efeitos modulatórios. Adaptado de HASKO; CRONSTEIN, 2004.

O aumento dos níveis extracelulares de adenosina é proporcionado pela alteração na atividade das enzimas envolvidas na regulação dos seus níveis, estimulando as enzimas responsáveis pela síntese e inibindo as enzimas relacionadas com a degradação da adenosina (ELTZSCHIG et al, 2006). Neste contexto, a enzima catabólica adenosina desaminase (ADA) representa um ponto de controle importante para regular os níveis extracelulares de adenosina e, conseqüentemente, modular a estimulação do receptor de adenosina, desempenhando um papel crucial no controle da magnitude da resposta purinérgica em eventos patológicos (HASHIKAWA et al, 2004). Assim, a avaliação da expressão tecidual e a função de enzimas incumbidas de sintetizar ou remover a adenosina é de extremo interesse para a compreensão do papel de suas vias na fisiopatologia de várias doenças.

### 2.8.3 Adenosina desaminase (ADA, adenosina aminohidrolase, E.C. 3.5.4.4)

A ADA é uma enzima monomérica (40kDa) composta por 363 resíduos de aminoácidos e representa a principal via de degradação da Ado, promovendo a

desaminação hidrolítica irreversível da Ado em inosina e 2'-desoxiadenosina (dAdo) em 2'-desoxinosina (ÍBIS et al., 2007; IWAKI- EGAWA et al., 2004) (Figura 5).

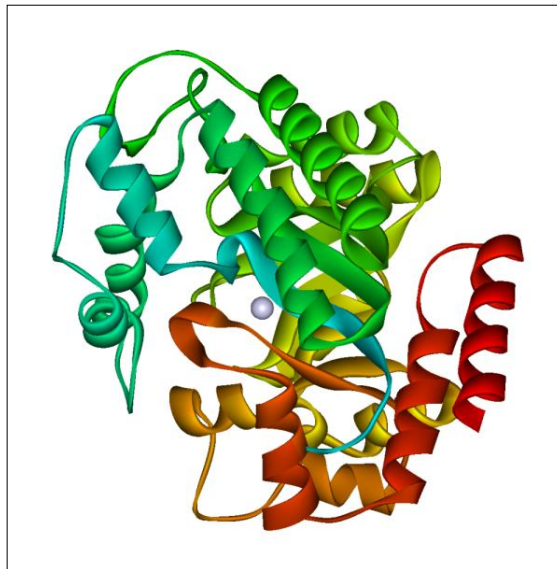


Figura 5. Estrutura da enzima adenosina desaminase. Fonte: Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Adenosina\\_deaminase](http://pt.wikipedia.org/wiki/Adenosina_deaminase)

Essa enzima está amplamente distribuída, sendo encontrada em plantas, bactérias, invertebrados, vertebrados e mamíferos (LUPIDI et al., 1992; AIKAWA et al., 1977; DADDONA, 1981). Além de ser encontrada no citoplasma das células, a ADA também pode ser encontrada na superfície celular como uma ecto-enzima que é responsável por controlar os níveis extracelulares de Ado (FRANCO et al., 1998). Na superfície de linfócitos T, encontra-se complexada com a Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV, CD26, E.C 3.4.14.5) (MORRISON et al., 1993; BLANCO et al., 1998). Na forma de ecto-enzima, a ADA também pode ser encontrada na superfície de células do sistema nervoso central (SNC), incluindo os neurônios (FRANCO et al., 1997).

A ADA apresenta duas isoenzimas, ADA1 e ADA2. A ADA1 existe em duas formas moleculares principais, um monômero e um dímero complexado com proteínas, tendo um alto peso molecular. Essa é encontrada em todas as células, especialmente em linfócitos e monócitos (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1976). Já a ADA2 existe apenas como um monômero estando presente em monócitos, macrófagos, soro e em menor quantidade no plasma (CRISTALLI et al., 2001; VAN



DER WEYDEN; KELLEY, 1979). Em tecidos como fígado, rins e intestino encontram-se ambas as formas. Nos tecidos humanos, a quantidade de enzima encontrada apresenta grande variação, sendo que uma alta densidade é encontrada no sistema linfoide (linfonodos, baço, timo) (IWAKI- EGAWA et al., 2004).

O envolvimento do metabolismo das purinas na atividade das células imunológicas aponta um papel crucial da ADA tanto no desenvolvimento quanto na função do sistema imune (ALDRICH; BLACKBURN; KELLEMS, 2000; FRANCO et al, 2007), uma vez que a ADA participa da regulação de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células dendríticas (GORGUNER et al., 2000).

Estudos tem demonstrado o envolvimento central da adenosina na proliferação dos linfócitos, assim como na produção e diferenciação de citocinas Th1/Th2 (NÉMETH et al., 2007; CSÓKA et al., 2008), confirmando, assim, um papel crítico desempenhado pela ADA na atividade dos linfócitos, através da modulação dos níveis endógenos de adenosina. Também, já está estabelecido que altos níveis de adenosina inibem a ativação e proliferação de linfócitos, como na Síndrome da Imunodeficiência Combinada (SCID), em que o paciente tem deficiência de ADA1 (FREDHOLM et al., 2008).

Esses efeitos da ADA na modulação das funções do sistema imunitário/inflamatório corroboram com a hipótese de que as alterações no metabolismo da adenosina poderiam afetar a atividade das células imunológicas e com o conceito de que a sinalização desse nucleosídeo representa um passo importante no processo de decisão molecular, controlando a inflamação.

#### 2.8.4 Sistema purinérgico e o etanol

Como dito anteriormente, o sistema purinérgico, através da ação dos seus componentes, desempenha papel crucial na regulação de diversas funções fisiológicas e patológicas. Dentre estas, as alterações decorrentes do consumo de etanol. A semelhança farmacológica entre o etanol e a adenosina forneceu uma forte evidência circunstancial para uma modulação adenosinérgica nas ações do etanol no SNC. Estudos tem demonstrado um papel importante da Ado como neuromodulador na mediação dos efeitos agudos e crônicos do consumo de etanol.

DAR e colaboradores (1983) foram os primeiros pesquisadores a relacionarem etanol e adenosina ao demonstrarem que a inibição do transportador de nucleosídeo equilibrativo tipo 1 (ENT1) provocou ataxia, uma das manifestações mais comumente observadas após a ingestão de etanol. Ao inibir o transportador ENT1, o etanol leva a um aumento dos níveis extraneuronais de adenosina que por sua vez, ativam seus receptores, mediando os efeitos do etanol (DIAMOND; GORDON, 1994; DUNWIDDIE; MASINO, 2001).

Além deste transportador, outros componentes do sistema purinérgico também são alterados pelo consumo de etanol. O etanol, exerce efeitos agudos e crônicos sobre a atividade das enzimas NTPDase e 5'NT neuronais em modelo animal de zebrafish. Foi demonstrado que tanto a exposição aguda quanto crônica ao etanol promove mudanças na atividade e expressão dessa via enzimática que é responsável por controlar os níveis de nucleotídeos extracelulares, e consequentemente a sinalização purinérgica (RICO et al., 2008; RICO et al., 2011).

Além dos efeitos no SNC, o etanol é conhecido por afetar a estrutura da membrana e atuar como um vasodilatador coronário, assim como a adenosina que atua como uma substância vasodilatadora quando liberada localmente. Dessa forma, enzimas de membrana, tais como 5'NT e ADA, em condições de intoxicação por etanol, apresentaram a atividades aumentadas no tecido do miocárdio devido à administração de etanol (ANAND; ANAND; SADASIVUDU, 1985).

Associado a alterações no tecido cardíaco, um estudo realizado em ratos demonstrou que a exposição aguda a diferentes doses de etanol induz um efeito bifásico na hidrólise plaquetária dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Em baixas doses (0,8 e 2g/Kg), o etanol provocou um aumento da atividade das enzimas NTPDase e 5'NT, enquanto que em altas doses (4 – 8g/Kg) inibiu a atividade destas enzimas. Já a exposição crônica ao etanol induziu diminuição da hidrólise de ATP e ADP e aumento na hidrólise de AMP. Estes resultados podem sugerir um possível mecanismo pelo qual o etanol provoca alterações nas funções plaquetárias, comumente observadas em pacientes dependentes de etanol (DIAS et al., 2008).

Tem sido demonstrado um papel da sinalização adenosinérgica no desenvolvimento de doenças hepáticas alcoólicas. O aumento nos níveis extracelulares de adenosina observado em fígado de ratos tem sido relacionado com muitos mecanismos que incluem o metabolismo oxidativo do etanol, inibição da

captação da adenosina via ENT1, bem como pelo metabolismo do AMP via 5'NT (NAGY, 1992; NAGY et al., 1990; PENG et al., 2008).

Além disso, os receptores de adenosina também apresentam papel importante na prevenção de doenças hepáticas alcoólicas. Como demonstrado recentemente por CHIANG e colaboradores (2013), antagonistas de receptores A<sub>2</sub>A podem prevenir e reverter a fibrose hepática provocada pelo etanol. Enquanto YANG e colaboradores (2013) demonstraram que a ativação de receptores A<sub>1</sub> protege camundongos de alterações hepáticas provocadas pela administração aguda de etanol por reduzir o estresse oxidativo e diminuir o acúmulo de lipídios no tecido hepático.

## **2.9 Plantas medicinais**

As plantas medicinais representaram durante séculos a base da terapêutica medicamentosa para o homem. No século XIX, com o desenvolvimento da química, as plantas ganharam grande importância no desenvolvimento de medicamentos, por serem a primeira fonte de obtenção de substâncias necessárias para a produção de medicamentos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; ZARONI et al., 2004; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Apesar de toda a evolução da indústria farmacêutica no desenvolvimento de inovações terapêuticas, o acesso às terapias modernas pelas populações carentes ainda enfrentam obstáculos básicos, que vão desde dificuldade ao acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos, a carência de recursos dos órgãos públicos de saúde e incessantes aumentos de preço nos medicamentos alopáticos (PARENTE; ROSA, 2001; VEIGA Jr.; PINTO; MACIEL, 2005).

Dados recentes divulgados pela OMS mostram que 70% a 90% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais no que se refere à Atenção Primária a Saúde (OMS 1993; 2011). Além disso, em países industrializados como Canadá, França, Alemanha e Itália a utilização de produtos naturais é igualmente significativa. Cerca de 70% a 90% de sua população utilizam esses recursos da medicina tradicional sob a denominação de complementar, alternativa ou não convencional (OMS, 2011).

No Brasil, Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, 1587, descreveu pela primeira vez o uso de plantas como remédio (VEIGA, 2002). Geralmente utilizados como alternativa aos produtos medicinais alopáticos, estudos sobre a medicina popular tem demonstrado que as plantas medicinais são utilizadas na forma bruta (não processadas), como infusões, decocções e tinturas ou como fitoterápicos (extratos padronizados e formulados de plantas) (GURIB-FAKIM, 2006; VALE, 2002).

Nos últimos anos, espécies tradicionalmente utilizadas pela sabedoria popular tem recebido atenção considerável de vários segmentos da comunidade científica (HEINRICH, 2000), estimulando estudos em muitos países e tem se tornado uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que podem resultar na descoberta de novos fármacos, para as mais diversas doenças. Além disso, dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são de origem vegetal e um número significativo de fármacos sintéticos são obtidos a partir de precursores naturais (RATES, 2001).

Atualmente, associado ao desejo de adotar um estilo de vida “natural”, a facilidade de obtenção e o baixo custo de produção tem levado à utilização crescente de novas formas de terapia. Dentro deste contexto, o Brasil em 2005, através do Sistema Único de Saúde (SUS), propôs a inclusão das plantas medicinais e fitoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde, contanto que esses produtos a base de plantas atendam a legislação vigente (BRASIL, 2006).

### 2.9.1 *Syzygium cumini*

*Syzygium cumini* (L) Skeels (sinônimo *Eugenia jambolana*, *Syzygium jambolanum*, *Eugenia cumini*, *Eugenia jambolana* (Figura 6) pertence à família Myrtaceae. É uma planta de origem indiana e pode ser encontrada em várias regiões do Brasil, inclusive no Rio Grande do Sul (BRAGANÇA, 1996). Conhecida popularmente como Jambolão, esta planta é consumida principalmente na forma de chá (PEPATO et al., 2001; RAVI et al., 2004; SHARMA et al., 2006).



Figura 6. *Syzygium cumini*  
Fonte: EMBRAPA, 2008.

Já foram identificados alguns compostos químicos no *S. cumini* como: flavonóides, saponinas, ácidos graxos, tanino, eugenol e triterpenos (SHARMA et al., 2006). Com grande tradição na medicina alternativa, já foram reportadas na literatura propriedades hipoglicêmicas, antiinflamatórias, antipiréticas, hipolipidêmicas e antioxidantes do *S. cumini* e ainda existe uma variedade de relatos indicando a atividade antidiabética em diferentes modelos experimentais (ONG; KHOO, 2000; STANLEY; KAMALAKKANNAN; MENON, 2003; SHARMA et al., 2006; LIMA et al., 2007) e também ao dano provocado por tratamento crônico com etanol (HOSSAIN et al., 2011).

As diversas partes da planta são utilizadas para fins terapêuticos (SIANI et al., 2000). Em especial, as folhas possuem propriedades antibacterianas e também têm sido extensivamente usada para o tratamento da DM, febre e gastropatia (PEPATO et al., 2001; JAGETIA; BALIGA, 2002; PARI; SARAVAN, 2002; SHARMA et al., 2006). Além dessas ações farmacológicas, as folhas já demonstraram efeito contra o dano hepático produzido por CCl<sub>4</sub> (MORESCO et al., 2007).

Considerando as inúmeras alterações provocadas pelo etanol a importantes sistemas fisiológicos, em especial aos efeitos do consumo agudo em excesso, associado à importância que a utilização de plantas medicinais representa para grande parte da população juntamente com o grande potencial de alternativas

terapêuticas relacionadas, é de grande valor a busca contínua de substâncias que contribuam para reverter o quadro de danos provocados pelo etanol.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar, através da realização de um modelo animal de intoxicação aguda, o efeito que uma alta dose de etanol pode provocar à atividade da ADA e a níveis de mediadores inflamatórios. Simultaneamente, verificar o efeito protetor do extrato aquoso das folhas de *S. cumini* (ASc) sobre as possíveis alterações provocadas nos parâmetros avaliados.

### **3.2 Específicos**

Avaliar, em ratos machos adultos, os efeitos do etanol e da administração do extrato aquoso da folha de *S.cumini* sobre:

- Marcadores bioquímicos de função hepática, AST e ALT;
- Marcador de estresse oxidativo, AOPP;
- Atividade da ADA em soro, linfócitos e córtex cerebral;
- Níveis séricos de mediadores inflamatórios, NOx, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ;

## 4 MANUSCRITO

4.1 *Sygygium cumini* leaf extract protects against ethanol-induced acute injury in rats by inhibiting adenosine deaminase activity and proinflammatory cytokine production

Manuscrito submetido ao periódico **Food and Chemical Toxicology**

Title: *Sygygium cumini* leaf extract protects against ethanol-induced acute injury in rats by inhibiting adenosine deaminase activity and proinflammatory cytokine production  
Food and Chemical Toxicology

Dear Dr Moretto,

Your submission entitled "*Sygygium cumini* leaf extract protects against ethanol-induced acute injury in rats by inhibiting adenosine deaminase activity and proinflammatory cytokine production" will be handled by Editor Siegfried Knasmueller.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fct/>.



*Sygygium cumini* leaf extract protects against ethanol-induced acute injury in rats by inhibiting adenosine deaminase activity and proinflammatory cytokine production

Lariane Oliveira Cargnelutti<sup>a</sup>, Paula E. R. Bitencourt<sup>a</sup>, Guilherme Bochi<sup>b</sup>, Tiago Duarte<sup>b</sup>, Aline Boligon<sup>a</sup>, Aline S. Pigatto<sup>c</sup>, Margareth Lynde Athayde<sup>a</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>a,b</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>a,b\*</sup>

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

Department of Clinical and Toxicology Analysis

Center of Health Sciences

Federal University of Santa Maria (UFSM)

97105-900 - Santa Maria, RS, Brazil

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

<sup>c</sup>Franciscan University Center, UNIFRA, Santa Maria, RS, Brazil

**Corresponding author:**

Maria Beatriz Moretto

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

Fax: +55 55 3220 8749

## Abstract

The consumption of a large quantity of alcohol over a relatively short time, commonly referred to as binge drinking, is an increasingly important public health issue in the world. At the same time, herbal drugs have received much attention in the treatment of many diseases. *Syzygium cumini* has anti-inflammatory, antipyretic and antioxidant properties. Hence, this study aimed to investigate the activity of the enzyme adenosine deaminase (ADA) and the release of inflammatory mediators in an animal model of acute ethanol intoxication. We also investigated the possible beneficial effects of an aqueous leaf extract of *S. cumini* (ASc). To address this issue, two groups of rats received a single oral dose of ethanol (5g/kg). After 30 min, a group was treated with 0.4 g/kg of ASc. A control group and a group treated only with ASc were also included in the experiment. After 6 h, we found that the acute administration of ethanol increased ADA activity in serum and in spleen lymphocytes and the IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and NO<sub>x</sub> serum levels. Moreover, ethanol decreased the levels of IL-10 and ADA activity in the cerebral cortex. The ASc treatment was effective in reversing the changes in ADA activity in the serum and spleen lymphocytes and in the levels of NO<sub>x</sub> and IL-10. In conclusion, our results suggest that the effect on the purinergic system is one of the mechanisms by which ethanol exerts its effects on the inflammatory mediators and on the central nervous system. The results also highlight the potential effect of *S. cumini* treatment in ameliorating changes caused by acute ethanol intoxication.

**Keywords:** Adenosine deaminase activity; acute ethanol intoxication; inflammation; *Syzygium cumini*;

## Introduction

Ethanol is a substance that is widely used. When consumed in excess, ethanol causes harmful health effects; therefore, policies to reduce and prevent its use are considered high-priority public health issues (WHO, 2014). In particular, the acute ethanol intoxication is a clinically harmful condition that results from the ingestion of a large amount of alcohol. This intoxication can promote heterogeneous clinical manifestations and involve different organs and apparatuses, with behavioral, cardiac, gastrointestinal, neuronal, pulmonary and metabolic effects (Vonghia et al., 2008). Ethanol consumption also exerts influence on the inflammatory response and dependent mechanisms of this response (Molina, 2014; Goodman et al., 2013; Li et al., 2011). Among the changes produced by high doses of alcohol are those involving the adenosinergic system. In fact, adenosine signaling has been implicated in the pathophysiology of many central nervous system (CNS) disorders, including alcoholism (Burnstock, 2008; Dunwiddie and Masino, 2001; Fredholm et al., 2005a).

The adenosine system is considered a powerful mechanism for regulation of various processes related to inflammatory response and protection of tissues from injury (Sitkoysky and Ohta, 2005; Antonioli et al., 2008). Furthermore, adenosine contributes to the resolution of inflammation by interacting with adenosine receptors at later stages of immune or inflammatory processes (Lawrence et al., 2002). When combined with other pathological mechanisms, the inflammation is suggested to contribute to the development of hepatic disease associated with excessive ethanol consumption (Beier and McClain, 2010).

The inflammatory changes caused by ethanol differ according to its consumption. Acute or moderate ethanol use causes an attenuated inflammatory response, whereas the heavy use is related to increased inflammation (Goral et al., 2008). In spite of the benefits of the development of immune and inflammatory responses of the body to an external injury, when in excess, they can cause significant tissue damage (Rodríguez-Molinero et al., 2007). In this sense, the demand for mechanisms of regulation of these processes is highlighted. By interacting with immune cell receptors, adenosine plays a powerful role in immunosuppression, regulating immune responses and limiting inflammatory responses to harmful external insults (Sitkoysky and Ohta, 2005; Gessi et al., 2008). Whereas the biological functions regulated by adenosine depend on its concentration

in the biophase receptors, the catabolic enzyme adenosine deaminase (ADA) thus plays a pivotal role in the modulation of purinergic responses (Antonioli et al., 2012). Several lines of evidence support a complex regulatory role played by ADA in different immune cell functions, as well as a significant involvement of this catabolic enzyme in the pathophysiology of several inflammatory diseases. Metabolically, ADA is an enzyme that catalyzes the conversion of adenosine to inosine, thus the increase in ADA activity may affect adenosine levels available for stimulation of adenosine receptors expressed on T-cell surface, contributing to impaired immune regulation (Hershfield, 2005; Mandapathil, 2010; Gessi et al., 2007) and protracted inflammatory responses (Conlon and Law, 2004);

The use of plants for medicinal purposes is widespread throughout the world. Because of this widespread use, traditional medicinal plants have been studied in relation to its various pharmacological properties (Bhuiyan et al., 2010). In this context, *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) has been shown to possess bioactive compounds such as flavonoids, glycosides, tannins, anthocyanins and ascorbic acid, to which are assigned the pharmacological activities of this plant. In particular, the leaves have antibacterial and anti-inflammatory properties and have been extensively used for the treatment of Diabetes (Pepato et al., 2001; Jagetia and Baliga, 2002; Pari Saravan, 2002; Sharma et al., 2006). In addition to these pharmacological actions, the leaves already showed effect against liver damage produced by carbon tetrachloride (Moresco et al., 2007). Indeed, Hossain et al. (2011) were the first to identify the hepatoprotective effect of the extract of *S. cumini* in an animal model of chronic ethanol exposure. Furthermore, previous studies have demonstrated that the aqueous leaf extract of *S. cumini* (ASc) exhibits protective properties to the increase in ADA activity observed in serum and cells of diabetic and hyperglycemic patients in vitro (Bopp et al., 2009; De Bona et al., 2010).

Thus, considering the numerous pathophysiological changes caused by excessive ethanol consumption, among which are inflammatory alterations, and also the wide use of *S. cumini* in folk medicine against inflammation and its known effects on the adenosine system, the present study was aimed at investigating the activity of ADA and the release of inflammatory mediators in acute ethanol intoxication using rats as an experimental model. The possible beneficial effect of an ASc in this model was also evaluated.

## Materials and methods

### *Chemicals*

Adenosine was obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Ethanol was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

### *Plant material and ASc preparation*

Leaves of *S. cumini* were freshly locally collected, cleaned, dried and powdered. They were identified by the Laboratory of Botanic and Pharmacognosy of the Franciscan University Center, Santa Maria, Brazil. The leaves were dried in a greenhouse with air circulation at 40 °C for approximately 48 h. Then, they were ground in a knife mill. The products were submitted to extraction in a Soxhlet apparatus until exhaustion. After extraction, the solvent was evaporated in a rotavapor to give the crude extract. The stock solution was made dissolving 1 g of the crude extract in 100 mL NaCl 0.9%. A voucher specimen (SMDB 14.001) was identified and deposited at the Herbarium of the Federal University of Santa Maria.

### *High-performance liquid chromatography characterization of the ASc*

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C<sub>18</sub> columns (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phase was: (A) acetonitrile: water (95:5, v/v) and (B) water: phosphoric acid (98:2, v/v), and the composition gradient was: 5% of A until 10 min and changed to obtain 20%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% A at 20, 30, 40, 50, 60, and 80 min, respectively, following the method described by Kamdem et al (2013), with slight modifications. ASc was analyzed at a concentration of 1 mg/mL. The presence of eleven antioxidant compounds was investigated, namely gallic, chlorogenic, caffeic, and ellagic acid, catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol and rutin. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the

commercial standards. The flow rate was 0.6 mL/min, injection volume was 40 µl and wavelength was 254 nm for gallic acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 325 nm for chlorogenic, ellagic and caffeic acids, and 366 nm for rutin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol and quercetin. The samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standard references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.025 - 0.300 mg/ml for quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol and rutin; 0.040 - 0.250 mg/ml for gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids; and 0.03 - 350 mg/ml for catechin and epicatechin. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curve for gallic acid:  $Y = 12674x + 1185.3$  ( $r = 0.9995$ ); catechin:  $Y = 12840x + 1178.2$  ( $r = 0.9999$ ); epicatechin:  $Y = 13042x + 1363.7$  ( $r = 0.9998$ ); chlorogenic acid:  $Y = 11969x + 1241.8$  ( $r = 0.9994$ ); caffeic acid:  $Y = 13158x + 1196.4$  ( $r = 0.9997$ ); ellagic acid:  $Y = 12547x + 1243.9$  ( $r = 0.9996$ ); rutin:  $Y = 12873x + 1265.4$  ( $r = 0.9993$ ); isoquercitrin:  $Y = 11987x + 1273.2$  ( $r = 0.9996$ ); quercitrin:  $Y = 11970x + 1283.7$  ( $r = 0.9995$ ); kaempferol:  $Y = 12650x + 1359.5$  ( $r = 0.9999$ ) and quercetin:  $Y = 12693x + 1365.2$  ( $r = 0.9997$ ). All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by Boligon et al. LOD and LOQ were calculated as  $3.3$  and  $10 \sigma/S$ , respectively, where  $\sigma$  is the standard deviation of the response and  $S$  is the slope of the calibration curve.

### *Animals*

Twenty four male Wistar rats weighing 190–210 g were used for the experiment. The procedures followed the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria (protocol number 074/2013). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### *Experimental protocol*

After the acclimation period, the animals were randomly separated into four groups of six animals each: control, ethanol (EtOH), ASc and ethanol plus ASc (EtOH+ASc). Initially, the control and ASc groups received water by gavage. The remaining groups received an acute (5 g/kg of body weight) dose of 40% (w/v) ethanol in aqueous solution (Portari et al., 2008). After thirty minutes, animals from control and EtOH groups received water by gavage, whereas animals from ASc and EtOH+ASc groups received 400 mg/kg of ASc by gavage (Hossain et al., 2011).

The animals were left to recover with free access to water, and 6 h after ethanol administration were anesthetized using isoflurane and euthanized to collect serum and tissues. The cerebral cortex tissue was homogenized, centrifuged and the supernatant was stored at -80°C. The spleen was used for isolation of lymphocytes.

### *Isolation of rat spleen lymphocytes*

Lymphocytes were isolated from the rat spleens under aseptic conditions as described by Sai Ram et al. (1997). Briefly, spleens were taken out, washed with cold PBS, cut into several pieces and gently crushed in PBS. Subsequently, cells were collected by centrifugation. Erythrocytes were lysed with lysis buffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and washed and resuspended in PBS. Cell number and viability were determined by trypan blue exclusion. More than 95% of the cells were found to be viable. Final cell suspension was performed in PBS (pH 7.4) and 3×10<sup>6</sup> cells/mL were used for each analysis.

### *Measurement of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and advanced oxidation protein products (AOPP) serum levels*

The levels of ALT and AST in the serum were detected using enzymatic methods with commercial kits from Labtest Diagnóstica S.A. (Brazil) using a semi-automatic biochemical analyzer (LABQUEST). The results were expressed as U/L.

AOPP was measured by the semiautomated method as described by Witko-Sarsat et al. (1998), with results expressed as  $\mu\text{M/L}$ .

#### *ADA activity assay in serum, lymphocytes and cerebral cortex*

ADA activity was estimated spectrophotometrically using the method of Giusti and Gakis (1971), which is based on the direct measurement of the formation of ammonia produced when ADA acts in excess of adenosine. The results were expressed in U/L for serum and lymphocytes and in U/g protein for the tissues.

#### *Measurement of IFN- $\delta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, NO $_x$ and IL-10 serum levels*

Inflammatory cytokine quantification was assessed by ELISA using commercial kits IFN- $\delta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-10 (R&D Systems, Minnesota, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, 96-well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature for 30 min. Then, the samples were added and incubated at 37 °C for 30 min. After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added and incubated. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro-ELISA reader.

Oxide nitric (NO $_x$ ) was determined indirectly by quantifying serum NO $_x$  (Tatsch et al., 2011), measured by the modified Griess method using the Cobas Mira<sup>®</sup> automated analyzer. The results were expressed as  $\mu\text{M/L}$ .

#### *Statistical analysis*

The analyses were performed using STATISTICA for Windows, version 6.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA). All data were analyzed using two way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test and presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant for all analyses.



## Results

### HPLC analysis

HPLC fingerprinting of ASc revealed the presence of gallic acid ( $t_R = 11.56$  min), catechin ( $t_R = 17.09$  min), chlorogenic acid ( $t_R = 23.64$  min), caffeic acid ( $t_R = 25.13$  min), ellagic acid ( $t_R = 30.15$  min), epicatechin ( $t_R = 35.84$  min), rutin ( $t_R = 39.96$  min), quercitrin ( $t_R = 44.83$  min), isoquercitrin ( $t_R = 46.57$  min), quercetin ( $t_R = 51.23$  min) and kaempferol ( $t_R = 60.34$  min) (Table 1).

### *Effect on ADA activity*

Initially, we observed that a high dose of ethanol caused a significant increase in the ADA activity in serum (a) and lymphocytes (b) when compared to the control ( $p < 0.001$ ) (Figure 1). However, ADA activity in the serum and lymphocytes of rats treated with ASc 30 minutes after ethanol administration returned to values comparable to those of control animals.

In contrast to the changes caused by ethanol in serum and lymphocytes, ADA activity was reduced in the cerebral cortex after acute ethanol administration when compared to the control group ( $p < 0.01$ ). Such effect was also reversed by ASc treatment (Figure 3).

### *Effect on inflammatory parameters*

As shown in Figure 2, acute ethanol intoxication has the potential to change inflammatory cytokines and mediator levels. The administration of ethanol was able to cause a significant increase in the serum levels of the proinflammatory mediators IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\delta$  and NO $_x$ , and a decrease in the anti-inflammatory cytokine IL-10 ( $p < 0.001$ ). Although ASc treatment did not prevent the increase in the levels of the proinflammatory cytokines IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and INF- $\delta$ , the beneficial effect of ASc was observed in preventing the ethanol-induced NO $_x$  increase. Moreover, ASc

partially prevented the reduction in IL-10 levels caused by ethanol intoxication ( $p < 0.01$ ).

*Effect of the acute ethanol intoxication on the levels of AST, ALT and AOPP*

After six hours of ethanol administration, no significant alterations were observed in the activity of the liver enzymes AST and ALT and in the AOPP level (Table 2).

## Discussion

The present study demonstrated that after six hours of acute intoxication, although ethanol did not change serum AST, ALT and AOPP levels, we observed significant immunological and inflammatory changes. Ethanol promoted an increase in the serum levels of proinflammatory mediators (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\delta$  and NO<sub>x</sub>) and a reduction in the anti-inflammatory cytokine IL-10. A significant finding in this study was the fact that ethanol caused an increase in ADA activity in serum and splenic lymphocytes. Despite increasing amounts of knowledge regarding the physiological role of ADA activity, there is currently no conclusive information on this enzymatic function under acute ethanol intoxication conditions, particularly under inflammatory conditions.

It has been shown that augmented ADA activity reflects accelerated purine turnover and high salvage pathway activity which may lead to reduce adenosine levels (Gulec et al., 2003; Kather, 1990) and to further tissue damage by interfering with the role of this nucleoside in the regulation of inflammation (Ohta and Sitkovsky, 2001). Moreover, this increased ADA activity may be related to changes in the levels of IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\delta$  and NO<sub>x</sub>, observed after acute exposure to high doses of ethanol. Acute inflammation is a critical homeostatic mechanism for protecting a host against noxious conditions, including tissue injury (Wang et al., 2012). In fact, many of the activities of effector cells of innate and adaptive immunity are mediated by cytokines. In this regard, several studies have demonstrated the pivotal involvement of adenosine in lymphocyte proliferation as well as in cytokine production and differentiation (Csóka et al., 2008; Németh et al., 2007), thus confirming a critical role played by ADA activity in lymphocyte action. Alcohol consumption, whether acute or chronic, has a significant impact on phenotypic and functional aspects of immune cells. Hence, the ethanol-induced increase in the ADA activity in spleen lymphocytes can also harm this control exercised by ADA in the cells of the immune system.

Alcoholism has been associated with a disruption in the balance and function of cytokines (Crews et al., 2006; González-Quintela et al., 2000). Changes such as increased levels of IL-4 and IFN- $\alpha$  in the stomach, systemic changes such as increased synthesis of IL-4 and decreased production of IL-10 by splenocytes are

observed (Andrade et al., 2006). Patients with alcoholic cirrhosis present increased concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 as well as decreased production of IL-10 and IL-2 (Romeo et al., 2007). Interestingly, we observed these changes with only one exposure to a high ethanol dose.

Considering the exacerbation of proinflammatory mediators and the reduction in the levels of anti-inflammatory mediators, it is necessary to find alternatives to prevent these harmful effects triggered by the use of ethanol. In this sense, numerous studies are dedicated to evaluate the protective effects of drugs or nature compounds on binge drinking (Zhang et al., 2012; Lv et al., 2010; Song et al., 2006). In this context, ASc was able to prevent the increase in ADA activity in serum and lymphocytes. It also reduced the serum levels of NOx and partially re-established levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. It is assumed that the mechanisms described in this study are advantageous in situations of acute high-dose ethanol exposure, since the reduction of ADA activity can result in increased levels of adenosine, which affect various physiological and pathological processes in cells, such as the release of inflammatory cytokines (Haskó and Cronstein, 2004).

This promising therapeutic effect may be related to the various phytochemicals present in the ASc. Furthermore, polyphenolic compounds including flavonoids and phenolic acids are known to have various physiological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer properties (Ushida et al., 2008).

Many neuronal responses to ethanol are suggested to be mediated by adenosine. Our results suggest that the reduction in ADA activity observed after acute exposure to ethanol can lead to accumulation of adenosine in the cerebral cortex of rats. In fact, the nucleoside adenosine is an important neuromodulator in the CNS having a key role in the control of excitatory and inhibitory functions (Fredholm et al., 2005b). Indeed, ataxia is one of the most significant depressant effects observed after excessive intake of ethanol (Choi et al., 2004; Clark and Dar, 1989). Therefore, these results may corroborate other study showing that ethanol acts directly on the brain to increase extracellular levels of adenosine (Sharma et al., 2010). It is consolidated products of ethanol metabolism play a key role in the brain mediating some actions of ethanol (Deitrich, 2004; Israel et al., 1994;). Thus, the reduction of ADA activity in the cerebral cortex could be mediated by these metabolites.

ASc was able to restore ADA activity to levels observed in the control animals. This action caused by ASc treatment can establish the homeostasis of adenosine in the CNS, preventing its accumulation and hence avoiding the effect of excess adenosine in the cerebral cortex.

## **Conclusion**

The acute ethanol intoxication in rats caused changes in the release of inflammatory mediators and in ADA activity. The ASc was effective in protecting changes in ADA activity and partially prevented the changes in the levels of the inflammatory mediators. These activities might be attributed, at least in part, to the high phenolic and flavonoid contents present in the ASc. Our results also suggest that the effect on the purinergic system is one of the mechanisms by which ethanol exerts its effects on the inflammatory mediators and on the CNS.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil, for supporting in this study.

## References

- Andrade, M.C., Menezes, J.S., Cassali, G.D., Martins-Filho, O.A., Cara, D.C., Faria, A.M., 2006. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol.* 146, 312-322.
- Antonioli, L., Colucci, R., La Motta, C., Tuccori, M., Awwad, O., 2012. Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. *Current Drug Targets.* 13, 842-862.
- Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., Del Tacca, M., Blandizzi, C., 2008. Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacol Ther.* 120, 233-253.
- Beier, J.I., McClain, C.J., 2010. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol. Chem.* 391, 1249–1264.
- Bhuyan, Z.A., Rokeya, B., Masum, N., Hossain, S., Mahmud, I., 2010. Antidiabetic effect of *Syzygium cumini* (L) seed on type II diabetic rats. *Dhaka Univ J Biol Sci.* 19, 157–164
- Boligon, A.A., Brum, T.F., Frohlich, J.K., Froeder, A.L.F., Athayde, M.L., 2012. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Research J Phytochem.* 6, 84-91.
- Bopp, A., De Bona, K.S., Bellé, L.P., Moresco, R.N., Moretto, M.B., 2009. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. *Fundam Clin Pharmacol.* 23,501-507.
- Burnstock, G., 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 7,575–590.
- Clark, M., Dar, M.S., 1989. Effect of acute ethanol on release of endogenous adenosine from rat cerebellar synaptosomes. *J Neurochem.* 52:1859–1865.
- Choi, D.S., Cascini, M.G., Mailliard, W., Young, H., Paredes, P., McMahon, T., Diamond, I., Bonci, A., Messing, R.O., 2004. The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci.* 7,855–861.
- Conlon, B.A., Law, W.R., 2004. Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin Exp Immunol.* 138, 14–20.
- Crews, F.T., Bechara, R., Brown, L. A., Guidot, D.M., Mandrekar, P., Oak, S., Qin, L., Szabo, G., Wheeler, M., Zo, J., 2006. Cytokines and Alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30, 720-730.
- Csóka, B., Himer, L., Selmeczy, Z., Vizi, E.S., Pacher, P., Ledent, C., Deitch, E.A., Spolarics, Z., Németh, Z.H., Haskó, G., 2008. Adenosine A2A receptor activation

inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.* 22,3491-3499.

De Bona, K.S., Bellé, L.P., Sari, M.H., Thomé, G., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Boligon, A., Athayde, M.L., Pigatto, A.S., Moretto, M.B., 2010. Syzygium cumini extract decrease adenosine deaminase, 5'nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. *Cell Physiol Biochem.* 26,729-738.

Deitrich, R.A., 2004. Acetaldehyde: Deja Vu du Jour. *J Stud Alcohol.* 65,557–572.

Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24,31–55.

Fredholm, B.B., Chen, J.F., Masino, S.A., Vaugeois, J.M., 2005a. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45,385–412.

Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., Vaugeois, J.M., 2005b. Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* 63,191–270.

Gessi, S., Merighi, S., Varani, K., Leung, E., Mac Lennan, S., Borea, P.A., 2008 The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther.* 117, 123-140.

Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Fogli, E., Sacchetto, V., Benini, A., Leung, E., Mac-Lennan, S., Borea, S.A., 2007. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal.* 3,109–116.

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

González-Quintela, A., Dominguez-Santalla, M.J., Pérez, L.F., Vidal, C., Lojo, S., Barrio, E., 2000. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine.* 12 (9), 1437-1440.

Goodman, M.D., Makley, A.T., Champion, E.M., Friend, L.A.W., Lentsch, A.B., Pritts, T.A., 2013. Preinjury alcohol exposure attenuates the neuroinflammatory response to traumatic brain injury. *Journal of Surgical Research.* 184, 1053-1058.

Goral, J., Karavitis, J., Kovacs, E.J., 2008. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol.* 42(4), 237-247.

Gulec, M., Akin, H., Yüce, H., Ergin, E., Elyas, H., Yalçın, O., Akyol, O., 2003. Adenosine deaminase and xanthine oxidase activities in bladder washing fluid from patients with bladder cancer: a preliminary study. *Clin Biochem.* 36,193–196.

Haskó, G., Cronstein, B.N., 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25(1), 33-39.

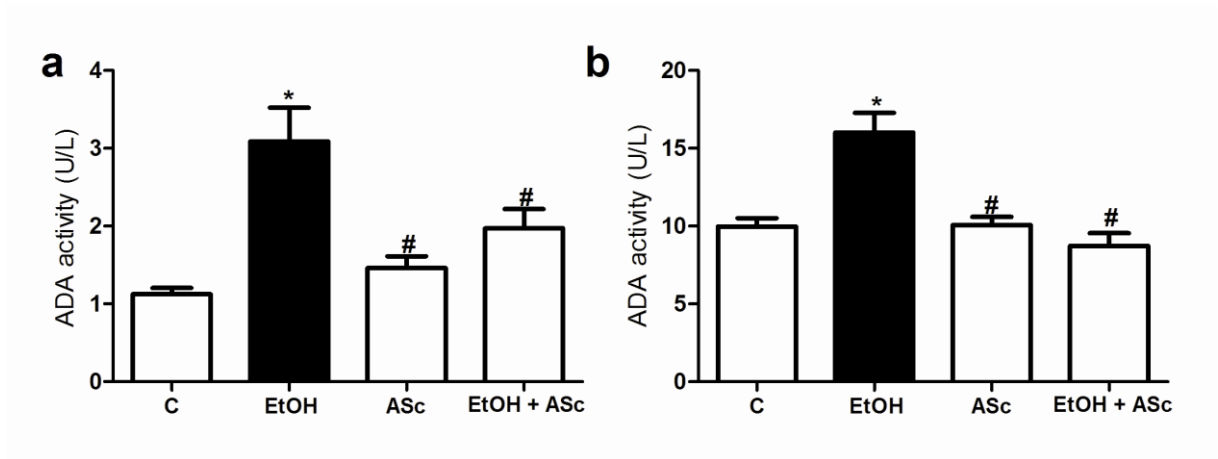


- Hershfield, M.S., 2005. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol.* 35, 25–30.
- Hossain, S., Chowdhury, I.H., Basunia, M.A., Nahar, T., Rahaman, A., Choudhury, B.K., Choudhuri, S.K., Mahmud, I., Uddin, B., 2011. *Syzygium cumini* Seed Extract Protects the Liver Against Lipid Peroxidation with Concurrent Amelioration of Hepatic Enzymes and Lipid Profile of Alcoholic Rats. *J Complem Int Med.* 8.
- Israel, Y., Orrego, H., Carmichael, F.J., 1994. Acetate-mediated effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18, 144–148.
- Jagetia, G.C., Baliga, M.S., 2002. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicol. Lett.* 132, 19-25.
- Kamdem, J.P., Olalekan, E.O., Hassan, W., Kade, I.J., Yetunde, O., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., (2013). *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. *Ind Crops Prod* 50, 625– 632.
- Kather, H., 1990. Pathways of purine metabolism in human adipocytes. Further evidence against a role of adenosine as an endogenous regulator of human fat cell function. *J Biol Chem.* 265, 96–102.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W., 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 787–795.
- Li, X., Akhtar, S., Kovacs, E. J., Gamelli, R.L., Choudhry, M.A., 2011. Inflammatory response in multiple organs in a mouse model of acute alcohol intoxication and burn injury. *J Burn Care Res.* 32(4), 489–497.
- Lv, X., Chen, Z., Li, J., Zhang, L., Liu, H., Huang, C., Zhu, P., 2010. Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress. *Inflamm. Res.* 59, 635-645.
- Mandapathil, M., Hilldorfer, B., Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Szajnik, M., Ren, J., Lang, S., Jackson, E.K., Gorelik, E., Whiteside, T.L., 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem.* 285, 7176– 7186.
- Molina, P.E., 2014. Alcohol bingeing exacerbates adipose tissue inflammation following burn injury. *Alcohol clin Exp Res.* 38 (1), 33–35.
- Moresco, R.N., Sperotto, R.L., Bernardi, A.S., Cardoso, R.F., Gomes, P., 2007. Effect of the Aqueous Extract of *Syzygium cumini* on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats. *Phytother. Res.* 21, 793–795.

- Németh, Z.H., Csóka, B., Wilmanski, J., Xu, D., Lu, Q., Ledent, C., Deitch, E.A., Pacher, P., Spolarics, Z., Haskó, G., 2006. Adenosine A2A receptor inactivation increases survival in polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 176, 5616-26.
- Ohta, A., Sitkovsky, M., 2001. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 414, 916–920.
- Pari, L., Saravanan, G., 2002. Antidiabetic effect of Cogent db, a herbal drug in alloxan-induced Diabetes mellitus. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 131, 19-25.
- Pepato, M. T., Folgado, V.B., Kettelhut, I.C., Brunetti, I.L., 2001. Lack of antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Braz J Med Biol Res.* 34(3), 389- 395.
- Portari, G.V., Marchini, J.S., Vannucchi, H., Jordao, A.A., 2008. Antioxidant effect of thiamine on acutely alcoholized rats and lack of efficacy using thiamine or glucose to reduce blood alcohol content. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 482–486.
- Rodríguez-Molinero, A., López-Diéguez, M., Banegas, J.R., 2007. Tissue homeostasis and cancer. *Med Hypotheses.* 68, 1333-1341.
- Romeo, J., Warnberg, J., Díaz, L.E., González-Gross, M., Marcos, A., 2007. Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. *J Physiol Biochem.* 63, 153–160.
- Sharma, S. B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S., 2006. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology.* 104, 367-373.
- Sai Ram, M., Sharma, S.K., Ilavazhagan, G., Kumar, D., Selvamurthy, W., 1997. Immunomodulatory effects of NIM– 76, a volatile fraction from neem oil. *J Ethnopharmacol.* 55: 133–139.
- Sharma, R., Engemann, S.C., Sahota, P., Thakkar, M.M., 2010. Effects of ethanol on extracellular levels of adenosine in the basal forebrain: an in vivo microdialysis study in freely behaving rats. *Alcohol Clin Exp Res.*, 34(5):813-818.
- Sitkovsky MV, Ohta A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 2005; 26: 299-304.
- Song, Z., Deaciuc, I., Song, M., Lee, D.Y., Liu, Y., Ji, X., McClain, C., 2006. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 407-413.
- Tatsch, E., Bochi, G.V., Pereira Rda, S., Kober, H., Agertt, V.A., de Campos, M.M., Gomes, P., Duarte, M.M., Moresco, R.N., 2011. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem.* 44(4), 348-350.

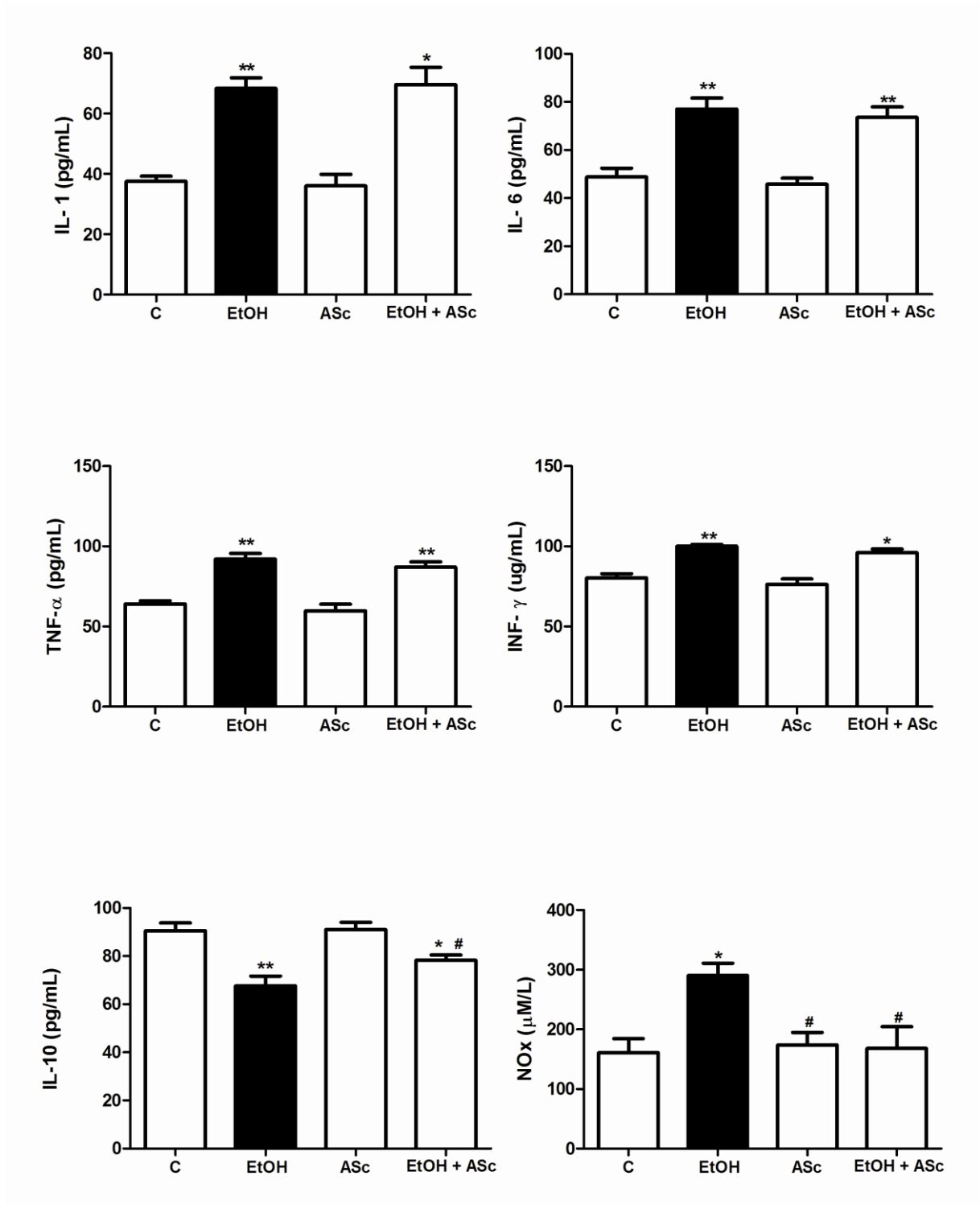
- Ushida, Y., Matsui, T., Tanaka, M., Matsumoto, K., Hosoyama, H., Mitomi, A., Sagesaka, Y., Kakuda, T., 2008. Endothelium-dependent vasorelaxation effect of rutinfree tartary buckwheat extract in isolated rat thoracic aorta. *J Nutr Biochem.* 19,700-707.
- Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., Addolarato, G., 2008. Acute alcohol intoxication. *European Journal of Internal Medicine.* 19, 561–567.
- Wang, J., Gao, B., Zakhari, S., Nagy, L.E., 2012. Inflammation in Alcoholic Liver Disease H. *Annu Rev Nutr.* 32, 343–368.
- Witko-Sarsat, V., Nguyen Khoa,T., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B., 1998. Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Adv Neph Necker Hospital.* 28, 321–341.
- World Health Organization, 2014. Global status report on alcohol and health – 2014 ed.
- Zhang, F., Zhang, J., Li, Y., 2012. Corn oligopeptides protect against early alcoholic liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 50, 2149–2154.

FIGURA 1



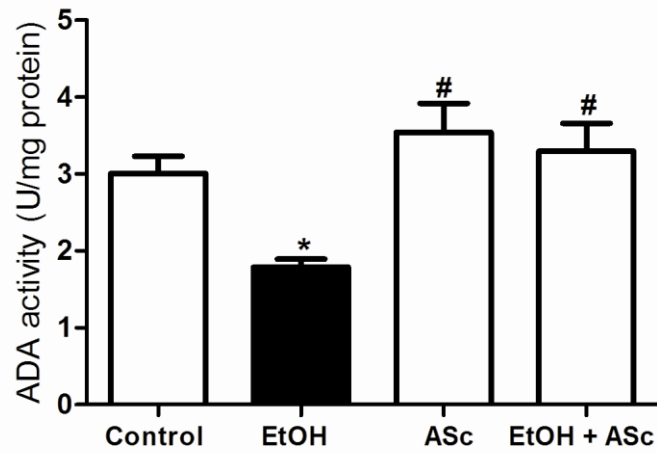
**Figure1.** Effect of the acute ethanol intoxication and/or ASc treatment on ADA activity in serum (a) and lymphocytes (b) of rats. Data are reported as mean  $\pm$  SD and expressed as units per liter. Statistically significant differences were determined by two-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test. \* $p < 0.05$  in comparison with the control group ( $n=6$ ). C, control; EtOH, ethanol; ASc, aqueous leaf extract of *Syzygium cumini*.

FIGURA 2



**Figure2.** Effects of the acute ethanol administration and/or ASc treatment on inflammatory parameters (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and NOx) of rats. Data are reported as mean  $\pm$  SD. Statistically significant differences were determined by two-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test. \* $p$ <0.01; \*\* $p$ <0.001 in comparison with the control group; # $p$ <0.01 in comparison with the EtOH group; (n=4). C, control; EtOH, ethanol; ASc, aqueous leaf extract of *Syzygium cumini*.

FIGURA 3



**Figure3.** Effect the acute ethanol intoxication and or ASc treatment on ADA activity in the cerebral cortex of rats. Data are reported as mean  $\pm$  SD and expressed as units per mg protein. Statistically significant differences were determined by the Duncan test. \* $p < 0.01$  in comparison with the control group; # $p < 0.01$  in comparison with the EtOH group (n=6). C, control; EtOH, ethanol; ASc, aqueous leaf extract of *Syzygium cumini*.

TABELA 1

Table 1. Composition of the aqueous leaf extract of *Syzygium cumini*.

Compounds	<i>Syzygium cumini</i>		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/mL	µg/mL
Gallic acid	29.82 ± 0.01a	2.98	0.027	0.089
Quercetin	19.07 ± 0.02b	1.90	0.010	0.034
Caffeic acid	17.50 ± 0.02b	1.75	0.016	0.054
Isoquercitrin	15.46 ± 0.05b	1.54	0.025	0.082
Rutin	11.31 ± 0.01c	1.13	0.009	0.030
Ellagic acid	10.62 ± 0.01c	1.06	0.022	0.074
Quercitrin	9.84 ± 0.04c	0.982	0.031	0.102
Chlorogenic	6.15 ± 0.03d	0.61	0.018	0.059
Epicatechin	4.98 ± 0.03e	0.49	0.007	0.023
Kaempferol	4.58 ± 0.01e	0.45	0.043	0.141
Catechin	4.37 ± 0.01e	0.43	0.036	0.119

Results are expressed as mean ± SD of three determinations. Means followed by different letters differ ( $p < 0.01$ ) by the Tukey test.

**TABELA 2**

Table 2. Effect of the acute ethanol intoxication on AST, ALT and AOPP levels.

	<b>Control</b>	<b>EtOH</b>	<b>ASc</b>	<b>EtOH + ASc</b>
AST (U/L)	120.4 ± 16.8	131.5 ± 23.4	123.0 ± 13.3	120.9 ± 19.3
ALT (U/L)	48.6 ± 9.6	44.4 ± 4.9	52 ± 7.1	47.5 ± 9
AOPP (µM/L)	12.0 ± 2.2	10.6 ± 1.8	9.67 ± 2.2	9.28 ± 1.31

Data are reported as mean ± SD (n=6). ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; AOPP, advanced oxidation protein products; EtOH, ethanol; ASc, aqueous leaf extract of *Syzygium cumini*.



## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que após seis horas da intoxicação por etanol:

1. Não foram observadas alterações nos níveis dos marcadores de função hepática e de estresse oxidativo, AOPP;
2. Houve um aumento na atividade da ADA no soro e linfócitos do baço e redução na atividade do córtex cerebral, mostrando que o sistema purinérgico é influenciado nesta situação;
3. Houve um aumento dos níveis séricos de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  , INF- $\gamma$  e NO $_x$  e diminuição de IL-10, demonstrando que mesmo uma única exposição ao etanol é capaz de provocar alteração na liberação de mediadores inflamatórios, favorecendo um estado pró-inflamatório;
4. O ASc preveniu o aumento da atividade da ADA em soro e linfócitos provocados pelo etanol e também preveniu a redução no córtex cerebral representando um importante mecanismo de preservação dos níveis de adenosina;
5. O ASc também foi capaz de prevenir alteração dos mediadores inflamatórios NO $_x$  e IL-10, podendo exercer um mecanismo de controle do estado inflamatório provocado pela intoxicação aguda por etanol;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, T.; UMEMORI-AIKAWA, Y.; FISHER, J. R. Purification and properties of the adenosine deaminase from the midgut gland of a marine bivalved mollusk. *Atrina* spp. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 58, p. 357-364, 1977.

ALBANO, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, p. 278-290, 2009.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALDRICH, M. B.; BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, p. 311-315, 2000.

ANAND, C. V.; ANAND, U.; SADASIVUDU, B. Acute effects of ethanol on production & disposal of adenosine from rat myocardium. **Biochemistry International**, v. 10, p. 311-317, 1985.

ANTONIOLI, L. et al. Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 120, p. 233-53, 2008.

ARBABI, S. et al. Alcohol (ethanol) inhibits IL-8 and TNF: role of the p38 pathway. **The Journal of Immunology**, v. 15, p. 7441-7445, 1999.

ARTEEL, G. E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. **Gastroenterology**, v. 124, p. 778-790, 2003.

BAGBY, G. J. et al. Suppression of the granulocyte colony-stimulating factor response to *Escherichia coli* challenge by alcohol intoxication. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 22, p. 1740-1745, 1998.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.

BAU, C. H. D. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, p. 183-190, 2002.

BERMOND II; D. M., HADNAN, T. Consumo de bebidas alcoólicas: interações com o benzeno e outras substâncias de uso ocupacional. **Revista de psiquiatria clínica**, v. 27, p. 65-70, 2000.

BERRIDGE, V. Drugs, alcohol, and the first world War. **The Lancet**, v. 22, p. 1840-1841, 2014.

BERTELLI, M. S.; CONCI, F. M. **Álcool e Fígado**. Caxias do Sul: EDUCS, 1. ed., p. 219, 1997.

BHUYAN, Z. A. et al. Antidiabetic effect of *Syzygium cumini* (L) seed on type II diabetic rats. **Dhaka University Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 157-164, 2010.

BLACKBURN, M. R. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. **Trends in Pharmacological Science**, v. 24, p. 66-70, 2003.

BLANCO, J. et al. Biochemical characterization of the SecA protein of *Streptomyces lividans*-interaction with nucleotides, binding to membrane vesicles and in vitro translocation of proAmy protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 171, p. 472-478, 1998.

BOÉ, D. M. et al. Alcohol-induced suppression of lung chemokine production and the host defense response to *Streptococcus pneumoniae*. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 27, p. 1838-1845, 2003.

BRAGANÇA, L. A. R. Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de plantas e fitoterápicos hipoglicemiantes. In: SIXEL, P.J. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Rio Janeiro : Universidade Federal Fluminense, Cap.5, p. 105-122, 1996.

BRASIL, Gabinete de Segurança Institucional. Secretaria Nacional Antidrogas. **I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. Brasília, DF, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária Portaria no 6/95 de 31.01.95. **Diário Oficial da União**, v. 200, secção I, p. 1523, 2006.

BUCHELE, F.; MARQUES, A. C. P. R.; CARVALHO, D. B. B. Importância da identificação da cultura e de hábitos relacionados ao álcool e outras drogas. In: BRASIL. SENAD. **Atualização de Conhecimentos sobre Redução da Demanda de Drogas**. Brasília, DF, v. 1, p. 223-233, 2004.

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.

CHIANG, D. J. et al. Adenosine 2A receptor antagonist prevented and reversed liver fibrosis in a mouse model of ethanol-exacerbated liver fibrosis. **PLoS One**, v. 18, p. 69114, 2013.

COPORTI, M. et al. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. **Genes & Nutrition**, v. 5, p. 101-109, 2010.

CREWS, F. T. et al. Cytokines and alcohol. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 30, p. 720-30, 2006.

CREWS, F. T. et al. Effects of ethanol on ion channels. **International Review of Neurobiology**, v. 39; p. 283-367, 1996.

CRISTALLI, G. et al. Adenosine deaminase: functional implications of inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, p. 105-128, 2001.

CSÓKA, B. et al. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. **FASEB Journal**, v. 22, p. 3491-3499, 2008.

DADDONA, P. E., Human adenosine deaminase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 12496-12501, 1981.

DALLE-DONE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, p. 389-406, 2006.

DAR, M. S.; MUSTAFA, S. J. WOOLLES, W. R. Possible role of adenosine in the CNS effects of ethanol. **Life Science**, v. 33, p. 1363-1374, 1983.

DENG, X. S.; DEITRICH, R. A. Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. **Current Clinical Pharmacology**, v. 2, p. 145-53, 2007.

DEVIERE, J. et al. High interleukin-6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. **Clinical Experimental Immunology**, v. 77, p. 221-225, 1989.

DI LUZIO, N. R. Comparative study of the effect of alcoholic beverages on the development of the acute ethanol-induced fatty liver. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**, v. 23, p. 557-561, 1962.

DIAMOND, I.; GORDON, A. S. The role of adenosine in mediating cellular and molecular responses to ethanol. **Journal EXS**. v. 71, p. 175-183, 1994.

DIAS, G. R. et al. Hormetic acute response and chronic effect of ethanol on adenine nucleotide hydrolysis in rat platelets. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 263-269, 2009.

DÍAZ, L. E. et al. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 50-53, 2002.

DIEHL, A. M. Cytokines and the molecular mechanisms of alcoholic liver disease. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 23, p. 1419-1424, 1999.

DOMÍNGUEZ-SANTALLA, M. J. et al. Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 25, p. 1198-1205, 2001.

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

ELTZSCHIG, H. K. et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p. 783-796, 2003.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2008. Disponível em: [www.cpact.embrapa.br](http://www.cpact.embrapa.br)

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress Neurobiology**, v. 52, p. 283-294, 1997.

FRANCO, R. et al. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. **Critical Reviews in Immunology**, v. 27, p. 495-509, 2007.

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

FREDHOLM, B. B. et al. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **International Union of Basic and Clinical Pharmacology**, v. 63, p. 1-34, 2011.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 1315-1323, 2007.

FREDHOLM, B. B. et al. XXV International Union of Pharmacology. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 527-552, 2001.

GESSI, et al. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. **Pharmacology Therapy**. v. 117, p. 123-140, 2008.

GIGLIOTTI, M. et al. Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 7, p. 107-112, 2008.

GILMAN, A. G. et al. **GOODMAN & GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

GOODMAN, M. D. et al. Preinjury alcohol exposure attenuates the neuroinflammatory response to traumatic brain injury. **Journal of Surgical Research**, v. 184, p. 1053-1058, 2013.

GORAL, J.; KARAVITIS, J.; KOVACS, E. J. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. **Alcoholism**, v. 42, p. 237-247, 2008.

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

GRAMENZI, A. et al. Review article: alcoholic liver disease--pathophysiological aspects and risk factors. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, p. 1151-1161, 2006.

GUERRI, C.; MONTOLIU, C.; RENAU-PIQUERAS, J. Involvement of free radical mechanism in the toxic effects of alcohol: implications for fetal alcohol syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 366, p. 291-305, 1994.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAKULINEN, T. et al. Cancer morbidity among two male cohorts with increased alcohol consumption in Finland. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 52, p. 1711-1714, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.

HASHIKAWA, T. et al. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. **FASEB Journal**, v. 18, p. 131-133, 2004.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 33-39, 2004.

HASKÓ, G.; PACHER, P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 447-455, 2008.

HEBERLEIN, A. et al. TNF- $\alpha$  and IL-6 serum levels: Neurobiological markers of alcohol consumption in alcohol-dependent patients? **Alcohol**, v. 48, p. 671-676, 2014.

HEINRICH, M. Ethnobotany and its role in drug development. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 479-488, 2000.

HEINZ, A.; GOLDMAN, D. Genotype effects on neurodegeneration and neuroadaptation in monoaminergic neurotransmitter systems. **Neurochem International**, v. 37, p. 425-432, 2000.

HIDEYUKI, A. et al. Effect of acute low-dose ethanol on inflammatory reactions to endotoxin-induced shock in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 37, p. 649-654, 2012.

HINES, I. N.; WHEELER, M. D. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. **American Journal of Physiology**, v. 287, p. 310-314, 2004.

HOSSAIN, S. et al. *Syzygium cumini* Seed Extract Protects the Liver Against Lipid Peroxidation with Concurrent Amelioration of Hepatic Enzymes and Lipid Profile of Alcoholic Rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 8, p., 2011.

HOSTETTMANN, K; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química- IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003, 152 p.

HUNT, W. A. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain- a review. **Alcoholism**, v. 13, p. 145-147, 1996.

IBIŞ, M. et al. Serum adenosine deaminase levels in pancreatic diseases. **Pancreatology**, v. 7, p. 526-530, 2007.

IWAKI-EGAWA, S., NAMIKI, C., WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Comp Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry & Molecular Biology**, v. 137, p. 247-254, 2004.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 247-64, 2006.



JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. **Toxicology Letters**, v. 132, p. 19-25, 2002.

JANEWAY, C. A.;MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JERNIGAN, D. H. Applying commodity chain analysis to changing modes of alcohol supply in a developing country. **Addiction Journal**, v. 95, p. 465-475, 2000.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica & Clínica*. Rio de Janeiro: Nova Guanabara, 2006.

KHAN, A. Q.; NAFEES, S.; SULTANA, S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NFκ-B activation and proinflammatory cytokine production. **Toxicology**, v. 279, p. 108-114, 2011.

KHORUTS, A. et al. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. **Hepatology**, v. 13, p. 267-276, 1991.

KOCH, O. R. et al.; Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 191-198, 2004.

KUMARI, M.; TICKU, M. K. Regulation of NMDA receptors by ethanol. **Progress in Drug Research**, v. 54, p. 152-89, 2000.

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

LI, X. et al. Inflammatory response in multiple organs in a mouse model of acute alcohol intoxication and burn injury. **Journal of Burn Care & Research**, v. 32, p. 489-497, 2011.

LIANG, Y.; YELIGAR, S. M.; BROWN, L. A. Chronic-alcohol-abuse-induced oxidative stress in the development of acute respiratory distress syndrome. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

LIEBER, C. S. Metabolism and Metabolic Effects of alcohol. **Seminars in Hematology**, v. 17, 1980.

LIEBER, C. S. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. **Drug Metabolism Reviews**, v. 36, p. 511-29, 2004.

LIEBER, C. S.; ABITTAN, C. S. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 365-379, 1999.

LIEBER, C. S. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. **Baillieres Clinical Gastroenterology**, v. 7, p. 581-608, 1993.

LIEBER, C. S.; DAVIDSON, C. S. Some metabolic effects of ethyl alcohol. **American Journal of Medicine**, v. 33, p. 319-327, 1962.

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

LUNDY, J. et al. The acute and chronic effects of alcohol on the human immune system. **The Journal of Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v. 141, p. 212-218, 1975.

LUPIDI, G. et al. Adenosine deaminase from bovine brain: purification and partial characterization. **Biochemistry International**, v. 26, p. 1053-1063, 1992.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MATOS, L. C. et al. Lymphocyte subsets in alcoholic liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 5, p. 46-55, 2013.

McCLAIN, C. et al. Cytokines and alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 13, p. 170-182, 1993.

McCLAIN, C. J. et al. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. **Alcoholism**, v. 34, p. 67-79, 2004.

McCLAIN, C. J.; COHEN, D. A. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. **Hepatology**, v. 9, p. 349-351, 1989.

MELLO, M. L. M. et al. **Álcool e problemas ligados ao álcool em Portugal**, Lisboa, Direção Geral de Saúde, 2001.

MOLINA, P. E. Alcohol bingeing exacerbates adipose tissue inflammation following burn injury. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 38, p. 33-35, 2014.

MOREIRA, L. B.; FUCHS, F. D.; MORAES, R. S.; BREDEMEIER, M. et al. Alcoholic beverage consumption and associated factors in Porto Alegre, a Southern Brazilian City: a population-based survey. **Journal Studies Alcohol**, v. 57, p. 253-9, 1996.

MORESCO, R. N. et al. Effect of the Aqueous Extract of *Syzygium cumini* on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 793-795, 2007.

MORIWAKI, Y.; YAMAMOTO, T.; HIGASHINO, K. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. **Histology and Histopathology**, v. 14, p. 1321-1340, 1999.

MORRISON, M. E. et al. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is cell surface ectopeptidase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 272-276, 1993.

MOSS, M. et al. The role of chronic alcohol abuse in the development of acute respiratory distress syndrome in adults. **JAMA**, v. 275, p. 50-54, 1996.

NAGY, L. E. Ethanol metabolism and inhibition of nucleoside uptake lead to increased extracellular adenosine in hepatocytes. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. 1175-1180, 1992.

NANCHAHAL, K.; ASHTON, W. D.; WOOD, D. A. Alcohol consumption, metabolic cardiovascular risk factors and hypertension in women. **International Journal of Epidemiology**, v. 29, p. 57-64, 2000.

NELSON, S.; KOLLS, J. K. Alcohol, host defence and society. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 205-209, 2002.

NÉMETH, Z. H, et al. Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. **FASEB Journal**, v. 21, p. 2379-2388, 2007.

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

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest Journal**, v. 117, p. 1162-1172, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global status report on alcohol and health**. 2011. ed. Geneva, 2011.

OMS. **Global status report on alcohol and health** . 2014. ed. Geneva, 2014.

OMS. **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**. Geneva, 2001.

OMS. **Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Regional office for the Western Pacific. Manila: WHO, 1993.

OMS. **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: 2011.

PARENTE, C. E. T., ROSA, M. M. T. Plantas comercializadas como medicinal no município de Barra do Piraí, RJ. **Rodriguésia**, v. 52, p. 47-59, 2001.

PARI, L.; SARAVANAN, G. Antidiabetic effect of Cogent db, a herbal drug in alloxaninduced Diabetes mellitus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 131, p. 19-25, 2002.

PENG, S. L.; FATENEJAD, S.; CRAFT, J. Scleroderma: a disease related to damaged proteins? **Nature medicine**, v, 3, p. 276-278, 1997.

PENG, Z. et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**. v. 27, p. 821-824, 2008.

- PEPATO, M. T. et al. Lack of antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 3, p. 389- 395, 2001.
- PIVAC, N. et al. Platelet serotonin concentration in alcoholic subjects. **Life Science**, v. 76, p. 521-531, 2004.
- PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research Clinical Practice**, v. 77, p. 188-192, 2007.
- POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163-82, 2004.
- PRUETT, S. B. et al. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. **Toxicological Sciences**, v. 117, p. 314-324, 2010.
- QIN, L. et al. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, p. 5-10, 2008.
- RAMCHANDANI, V. A.; BOSRON, W. F.; LI, T. K. Research advances in ethanol metabolism. **Pathologie Biologie**, v. 49, p. 676-82, 2001.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RATSMA, J. E.; VAN DER STELT, O.; GUNNING, W. B. Neurochemical markers of alcoholism vulnerability in humans. **Alcohol and Alcoholism**, v. 37, p. 522-533, 2002.
- REIS, N. T.; COPLE, C. S. **Nutrição Clínica e Alcoolismo**. Rio de Janeiro: Livraria Rubio, 2003.
- RICO, E. P. et al. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. **Neurotoxicology**, v. 32, p. 871-878, 2011.

RICO, E. P. et al. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. **Neurochemistry International**, v. 52, p. 290-296, 2008.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409-30, 2006.

ROMEO, J. et al. Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 153-160, 2007.

SAEED, R. W. et al. Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. **The Journal of Immunology**, v. 15, p. 6376-6383, 2004.

SATO, A. et al. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, p. 1633-1640, 2005.

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

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, p. 2216-2231, 2013.

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

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

SITKOVSKY, M. V.; OHTA, A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends Immunology**, v. 26, p. 299-304, 2005.

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

STANDRIDGE, J. B.; ZYLSTRA, R. G.; ADAMS, S. M. Alcohol consumption: an overview of benefits and risks. **South Medical Journal**, v. 97, p. 664-672, 2004.

STANELY, P.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V. P. Syzygium cumini seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 205-209, 2003.

STANLEY, A. C.; LACY, P. Pathways for cytokine secretion. **Physiology (Bethesda)**, v. 25, p. 218-29, 2010.

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

SZABO, G. et al. Effect of ethanol on inflammatory responses. Implications for pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, p. 115-123, 2007.

SZABO, G.; MANDREKAR, P.; DOLGANIUC, A. Innate immune response and hepatic inflammation. **Seminars in Liver Disease**, v. 27, p. 339-350, 2007.

THIEL, M.; CALDWELL, C. C.; SITKOVSKY, M. V. The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. **Microbes Infection**, v. 5, p. 515-26, 2003.

TUMA, J. D. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, p. 306-308, 2002.

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

VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 5448-5456, 1976.

VAN LINDEN, A.; ELTZSCHIG, H.K. Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 7, p. 1437-1447, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 299-315, 2008.

WANG, J. et al. Inflammation in Alcoholic Liver Disease H. **Annual Review of Nutrition**, v. 32, p. 343-368, 2012.

WU, W. J.; WOLCOTT, R. M.; PRUETT, S. B. Ethanol decreases the number and activity of splenic natural killer cells in a mouse model for binge drinking. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, p. 722-729, 1994.

YANG, P. et al. Endogenous A1 adenosine receptor protects mice from acute ethanol-induced hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 5, p. 100-106, 2013.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673-94, 2008.

ZARONI, M. et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 29-39, 2004.

ZAVIALOV, A. V.; ENGSTROM, A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **The Journal of Biochemistry**, p. 391, 2005.

ZHANG, X. et al. Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: from bad to ugly en route to oxidative stress. **Alcoholism**, v. 32, p. 175-186, 2004.



## **ANEXO**

---

# Anexo A – Comprovante de submissão do manuscrito a revista Food and Chemical Toxicology.

The screenshot displays the Elsevier Editorial System (EES) interface. At the top, the browser address bar shows the URL [ees.elsevier.com/fct/default.asp](http://ees.elsevier.com/fct/default.asp). The page title is "Food and Chemical Toxicology". A navigation bar includes links for "home", "main menu", "submit paper", "guide for authors", "register", "change details", "log out", "contact us", and "help". A user profile section shows the username "Moretto" and a "Switch To: Author" dropdown menu. A version number "Version: EES\_2014\_9" is visible in the top right corner.

The main content area features a message box with the following text:

Thank you for approving "Sygygium cumini leaf extract protects against ethanol-induced acute injury in rats by inhibiting adenosine deaminase activity and proinflammatory cytokine production". An email has been sent to you confirming that the journal has received this submission. Your Co-Author(s) may also receive this email, depending on the journal policy.

Below the message box is a link for [Main Menu](#).

The bottom of the page contains a footer with links for "Help", "Privacy Policy", "Terms and Conditions", and "About Us". The system tray at the bottom right shows the date and time as "07/01/2015 09:30" and includes icons for network, volume, and power.