

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Efeitos de Flavonóides e Suco de Uva sobre a hidrólise de
nucleotídeos em soro de ratos adultos.**

ANA PAULA SPIER

Orientador

João José Freitas Sarkis

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito
parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me dar força e me mostrar o melhor caminho.

Aos meus pais, por todo o apoio e incentivo, e por me ensinarem que a convicção firme e otimista constitui a força para a realização de todos nossos desejos; sem palavras...

Ao Sarkis, meu orientador, o meu eterno orgulho e agradecimento para ele que acreditou em mim como profissional e me abriu as portas para a área da pesquisa. Um exemplo de pessoa, mestre, sábio, amigo...

À Denise, minha co-orientadora, obrigada pelo apoio, incentivo, e principalmente pela amizade...

Ao Marcello Mascarenhas, que por acreditar em mim, contribuiu para que eu conseguisse chegar até a UFRGS.

A Carla Bonan, meu muito obrigada por me fazer conhecer o professor Sarkis e seu trabalho, e pela amizade durante todo esse tempo em que estive no laboratório.

À Ana Battastini, pela amizade e ajuda sempre que necessária.

À Cristina, por ter me introduzido no mundo da pesquisa, ensinando, acompanhando, apoiando e por ter se tornado também uma grande amiga...meu eterno muito obrigada.

A todos os colegas e amigos dos laboratórios 22 e 24, à Ale Japa, à Ale Bruno, à Déia, à Barbara, à Dani Pochmann, à Dani Trentin, à Denise, à Eliz, à Fernanda, a Gi, à Lela, à Laila, à Jô, ao Jean, à Luci, à Rô, à Sandra, à Vanessa

Silveira e à Vanessinha, pela amizade e companheirismo, dentro e fora do laboratório, e pela troca de experiências e ajuda no dia a dia.

À Professora Angela Wise e sua aluna Caren Bavaresco pela colaboração e disposição em ajudar neste trabalho.

À Lucimara por cuidar do nosso material com todo cuidado.

À todos os professores, colegas e funcionários do departamento que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Valeri, pela disposição em arrumar ratos e lugar para deixá-los durante os meus experimentos; obrigada também pela confiança.

À toda minha família que sempre acreditou e me apoiou em todos os momentos e em todas as minhas decisões. Um agradecimento especial aos meus queridos irmãos Carlos e Tânia e ao Cláudio...que sei que onde quer que você esteja, estará sempre torcendo por mim.

A todos meus amigos que me apoiam, me acompanham e escutam meus lamentos, especialmente à Vivian, o meu muito obrigado.

Sumário

Parte I

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Índice de Figuras.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
1. Introdução	
1.1- Sistema Purinérgico.....	9
1.2- NTPDases e 5` nucleotidase.....	10
1.3- Flavonóides.....	13
1.4-Compostos Bioativos.....	16
1.5- Compostos Antioxidantes.....	18
2. Objetivos.....	22

Parte II

3.Artigo científico

<u>SPIER, A.P.</u> ; BAVARESCO, C.S.; WYSE, A.T.S.; CARVALHO, D.; SARKIS,J.J.F. Effects of resveratrol and purple grape juice on nucleotide hydrolysis by serum of adult rats. Submetido à revista Food Chemistry.....	23
---	----

Parte III

4.Discussão	46
5. Conclusões.....	56
6.Referências Bibliográficas.....	57
7. Anexo 1.....	67

Resumo

No presente estudo, foi avaliada a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em soro de ratos em presença dos seguintes flavonóides: resveratrol, quercitina e rutina *in vitro*. Também avaliamos os efeitos do resveratrol, administrado na forma de suco de uva sobre a hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos adultos. Por último foi avaliado o efeito do resveratrol sobre a hidrólise dos nucleotídeos, administrado na forma de suco de uva, antes dos ratos serem submetidos ao tratamento com arginina. A hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos *in vitro*, em presença do resveratrol, aumentou para o substrato ATP em aproximadamente 40% e para o substrato ADP em aproximadamente 60%, mas não mostrou qualquer efeito sobre a hidrólise do AMP, ou seja, a enzima NTPDase foi ativada, enquanto a 5'-nucleotidase não sofreu qualquer alteração. Para a quercitina e para a rutina, outros flavonóides testados *in vitro* nas mesmas condições, observamos que a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP diminuiu. Foi avaliado também, o efeito do suco de uva sobre a hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos submetidos a cinco, dez e quinze dias de tratamento. Após quinze dias de tratamento, observou-se aumento na hidrólises de ATP, ADP e AMP. Com esse resultado então, tentamos avaliar se animais recebendo injeções de arginina (tratamento que já mostrara redução na hidrólise dos nucleotídeos em trabalho anterior), tendo previamente acesso ao suco de uva durante quinze dias, poderiam recuperar as atividades de hidrólise dos nucleotídeos. Concluímos que o resveratrol pode aumentar a hidrólise destes nucleotídeos em soro de ratos e que o suco de uva se administrado no lugar da água, também leva a um aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP. Nos protocolos onde houve diminuição na atividade de hidrólise do nucleotídeos por tratamento com arginina, observamos que o tratamento prévio com suco de uva preveniu o decréscimo na atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase.

Abstract

In the present study, we evaluate ATP, ADP and AMP hydrolysis in rat serum in presence of the following flavonoids: resveratrol, quercetin and rutin *in vitro*. Also evaluate the effects of resveratrol administered at purple grape juice form on serum nucleotides hydrolysis. For last we evaluate the effect of resveratrol administered at grape juice before arginine treatment, on serum nucleotide hydrolysis. The nucleotide hydrolysis by rat serum *in vitro*, in presence of resveratrol, was increase for ATP substratum (approximately 40%) and ADP substratum (approximately 60%), but did not show any effect on AMP hydrolysis, in other words, the NTPDase was activated, while the 5'-nucleotidase was not suffer any effects. For quercetin and rutin, other flavonoids tested *in vitro* in the same condition, we observed that the hydrolysis for the nucleotides ATP, ADP and AMP was decreased. We evaluated also, the effects of treatment with grape juice during five, ten and fifteen days on the nucleotide hydrolysis by rat serum. After fifteen days of treatment the nucleotide hydrolysis was increased for ATP, ADP and AMP. After that, we tried to evaluate, if animals injected with arginine (where the nucleotide hydrolysis by serum was decreased in a previous study) that receiving before the grape juice, for fifteen days, can recuperate the activities for nucleotide hydrolysis. We concluded that resveratrol can increase the nucleotide hydrolysis in rat serum, and the grape juice when is used in the place of water is adequate to increase the nucleotide hydrolysis for ATP, ADP and AMP. In the protocols where we have decrease on the hydrolysis activity of nucleotides by treatment with arginine, we noted that previous treatment with purple grape juice could prevent the decrease on enzymes NTPDase and 5'-nucleotidasde activity.

Índice de Figuras

Figura 1 – Prognóstico da topografia das ectonucleotidases de membrana.

Figura 2 – Estrutura química dos flavonóides estudados

Lista de abreviaturas

ATP - adenosina 5' – trifosfato

ADP - adenosina 5' – difosfato

AMP - adenosina 5' – monofosfato

DMSO - dimetil sulfóxido

NO - Óxido Nitríco

SOD - Superóxido Dismutase

CAT - Catalase

GSH-Px - Glutathiona Peroxidase

ERO - Espécies reativas de oxigênio

RL - Radical Livre

LDL - Low density lipoprotein

1- Introdução

1.1 Sistema Purinérgico

Purinas e nucleotídeos de purinas são essenciais para todas as células. O ATP é usado como fonte de energia para praticamente todas as atividades celulares, enquanto a adenina é um componente dos ácidos nucleicos¹.

Nucleotídeos extracelulares exercem seus efeitos biológicos interagindo com receptores presentes na superfície de membranas celulares. Os receptores que ligam nucleotídeos e nucleosídeos são divididos em dois grupos: P1 e P2.

Os receptores purinérgicos, foram descritos pela primeira vez em 1976² e dois anos mais tarde foram identificados dois tipos: receptores P1 para Adenosina e P2 para ATP e ADP². Mais especificamente os receptores P1 se subdividem em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ e são ativados com potencial agonista na ordem adenosina > AMP > ADP > ATP. Já os receptores P2 ligam preferencialmente ATP/UTP e seus derivados difosfato, tendo uma afinidade muito baixa pelos derivados monofosfato (ATP > ADP > AMP > adenosina). São subdivididos em dois grandes grupos: os receptores ianotrópicos P2X e os receptores metabotrópicos P2Y^{3,4,5}.

O ATP é o principal nucleotídeo da adenina e tem como uma de suas funções a de neurotransmissão⁶. Neste caso, após ser liberado e exercer função sobre receptores específicos, é rapidamente hidrolisado por uma cadeia de ectonucleotidases⁷ e seus produtos de hidrólise (ADP, AMP e adenosina) podem influenciar a excitabilidade neuronal quando interagem com receptores específicos⁸.

1.2 NTPDases e 5' Nucleotidase

Nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por um grande número de enzimas, localizadas na superfície celular ou solúveis no meio intersticial ou em fluidos corporais⁹. São oriundos da lise celular, exocitose ou efluxo de transporte por canais de proteínas¹⁰. Nos últimos anos, tem sido mostrado que alguns membros da família das Ectonucleotidases podem contribuir para a hidrólise extracelular de nucleotídeos. Muitos progressos tem ocorrido para caracterização de uma família de enzimas responsáveis pela degradação de nucleotídeos extracelulares, conhecida como família da E-NTPDases. Em mamíferos, seis membros dessa família foram clonados e funcionalmente caracterizados⁹ (figura 1). Hoje já estão descritas na literatura também as NTPDases 7 e 8^{11,12}. Esta família de genes também se expressa em invertebrados, plantas, leveduras e protozoários^{13,14,15}.

O papel dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e de seu derivado nucleosídeo adenosina, embora com efeitos opostos, está bem estabelecido. O ATP é vasoconstritor e pode ser citotóxico, enquanto o ADP pode causar agregação plaquetária. Já a adenosina, produzida pela degradação dos nucleotídeos (por uma cascata de ecto-enzimas) é vasodilatadora e inibe a agregação plaquetária. É sabido, também, que proteção à isquemia cardíaca ou episódios de hipóxia podem ocorrer em presença de adenosina endógena ou

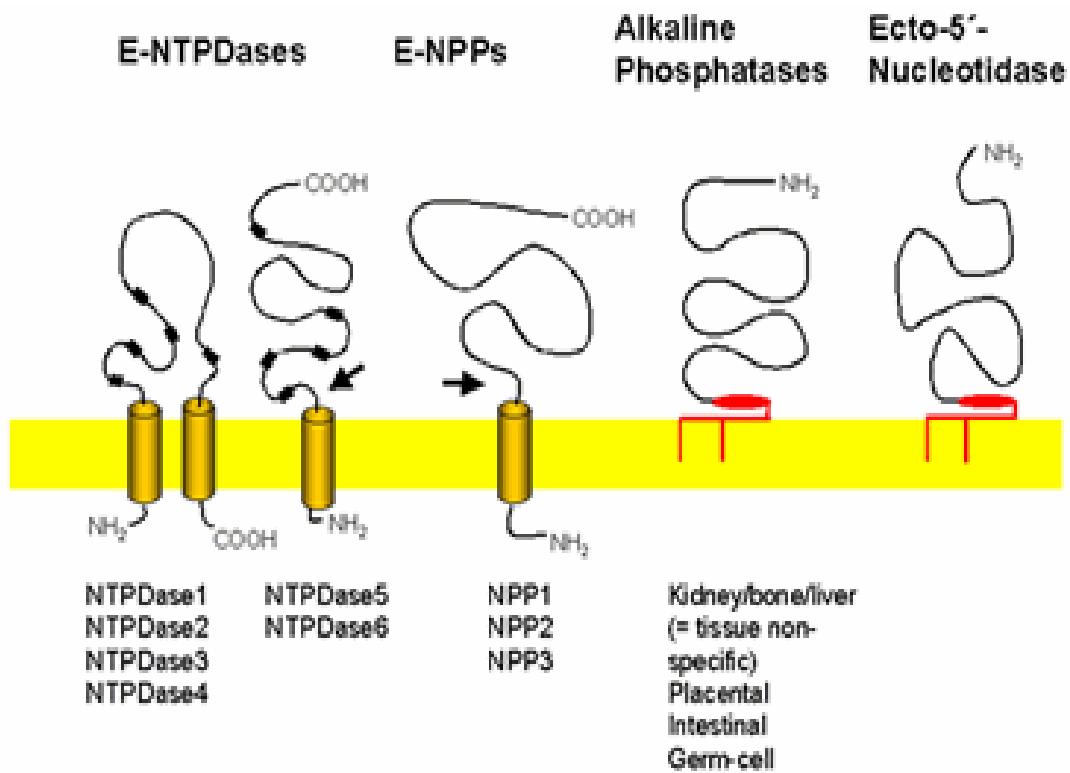


FIGURA 1. Proposta da topografia das ectonucleotidases de membrana. As NTPDases de 1 a 4 são ligadas à membrana plasmática por dois domínios transmembrana, N-terminal e C – terminal, NTPDases 5 e 6 não possuem o domínio transmembrana C – terminal e podem ser clivados próximo ao domínio N – terminal (seta) para formar uma proteína solúvel então liberada. As NTPDases 4 a 6 são localizadas intracelularmente. Os pontos escuros na seqüência das NTPDases 1 a 6 representam as regiões conservadas das apirases (ACR). Todas ectonucleotidases representadas são glicoproteínas. (Adaptado de Zimmermann, 2001)

exógena ^{16,17}. Por este motivo, a hidrólise extracelular de nucleotídeos produzindo adenosina, é considerado um evento de grande importância¹⁶.

Outra ectonucleotidase de grande importância é a 5'-nucleotidase, uma enzima que pode aparecer tanto na forma solúvel, quanto fixa em membranas, e é amplamente distribuída nos tecidos. Pode apresentar diferentes funções dependendo da célula ou do tecido no qual está expressa. Possui um importante papel na formação de adenosina, a partir do AMP extracelular, e na consequente ativação dos receptores P1⁹.

ATP, bem como outros nucleotídeos agonistas dos receptores P2, podem ser degradados rapidamente pelas ectonucleotidases¹⁸, que atuam via família dos receptores P2, os quais aparecem amplamente distribuídos no organismo¹⁹.

A cascata das ectonucleotidases tem um papel importante na manutenção do ATP extracelular e da adenosina dentro dos níveis fisiológicos ^{18,19}. Do grupo das ectonucleotidases fazem parte as NTPDases (EC 3.6.1.5, ATP difosfohidrolases, NTPDase 1, apirase, CD39), que hidrolisam ATP e ADP em razões de velocidade entre 1 e 3; ecto-ATPases (EC 3.6.1.3, NTPDase2, CD39L1) que hidrolisam em torno de 30 vezes mais o ATP em relação ao ADP; e a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, em superfície de linfócitos, CD73)^{9,20}. O papel fisiológico desta cascata de enzimas, é que regula a formação de nucleotídeos ou nucleosídeos. Além disso, a apirase pode inibir a agregação plaquetária promovendo a hidrólise do ADP bem como controlar o tônus vascular em combinação com a 5'-nucleotidase, que hidrolisa AMP à adenosina, a qual na circulação tem ação vasodilatadora^{18,20}. Sabe-se também que a adenosina promove o estímulo da angiogênese, citoproteção e imunossupressão²¹, além de

ser um neuromodulador endógeno promovendo neuroproteção. Muitos estudos tem sugerido que a adenosina estaria envolvida em desordens cerebrais, como epilepsia, doença de Parkinson e depressão²². Nucleotídeos extracelulares também sinalizam respostas imunes, o tônus muscular, funções cardíacas, contração de músculo liso e apoptose¹⁰.

Desta forma, a ação da cadeia enzimática (NTPDase junto com a 5' nucleotidase) tem uma importância fundamental, pois pode regular a concentração de ATP, ADP, AMP e adenosina, aumentando ou diminuindo a hidrólise dos nucleotídeos²³.

1.3 Flavonóides

Flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem vegetal. Pertencem ao grande grupo dos compostos fenólicos presentes nos vegetais na forma livre ou ligados à açúcares (glicosídeos) e proteínas²⁴. Sua estrutura básica é formada por C6-C3-C6 (Fig. 2), sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Estão entre os mais importantes polifenóis e subdividem-se em flavonas/flavanonas, antocianinas, catequinas/flavonóides e fitoestrógenos. Flavonóides, assim como os ácidos fenólicos e os polifenóis (conhecidos como taninos), fazem parte dos compostos fenólicos de nossa dieta²⁵. Os taninos são compostes de elevado peso molecular, que reagem com proteínas presentes na boca, dando a sensação de adstringência ao paladar. De acordo com sua estrutura química os taninos se dividem em dois grupos: os condensados e os hidrolizáveis²⁵. Estes compostos podem apresentar alguns efeitos adversos como

diminuição da atividade de enzimas digestivas, da disponibilidade de proteínas e aminoácidos, entre outros efeitos tóxicos²⁶.

Os Flavonóides podem reduzir a incidência de doenças cardiovasculares, câncer e os níveis de colesterol (LDL). Ainda estimulam enzimas protetoras, podendo prevenir úlceras e câncer. Encontramos flavonóides na cebola, chá preto, maçã, uva, entre outros. São encontrados principalmente nas camadas externas das plantas e vegetais. Quando ligados aos açúcares, tendem a ser estáveis durante a cocção dos alimentos. Contudo, significantes perdas físicas ocorrem se a camada externa de frutas, como maçãs e pêras, for removida antes do consumo ou durante o processo industrial. A remoção da casca antes da ingestão da maçã, reduz a quantidade de flavonóides a praticamente zero. Esta é a razão pela qual o conteúdo de polifenóis no vinho tinto é muito menor do que nas uvas, das quais é produzido²⁴.

Flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular sendo considerados metabólitos vegetais secundários presentes em frutas e vegetais. Atualmente já foram identificados mais de 6.400 substâncias químicas diferentes estruturalmente, pertencentes ao grupo dos flavonóides. Estes compostos possuem uma série de propriedades que os fazem atuar sobre sistemas biológicos de forma benéfica para a saúde humana²⁷. Estudos *in vitro* sugerem que os flavonóides são passíveis de inibir ou, muitas vezes, induzir uma grande variedade de sistemas de enzimas em mamíferos. Possuem atividade antiinflamatória e propriedades antioxidantes tais como ação inibitória de enzimas. É importante

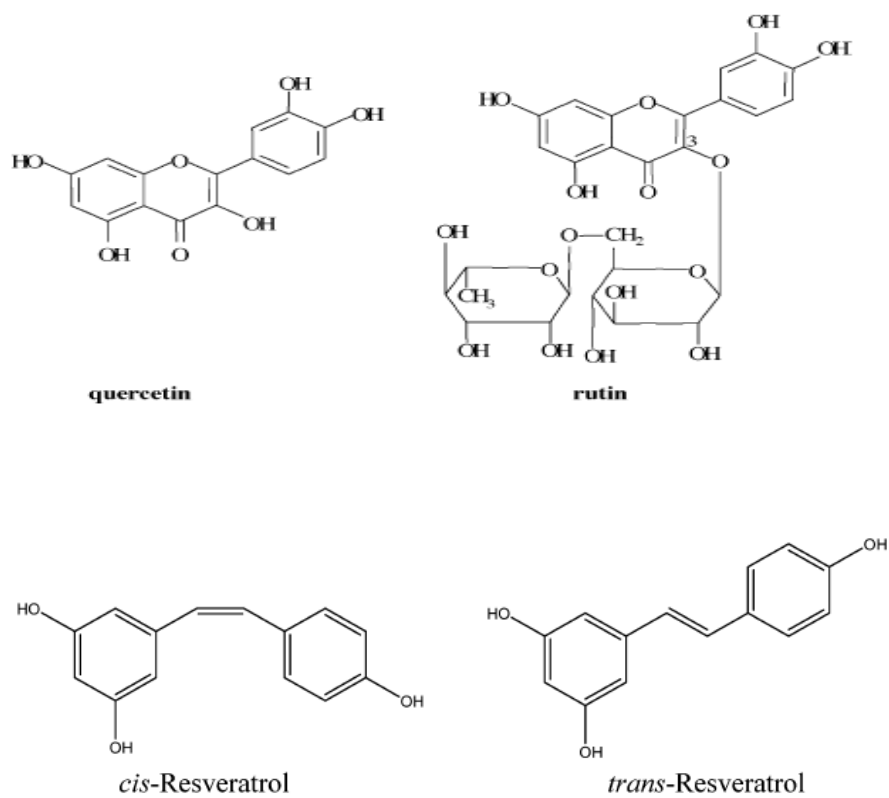


Fig. 2 – Estruturas químicas dos Flavonóides estudados

ressaltar a excelente capacidade dos flavonóides de quelar metais como o ferro e sua atuação como captadores e neutralizadores de espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que a presença destes tem sido relacionada a certas doenças como: câncer, doenças auto-imunes e doença de Parkinson²⁸.

No entanto, alguns flavonóides, além das propriedades benéficas, podem apresentar ação mutagênica. Como exemplo pode ser citada a Quercitina, que além da ação anti-inflamatória, anti-bacteriana, anti-viral e anti-hepatotóxica, exibe também atividade mutagênica e propriedades alergênicas²⁶.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo regular de frutas e vegetais pode conferir um efeito protetor com redução de 50% do risco para câncer digestivo e das vias respiratórias^{29,30}.

A bio-transformação dos flavonóides ocorre em dois pontos distintos no fígado, nos quais as enzimas de biotransformação atuam sobre os flavonóides, e também no cólon, que representa uma zona metabolicamente inativa, na qual os microorganismos degradam os flavonóides que até então não foram absorvidos. O metabolismo dos flavonóides é intenso e uma quantidade significativa é excretada pela urina após a degradação dos mesmos³¹.

1.4 Compostos bioativos

A partir da década de 1960, evidências sugeriram que diferentes hábitos alimentares e a falta de atividade física, poderiam estar relacionadas com doenças cardiovasculares e neoplasias. Atualmente, sabe-se que o estilo de vida pode funcionar como um modulador para os processos degenerativos, acelerando ou desacelerando o mesmo³². Como a nutrição é de grande relevância para os seres

vivos, estudos realizados mostram que o equilíbrio nutricional é fundamental, para a manutenção e a qualidade de vida. Assim, estados de desnutrição ou supernutrição são considerados fatores de risco para a saúde de qualquer organismo³².

Um dos mais importantes caminhos para a redução dos riscos de doenças crônicas seria o consumo diário de cinco a nove porções diferentes de frutas e verduras³³, isto porque, os alimentos de origem vegetal contêm, além de vitaminas, sais minerais e fibras, os compostos bioativos que são representados pelo grande grupo dos fitoquímicos e seus sub-grupos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e polifenóis. Os compostos bioativos estão presentes nos denominados alimentos funcionais, cuja principal característica é o potencial efeito antioxidante natural^{34,35}.

Em 1992, Renaud e De Lorgeril³⁶ realizaram um dos trabalhos mais famosos nesta área, demonstrando que havia uma menor incidência de doenças cardiovasculares na França em relação a outros países industrializados, apesar dos fatores de risco cardiovasculares como consumo de gordura saturada, nível de colesterol sérico, pressão arterial, índice de massa corporal, tabagismo e sedentarismo não serem menores. Esse fato foi denominado pelos autores como "Paradoxo Francês". As investigações apontaram que o alimento que conferia a proteção descrita seria o vinho tinto, cujos principais compostos bioativos existentes eram o resveratrol, a quercitina, a rutina, a mirecitina e os taninos. Os autores então, sugeriram que os mesmos eram os protagonistas desse paradoxo. O alimento passou a ser visto como algo benéfico em termos de saúde e não somente como meio de sobrevivência, pois com o avanço das pesquisas sobre a

identificação dos compostos bioativos foi possível identificar fatores de proteção à saúde e não somente os benefícios dos nutrientes classicamente definidos³⁶.

Desta forma, os alimentos funcionais poderiam ser considerados como uma ferramenta alternativa ou um coadjuvante na prevenção, tratamento e melhora dos sintomas de doenças e disfunções associadas ao envelhecimento como a menopausa, osteoporose, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares³⁵. O resveratrol é considerado o responsável pela diminuição nas taxas de doenças crônicas degenerativas. Essa molécula tem a habilidade de agir como um antioxidante, um inibidor de agregação plaquetária, um anticarcinogênico, além de possuir ação estrogênica³⁶.

Segundo a Associação Brasileira de Cardiologia, que reconhece desde 1998 do papel dos flavonóides como potenciais antioxidantes naturais, está estabelecido que esta potente atividade antioxidante se deve aos radicais fenólicos presentes. Os flavonóides fazem parte de diversos alimentos de origem vegetal e possuem ação antioxidante³⁷.

1.5 Compostos antioxidantes

A vida não poderia existir sem a presença do oxigênio, que é a base para a evolução de organismos que incluem desde muitos procariotos primitivos até plantas e animais neste planeta. Sem ele não poderíamos aproveitar a energia da nossa alimentação e, sem energia, o corpo, principalmente de espécies complexas (multicelulares), não poderia sobreviver. Além do papel fundamental para a vida dos organismos, o oxigênio atua em espécies mais complexas, como é o caso do ser humano, em funções metabólicas específicas³⁸. Devido ao fato do

oxigênio ser quimicamente um elemento muito reativo, o mesmo pode ser altamente prejudicial se não for regulado, produzindo muitas moléculas oxidadas dentro do corpo e provocando assim a destruição de células e tecidos. Se não há mecanismo de controle para isto, uma reação em cadeia pode ocorrer, onde as moléculas oxidadas chamadas de radicais livres, se tornam instáveis. Para regular o poderoso efeito oxidante dos radicais livres, o organismo conta com duas fontes de compostos (endógenos e exógenos) que reagem com tais moléculas, e são denominadas de substâncias antioxidantes. Na forma endógena tais substâncias são conhecidas como enzimas anti-oxidantes, como é o caso da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT) e da glutathione-peroxidase (GSH-Px). As fontes exógenas incluem compostos nutritivos ou não-nutritivos como é o caso de vitaminas e compostos bioativos como os flavonóides^{39,40}.

Estudos envolvendo evidências científicas em torno do estresse ou dano oxidativo comprovam uma forte associação com o envelhecimento. O provável mecanismo de associação seria através da produção de radicais livres (RL), entre eles em especial as espécies reativas de oxigênio (ERO)⁴¹.

Conceitualmente, radicais livres são definidos como um átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron desemparelhado ocupando o orbital mais externo, o que os torna extremamente reativos. Esta definição inclui íons de metais de transição, o átomo de hidrogênio, o óxido nítrico e o dióxido de nitrogênio⁴¹. Um composto transforma-se em radical livre de três formas básicas: ganhando um elétron; perdendo um elétron ou sofrendo fissão homolítica de ligação covalente⁴².

No organismo, os radicais livres são reconhecidos como substâncias tóxicas sendo altamente reativos e instáveis, capazes de grandes alterações químicas em um espaço de tempo curto⁴³.

Para minimizar os efeitos tóxicos dos radicais livres formados é necessário um adequado equilíbrio entre as substâncias pro-oxidantes e as antioxidantes. Assim, tem-se observado que os animais possuem formas especialmente eficientes de SOD, CAT, GSH-Px e outras enzimas antioxidantes e detoxificantes⁴⁴.

Conceitualmente, os antioxidantes não enzimáticos são moléculas de carga positiva que se combinam com os radicais livres de carga negativa, tornando-os inofensivos, ou seja, essas substâncias teriam a capacidade de anular a ação de oxidação dos radicais. São substâncias que retardam ou previnem danos, deterioração ou destruição causados pela oxidação de biomoléculas e membranas pelos RL⁴⁴.

Sendo assim, em condições normais existe um equilíbrio entre a formação de radicais livres e sua neutralização por sistemas de defesa antioxidantes. As moléculas e células lesadas podem ser reparadas, mas quando o somatório de danos é muito grande, as células muitas vezes acabam morrendo por necrose ou apoptose. A apoptose é um processo altamente regulado e extremamente relevante para a remoção de células desnecessárias, danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas. Assim, estas células que foram afetadas pelo dano oxidativo e que poderiam se tornar carcinogênicas seriam eliminadas através da apoptose. Entretanto, se houver um desequilíbrio nesse mecanismo de apoptose e ocorrer a exposição a um estresse oxidativo acentuado, poderia ser

desencadeado um processo de apoptose de muitas células levando com isso ao aparecimento de algumas doenças crônico-degenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson⁴⁵.

Desde épocas antigas, por volta de 430 a.c., o princípio, exposto por Hipócrates, “Permita que o alimento seja teu medicamento e que o medicamento seja teu alimento”, tem norteado os estudos da comunidade científica, principalmente de profissionais da saúde envolvidos na prevenção e tratamento de doenças⁴⁶.

O aparecimento de doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão, diabetes e obesidade no mundo atual, provavelmente ocorrem como resultado do avanço da industrialização em países desenvolvidos. Isto pode ser mostrado pelas tendências desfavoráveis do excessivo consumo de gorduras, sal, açúcar e ainda, diminuição considerável no consumo de legumes, fibras dietéticas, frutas e vegetais. Os compostos bioativos entram com a proposta de melhorar os mecanismos de defesa biológica, prevenir doenças específicas, controlar condições físicas e mentais e ainda, retardar o processo de envelhecimento⁴⁷.

Componentes bioativos podem ser oriundos de fontes vegetais ou animais, apresentando diferentes efeitos em nosso organismo e/ou ocorrendo sob diferentes formas de apresentação. São conhecidos por suas propriedades antioxidantes associadas com os efeitos de promoção de saúde; porém os estudos são recentes, não existindo recomendações oficiais de quanto deve ser consumido para se obter os efeitos benéficos em relação a certos tipos de doenças⁴⁸.

2 - Objetivos

O objetivo inicial do trabalho, foi verificar se os flavonóides Resveratrol, Quercitina e Rutina, escolhidos previamente, possuíam alguma ação *in vitro*, sobre a hidrólise dos nucleotídeos da adenina em soro de ratos adultos.

Após este primeiro passo, optamos por tratar ratos adultos com suco de uva, que como se sabe pela literatura, possui alguns polifenóis, entre eles o Resveratrol, já que este foi o Flavonóide que apresentou ativação da hidrólise dos nucleotídeos *in vitro*. O suco de uva foi substituto da água para um grupo de animais em teste.

O terceiro e último objetivo do trabalho foi avaliar se o tratamento com suco de uva poderia reverter o decréscimo na hidrólise dos nucleotídeos em soro de ratos, causado por tratamento agudo com arginina (resultado obtido anteriormente em nosso laboratório).

Parte II

3 - Artigo científico

**Effects of resveratrol and purple grape juice on nucleotide hydrolysis by
serum of adult rats.**

Submetido à revista Food Chemistry

Effects of resveratrol and purple grape juice on nucleotide hydrolysis by adult rat serum.

Ana Paula Spier¹, Caren Serra Bavaresco¹, Ângela T. S. Wyse¹, Denise Carvalho², João José Freitas Sarkis^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Ciências Morfológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre-RS.

* Address correspondence to:

Dr. João José de Freitas Sarkis

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Bioquímica, ICBS

Rua Ramiro Barcellos, 2600-ANEXO

CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone number: +55 (51) 33165554

Fax number: +55 (51) 33165540

e-mail address: jj Sarkis@plugin.com.br

Key words: NTPDase, ATP diphosphohydrolase, flavonoids, resveratrol, quercetin, nucleotides, arginine.

Abstract

Background and methods: In the present study, we evaluate ATP, ADP and AMP (adenosine tri, bi and mono-phosphate, respectively) hydrolysis in rat serum, in vitro, in the presence of the flavonoids: resveratrol, quercetin and rutin. We also observed the effects of resveratrol, administered in purple grape juice form, on serum nucleotide hydrolysis and the effect of resveratrol, administered as purple grape juice before arginine treatment, on serum nucleotide hydrolysis. **Results:** The in vitro nucleotide hydrolysis by rat serum, in the presence of resveratrol, was increased for ATP (approximately 40%) and ADP (approximately 60%). In the presence of other flavonoids tested in vitro, nucleotide hydrolysis decreased. The effects of treatment with purple grape juice for five, ten and fifteen days on nucleotide hydrolysis by rat serum was also evaluated. After fifteen days of treatment, nucleotide hydrolysis was increased for ATP, ADP and AMP. The recuperation of nucleotide hydrolysis activities in animals injected with arginine, after receiving purple grape juice for fifteen days, was also investigated. **Conclusion:** We conclude that resveratrol may increase nucleotide hydrolysis by serum and that purple grape juice may be capable of preventing the decrease in nucleotide hydrolysis caused by arginine treatment.

Introduction

Many studies suggest that flavonoids, a family of compounds with a C₆-C₃-C₆ skeleton structure, exhibit several biological activities, including anti-allergic, antiviral, anti-tumor and anti-inflammatory actions, as well as antioxidant activity; these activities depend mainly on the number and position of hydroxyl groups within the flavonoid structure [1]. Epidemiologic evidence suggests that daily moderate wine consumption, mainly red wine, is associated with a lower incidence of cardiovascular disease, since wine has a high phenolic compound content [1,2]. More than 4000 phenolic phytochemicals have been identified [3]. The levels of phenolic compounds in wines and grape juice, mainly resveratrol and quercetin [4], are highly variable according to grape varieties, area of cultivation, and vinification methods and many differences exist between red and white wines and aged versus young wines [5]. Biological mechanisms proposed for red wine-derived phenolic compounds include estrogenic activity, antioxidant/antiradical activity, inhibition of platelet aggregation, modulation of lipid metabolism, inhibition of low-density lipoprotein oxidation, and proliferation of smooth muscle cells [5-10]. In addition, wine polyphenols exhibit vasorelaxation effects, mainly through NO-dependent mechanisms [5,11].

Biochemical studies have established that adenine nucleotides are thought to be an important potential source of extra cellular adenosine. Once released, these adenine nucleotides are metabolized and rapidly converted to adenosine through the action of an ecto [12,13] or soluble enzymes, such as the enzyme recently described in serum obtained from rats [14]. ATP diphosphohydrolases (NTPDase1, CD39, apyrase, EC 3.6.1.5) are enzymes that hydrolyze ATP and

ADP almost equally well. The physiological role proposed for this enzyme, together with 5'-nucleotidase (EC3.1.3.5), in the circulation is the modulation of the nucleotides/nucleosides ratio. Furthermore, apyrase may inhibit platelet aggregation, promoting ADP hydrolysis, and also control the vascular tone in combination with 5'-nucleotidase, which hydrolyzes adenosine monophosphate (AMP) to adenosine (a vasodilator in the circulation [15-19]). The roles of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) and their nucleoside derivate, adenosine, as compounds with opposing effects are well established. ATP is vasoconstrictor and may be cytotoxic, while ADP causes platelet aggregation. In contrast, adenosine produced by nucleotide degradation is a vasodilator, inhibits platelet aggregation and presents neuro-modulator effects [14]. The action of this "enzyme chain" (NTPDase plus 5'-nucleotidase) may regulate the concentrations of ATP, ADP and AMP by increasing/decreasing their hydrolysis with a consequent increase/decrease in adenosine levels, a natural protective metabolite [17,20,21].

Thus, the purpose of this study was to evaluate; firstly, the in vitro effects of the flavonoids resveratrol, quercetin and rutin on rat serum nucleotide hydrolysis; secondly to evaluate the in vivo effects of purple grape juice (PGJ) and, finally, to look at the effects, in vivo, of PGJ on a group of rats subjected to a classical model of argininemia [20].

Materials and methods

Animals and reagents

Nucleotides, flavonoids and arginine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). PGJ was obtained from Suvalan (Tecnovin-Bento

Gonçalves, RS, Brazil). All other reagents were of analytical grade. Male Wistar rats, weighing about 250 grams, from our own breeding stock, were maintained on a 12 h light/ 12 h dark cycle at a constant room temperature.

Isolation of blood serum fraction

Blood was drawn after the decapitation of male Wistar rats. Blood samples were centrifuged in plastic tubes for 10 min at 5000 x g at 20 °C, and the serum obtained was kept on ice [22]. Serum was used immediately in experiments.

Treatment with PGJ

The rats were divided into two groups. The control group (n=9) had free access to food (standard lab rat chow) and water. The treated group (n=9) had free access to food, but only received PGJ (free access) to drink. The manufactured PGJ was diluted with water (1:2). Each animal, in the two groups, was maintained in an individual cage during all days of treatment. The volume of liquid consumed by each animal was recorded daily. Three animals from each group (n=6) were sacrificed after five days of treatment, three animals from each group (n=6) were sacrificed after ten days of treatment and the last three animals from each group (n=6) were sacrificed after fifteen days of treatment. Blood samples were collected at the time of sacrifice.

Treatment with PGJ following arginine treatment

The rats were divided into two groups. The control group (n=8) had free access to food (standard lab rat chow) and water, and the treated group (n=8) had free access to food, but only received PGJ (free access) to drink. The treatment with PGJ was the same as described previously. After fifteen days of treatment,

each group of eight animals was divided into two groups (each one with 4 rats), thus four groups were created in total. One group of four animals that drunk only water, and another group of four animals that drunk only PGJ, received a triple administration of saline (0.85 % NaCL), with intervals of one hour between each injection. The other four animals from each group (water or PGJ), received a triple administration of arginine (0.8g/Kg), with intervals of one hour between each injection. All the animals were sacrificed 1 h after the last injection. Blood samples were collected at the time of sacrifice.

Measurement of ATP, ADP and AMP hydrolysis.

ATP, ADP and AMP hydrolysis were determined using a method described by Oses et al [14]. The reaction mixture containing ATP, ADP or AMP as a substrate, in 112.5 mM Tris-HCL, pH 8.0, was incubated with 0.5 to 0.7 mg of serum protein at 37°C for 40 minutes in a final volume of 0.2 ml. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml 10% TCA. The amount of Pi liberated was measured by the method of Chan et al [23]. Incubation times and protein concentration were chosen to ensure the linearity of the reaction (results not shown). In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were centrifuged at 5000 g for 5 minutes to eliminate protein and the supernatant was used for the colorimetric assay. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were generally expressed as nanomoles of Pi released per min per milligram of protein.

Experiments performed in vitro

To evaluate the effect of flavonoids on serum nucleotide hydrolysis, the in vitro experiments were performed using different concentrations of flavonoids (in the range of 50 nM-500 nM) diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) in the presence of ATP, ADP and AMP as substrate in the incubation medium as described above. The final concentrations of DMSO, when tested alone in the incubation medium, did not affect the enzyme activity. All the other procedures for enzymatic assays were the same as described above.

Protein determination

Protein was determined by the Coomassie Blue method, according to Bradford [24] using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

The data obtained are expressed as mean \pm S.D. of at least four animals. The results were analyzed statistically by Student's t-test. A P value of less than 0.05 was considered to represent a significant difference.

Ethics

The study was performed in accordance with the University Ethics Committee guidelines for experiments with animals.

Results

In vitro effect of resveratrol on ATP and ADP hydrolysis by adult rat serum

In experiments using serum from adult rats, ATP hydrolysis was activated in vitro by resveratrol, at final concentrations of 50, 100 and 200 nM ($p < 0.05$), when

compared to control enzyme activity. The final concentration of 300 and 500 nM, did not have any effect on hydrolysis of ATP (Fig. 1A). Hydrolysis of ADP, in the same type of experiment, presented a similar profile when compared to ATP (Fig. 1B), although when ADP was used as substrate, an activation effect was observed also with 300 nM of resveratrol. In the range of 50 to 300 nM, resveratrol had an activation effect ($p < 0.05$), when compared to control enzyme activity (Fig. 1B). When AMP was used as a substrate for 5'-nucleotidase activity, under the same conditions, resveratrol at various concentrations had no effect on hydrolysis, when compared to control enzyme activity (data not shown).

In effect of quercetin and rutin on ATP, ADP and AMP hydrolysis by adult rat

serum

ATP and AMP hydrolysis, in serum, were efficiently inhibited by quercetin at all tested concentrations (50 to 500 nM) ($p < 0.05$), when compared to control enzyme activity. ADP hydrolysis was inhibited only at 300 and 500 nM, ($p < 0.05$) when compared to control enzyme activity (data not shown).

Another flavonoid tested, rutin, inhibited hydrolysis of ATP by rat serum at the concentrations of 300nM and 500 nM ($p < 0.05$), when compared with control enzyme activity, but did not have any effect in the range 50 to 200 nM (data not shown). ADP and AMP hydrolysis in serum were inhibited by rutin only at 500 nM ($p < 0.05$), while no effect was seen at any other concentration, when compared with control enzyme activity (data not shown).

It is important to note that controls were performed to correct for vehicle (DMSO) interference and no differences between vehicle and control enzyme activity were observed (data not shown).

Effect of treatment with PGJ on ATP, ADP and AMP hydrolysis by adult rat serum

In experiments using serum obtained from rats subjected to a treatment with PGJ, we evaluated the effect of the juice on ATP, ADP and AMP hydrolysis (Fig. 2). The rats were killed at different times after the beginning of the administration. After five and ten days of treatment, we did not observe any change in nucleotide hydrolysis. In contrast, after fifteen days of treatment, a significant increase was observed in the rate of hydrolysis by rat serum for the three nucleotides, demonstrating a clear effect of PGJ on the enzymatic chain able to promote the hydrolysis of ATP to adenosine.

Arginine treatment, and the protective effect of PGJ

Previous data from our laboratory [20] demonstrate that argininemia, in vivo, promotes an inhibition of nucleotide hydrolysis by rat blood serum. As such, we evaluated whether the effect of the treatment with arginine could be reversed by the administration of PGJ. ATP, ADP and AMP hydrolysis by serum of rats was inhibited in animals that received water to drink for fifteen days before receiving injections of arginine (Group II) when compared to the control group (Group I) that received water to drink for fifteen days before receiving injections of saline (Fig 3). These results agree with previous results obtained by us in another study [20]. The effect of the PGJ may be observed when comparing rats that received PGJ plus saline (Group III) and rats that received PGJ plus arginine (Group IV) with the

Group II (water plus arginine). The juice was able to reverse and prevent the inhibitory effect of arginine. The juice administration activated the hydrolysis of the three nucleotides when comparing Groups III and IV to the control (Group I). These results agree with the results obtained with resveratrol in vitro (Fig. 1) and with the administration of PGJ in vivo (Fig. 2). The physiological significance of these results will be discussed.

Discussion

Circulating nucleotides are known to be important signaling molecules, potentiating a variety of physiological responses. The role of adenine nucleotides (ATP, ADP) and their derivative nucleoside, adenosine, as compounds with opposite effects is well established [20], and the importance of adenosine as a coronary artery vasodilator is also well established [25].

Nitric oxide (NO) appears to have a number of important physiological roles under normal conditions, including neurotransmitter release, gene expression, pain perception, synaptic plasticity and learning [20]. Several studies have suggested that consumption of red wine in moderation is associated with a reduction in the risk of coronary heart disease and cancer [26-31]. PGJ, which is available to a broader range of the population, may also have similar beneficial health effects to those of wine [4]. Although many studies have implicated the roles of resveratrol and quercetin (flavonoids present in PGJ) in cardiac disease prevention, their biological effects in vivo and details about the mechanism of their action are unclear [4,6]. A previous study also confirmed that polyphenols present in wine can induce a NO-dependent relaxation in isolated rat aortic rings and that extracellular

ATP and P2Y purinoceptors could be involved in this relaxing effect. The vasorelaxation induced by wine polyphenols is now well documented; polyphenolic compounds, obtained from wine extract, demonstrate a relatively great relaxation that is probably mediated by NO release [11].

It should be noted that adenosine, produced from ATP by an enzymatic cascade (NTPDase plus 5'-nucleotidase) by rat serum [17,20], is an important structure capable of promoting vaso-dilatation and, as such, is considered to be a neuro and a cardio-protector. In this study, we evaluated the ability of flavonoids to interfere with/modulate the nucleotide hydrolysis by the serum fraction obtained from rats. This study was performed in vitro and in vivo, using flavonoids such as and PGJ.

The first flavonoid tested in vitro was resveratrol, which augmented the hydrolysis of ATP and ADP by rat serum in vitro, while 5'-nucleotidase was not affected. We may postulate that this flavonoid may promote alter the activity of this enzyme, in turn, increasing the production of adenosine from ATP in the circulation, in vivo.

Quercetin and rutin (the latter being present as a glycoside derivative [32]), exhibited contrasting effects, in vitro, when compared to resveratrol. A previous study demonstrated that Rutin may have similar effects to quercetin, but is less active, possibly due to its lower bioavailability in growing cells [32]. In our study, the effects of these compounds were very similar. A previous study speculated if resveratrol and quercetin could inhibit the signal transduction of thrombin, concluding that there is no known specific receptor for these two polyphenols [25].

On the basis of our results demonstrating that quercetin and rutin inhibit NTPDase and 5'-nucleotidase, and that resveratrol activates NTPDase, *in vitro*, we speculate that these flavonoids act via different mechanisms on the enzymes. We then evaluated the possible effects of the administration of PGJ (containing flavonoids) to a group of animals in the place of water, compared to a group of animals receiving only water to drink. After fifteen days, an activation of the NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat serum was observed in the animals that drank PGJ. Although quercetin and resveratrol are present in PGJ, the effects of resveratrol on the enzyme seem to be more efficient than those of quercetin (see the *in vitro* effects of resveratrol, Fig. 1). As such, an increased consumption of PGJ may lead to increases in the levels of adenosine, reasserting theories that the daily consumption of fruits and vegetables, or derived products containing resveratrol, may reduce the risks for a number of diseases. In addition to increases in adenosine levels that may promote vaso-dilatation, increasing nucleotide hydrolysis may also inhibit increases in ADP levels in the circulation, in turn, avoiding a pro- thrombotic condition.

After obtained a satisfactory result following the administration of PGJ in the animals, and taking into account previous results [20] from our laboratory demonstrating that a model of hyperargininemia promotes a decrease in ATP, ADP and AMP hydrolysis by rat serum (effect that can be deleterious), we also tested the effects of the treatment with PGJ before the arginine treatment, since arginine inhibits nucleotide hydrolysis in rat serum, probably via nitric oxide (NO) formation [20]. We used, based on previous results, fifteen days of treatment with PGJ before initiating treatment with arginina. Our data demonstrate that PGJ appears to revert

and prevent the inhibition of nucleotide hydrolysis induced by hyperargininemia. A number of studies suggest that the polyphenols may inhibit free radical production; in particular one report suggests that resveratrol treatment reduces reactive oxygen species production [33], providing evidence that flavonoids may inhibit NO generation and, consequently, decrease the effect of arginine on nucleotide hydrolysis and that this effect may ameliorate or decrease the deleterious pathophysiological characteristics of hyperargininemic patients.

Of particular interest is the finding that an improvement in vascular function may be obtained without alcohol [34]. This topic is very important from the clinical view for patients with risk of cardiovascular events, for whom even moderate alcohol intake is not advisable.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil).

References

- [1] Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 2928-2935.
- [2] Auger C, Gerain P, Bichon FL, et al. Phenolic from Commercialized Grape Extracts Prevent Early Atherosclerotic Lesions in Hamsters by Mechanisms Others than Antioxidant Effect. *Jour Agric Food Chem* 2004; 52:5297-5302.
- [3] King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jour Am Diet Assoc.* 1999; 99:213-218.
- [4] Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and Plasma Levels of Resveratrol and Quercetin in Humans, Mice, and Rats after Ingestion of Pure Compounds and Grape Juice. *Jour Agric Food Chem.* 2004; 52:935-942.
- [5] Dell'Agli M, Galli GV, Vrhovsek U, Mattivi F, Bosisio E. In vitro Inhibition of Human cGMP-Specific Phosphodiesterase-5 by Polyphenols from Red Grapes. *Jour Agric Food Chem.* 2005; 53:1960-1965.
- [6] Lotito SB, Frei B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radicals Biology and Medicine* 2004; 37:251-258.
- [7] Dillard CJ, German B. Review Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Jour Sci Food Agric.* 2000; 80:1744-1756.
- [8] Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996; 312:478-481.

- [9] Lotito SB, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radicals Biology and Medicine* 2004; 36:201-211.
- [10] Greene GW, Yensan NF, Padula C, Rossi S, Rossi JS, Clark PG. Differences in Psychosocial Variables by Stage of Change for Fruits and Vegetables in Older Adults. *Jour Am Diet Assoc.* 2004; 104:1236-1243.
- [11] Mendes A, Desgrange C, Che'zec C, Vercauteren J, Freslon JL. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2003; 17:673-681.
- [12] Bruno AN, Oses JP, Bonan CD, Walz R, Battastini AMO, Sarkis JJF. Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of Pentylene-tetrazol. *Neuroscience Research* 2002; 43:283-288.
- [13] Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on Nomenclature. *Drug Development Research* 2001; 52:44-56.
- [14] Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, et al. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Science* 2004; 74:3275-3284.
- [15] Fontella FU, Bruno AN, Balk RS, et al. Repeated stress effects on nociception and on ectonucleotidase activities in spinal cord synaptosomes of female rats. *Psychology and Behavior* 2005; 85:213-219.
- [16] Furstenau CR, Spier AP, Rucker B, Berti SL, Battastini AMO, Sarkis JJF. The effects of Ebselem on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. *Chemico-Biological Interactions* 2004; 148:93-99.

- [17] Bruno AN, Bonan CD, Wolfchuk ST, Sarkis JJF, Battastini AMO. ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. *Life Science* 2002; 71:215-225.
- [18] Pochmann D, Rucker B, Battastini AMO, Sarkis JJF. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Thrombosis Research* 2004; 114: 275-281.
- [19] Nedeljkovic N, Banjac A, Horvat A, Stojiljkovic M, Nikezic G. Developmental profile of NTPDase activity in synaptic plasma membranes isolated from rat cerebral cortex. *Int. J. Devl Neuroscience* 2005; 23:45-51.
- [20] Delwing D, Gonçalves MCF, Sarkis JJF, Wyse ATS. L-Name administration prevents the inhibition of nucleotide hydrolysis by rat blood serum subject to hyperargininemia. *Amino Acids* 2005; In press.
- [21] Langfort J, Czarnowski D, Pillis W, Wojcik B, Gorski J. Effect of Various Types of Exercise Training on 5'-Nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities in Rat Heart: Influence of a Single Bout of Endurance Exercise. *Biochemical and Molecular Medicine* 1996; 59:28-32.
- [22] Yegutkin GG. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry* 1997; 62:724-728.
- [23] Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 1986; 157:375-380.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-bye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

- [25] Kaneider NC, Mosheimer B, Reinisch N, Patsch JR, Wiedermann CJ. Inhibition of thrombin-induced signaling by resveratrol and quercetin: effects on adenosine nucleotide metabolism in endothelial cells and platelet–neutrophil interactions. *Thrombosis Research* 2004; 144:185-194.
- [26] Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* 1996; 16:517-544.
- [27] Ortiz D, Shea TB. Apple juice prevents oxidative stress induced by amyloid-beta in culture. *Journal of Alzheimer's Disease* 2004; 6:27-30.
- [28] Rogers EJ, Milhalik S, Ortiz D, Shea TB. Apple juice prevents oxidative stress and impaired cognitive performance caused by genetic and dietary deficiencies in mice. *The Journal of Nutrition* 2003; 7:1-5
- [29] Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radicals Biology and Medicine* 2004; 36:829-837.
- [30] Leontowicz H, Gorinstein S, Lojek A, et al. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidants capacity in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13:603-610.
- [31] Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high performance liquid chromatography (HPLC). *Jour Agric Food Chem.* 2003; 51:6347-6353.
- [32] Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, BravoL, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr* 2005; In press.

[33] Floreani M, Napoli E, Quintieri L, Palatini P. Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life Science* 2003; 72:2741-2750.

[34] Coimbra SR, Lage SH, Brandizzi L, Yoshida V, Luz PL. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients. *Braz Jour of Med and Biol Research* 2005; 38: 1339-1347.

Legends to Figures

Figure 1: Effect of Resveratrol on ATP (A) and on ADP (B) hydrolysis in rat serum. Bars represent mean \pm SD for 4 independent experiments. Results are expressed as nmol Pi released / min / mg protein. * indicates significant difference from control enzyme activity ($p < 0.05$). Data were analyzed statistically by Student's t-test.

Figure 2: Effect of Purple Grape Juice on ATP (A), on ADP (B) and on AMP (C) hydrolysis, in rat serum. Bars represent mean \pm SD for 4 independent experiments. Results are expressed as nmol Pi released / min / mg protein. * indicates significant difference from control enzyme activity ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$). Data were analyzed statistically by Student's t-test.

Figure 3: Effect of Purple Grape Juice and Arginine on ATP (A), on ADP (B) and on AMP (C) hydrolysis, in rat serum. Group I represent control with water and saline. Group II: water plus arginine. Group III: Juice plus saline. Group IV: Juice plus arginine. Bars represent mean \pm SD for 4 independent experiments. Results are expressed as nmol Pi released / min / mg protein. * indicates significant difference from control enzyme activity ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$). Data were analyzed statistically by Student's t-test.

Figure 1

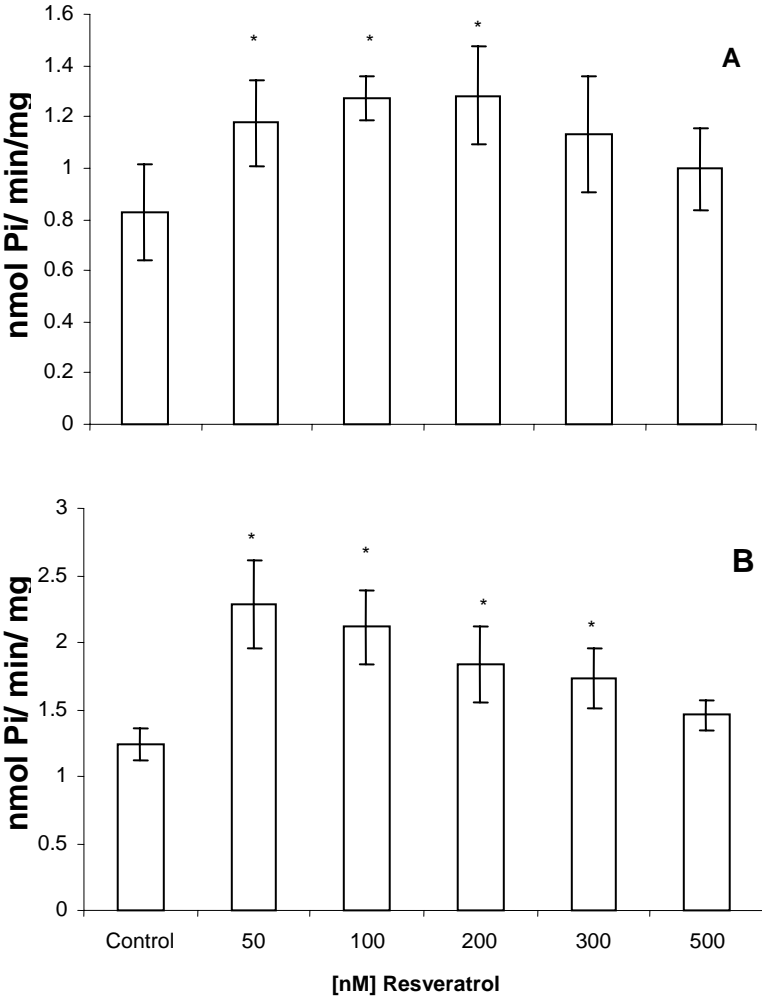


Figure 2

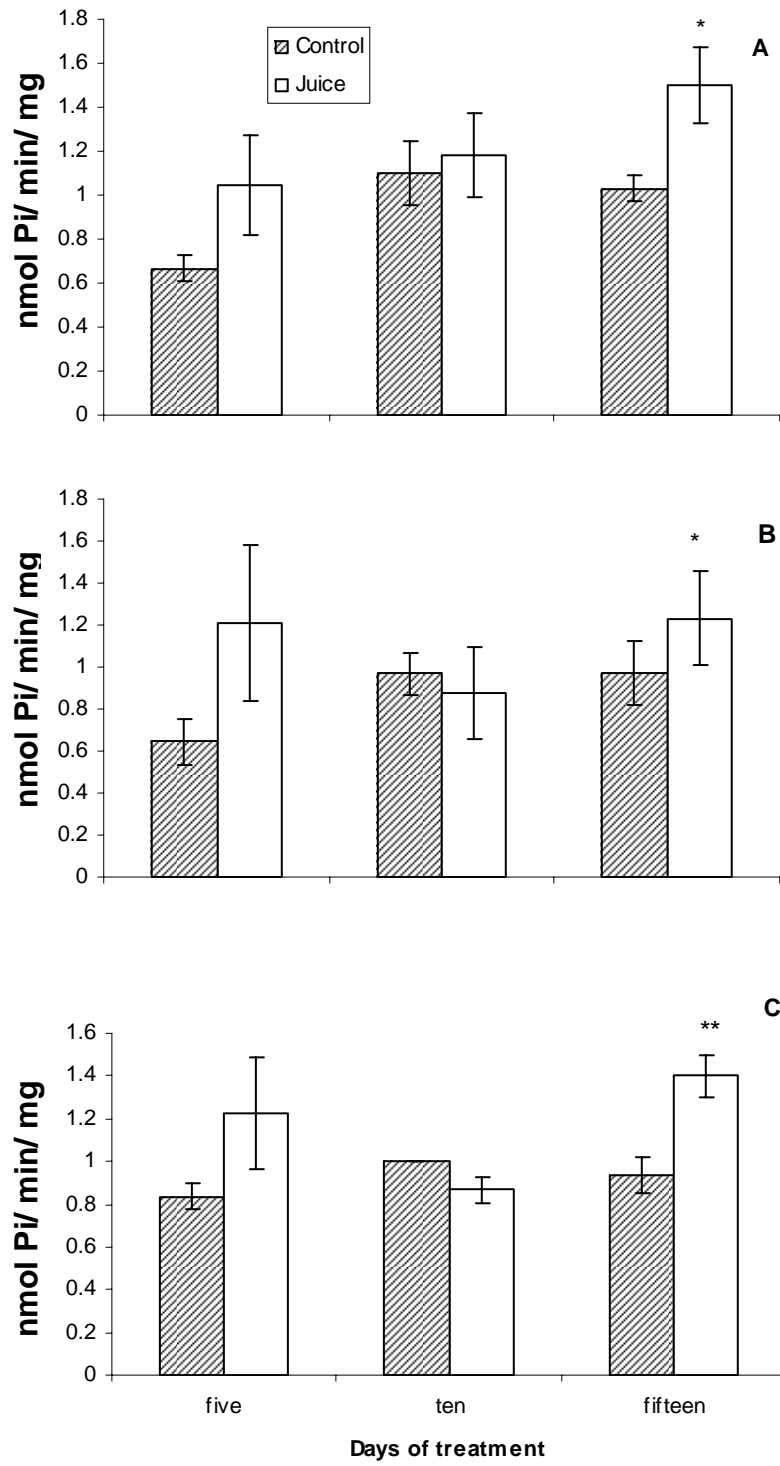
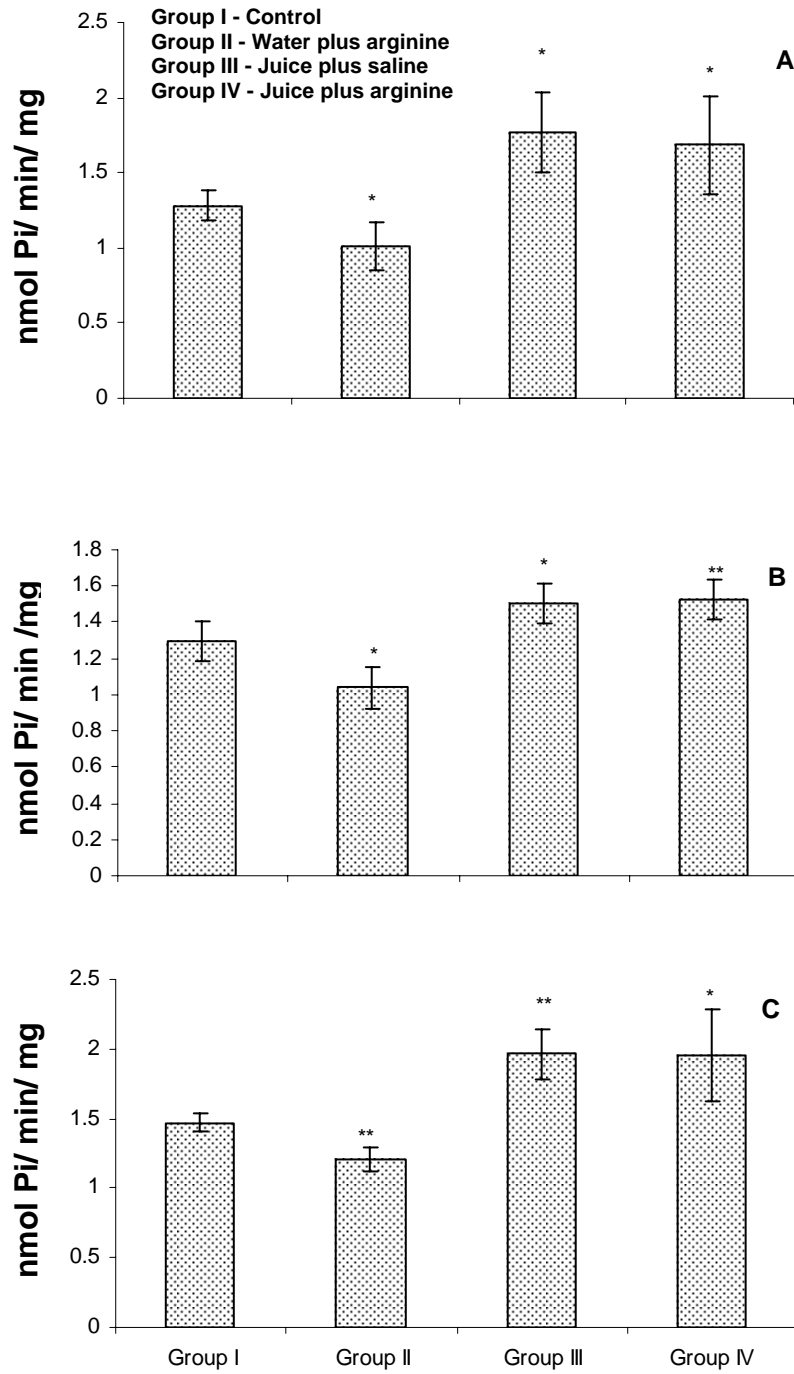


Figure 3



4- Discussão

Por mais de dez anos, estudos epidemiológicos tem mostrado que na França, o índice de mortalidade por doenças cardíacas, é menor quando comparado a outro países industrializados⁴⁹. Além disso, foi verificado que essa baixa taxa de mortalidade geralmente ocorre em pessoas que consomem vinho de forma moderada e contínua⁵⁰. Muitos estudos tem sugerido que o consumo moderado de vinho tinto está associado à redução de riscos de doenças coronarianas e câncer⁵¹⁻⁵⁶. O suco de uva, um produto com melhor preço quando comparado ao vinho, e por isso mais acessível a maioria da população, possui efeitos benéficos bastante similares aos do vinho tinto⁵⁶. Estudos também afirmam que o consumo de suco de uva está relacionado com a diminuição da agregação plaquetária, e conseqüentemente à diminuição dos riscos de doenças arteriais e coronarianas⁵⁶. Estes efeitos protetores presentes em bebidas derivadas da uva, ocorrem devido a presença de compostos polifenólicos, que exercem estas inúmeras propriedades benéficas ao organismo⁴⁹. Outros estudos, baseados em populações, tem demonstrado efeitos protetores, produzidos pelo consumo moderado de vinho tinto, à resfriados, infecções com *Helicobacter pylori*, associação positiva com funções pulmonares e redução dos riscos de desenvolvimento de diabetes tipo 2⁵⁷.

O resveratrol presente na uva, tem sido estudado pelo seu potente efeito cardioprotetor, por apresentar redução da oxidação causada pelo LDL e da agregação plaquetária. Também inibe o crescimento de inúmeras linhagens de células cancerígenas, além de poder se ligar a receptores estrogênicos e ativar

genes destes receptores *in vitro*. O resveratrol pode aparecer na forma estrutural cis e trans^{56,58}, sendo que no vinho tinto o isômero trans é o que encontra-se em maior concentração⁵⁸. Sabe-se que o resveratrol é formado na casca da uva e não na polpa da fruta. A quantidade deste composto varia consideravelmente em diferentes tipos de suco de uva e vinho, dependendo da variedade da uva, dos fatores ambientais sobre o vinhedo, o método de extração do suco, bem como das técnicas de processamento no preparo do vinho⁵⁶. A variação destas características no preparo destas bebidas, pode alterar a amplitude da vasorelaxação produzida quando as mesmas são consumidas. Estudos *in vivo* mostram que os compostos fenólicos presentes no vinho tinto são capazes de reduzir a pressão de ratos normo e hipertensos⁵⁸.

Como curiosidade a quantidade de antocianina, um outro flavonóide que aparece dando cor ao vinho tinto, e que está presente na casca da uva preta e rosa, parece estar também relacionada a atividade de vasorelaxamento⁵⁸. Um trabalho utilizando modelo de Hamsters com hipercolesterolemia, demonstrou que este pigmento quando administrado na forma de extrato, além da capacidade antioxidante é capaz de reduzir a formação das células esponjosas, que vão dar origem as placas de ateroma e que recobrem as paredes da aorta, a um índice de menos de 10%⁵⁹. A quercitina, outro flavonóide encontrado em muitas frutas e vegetais além de bebidas como o suco de uva exibe uma variedade de atividades biológicas incluindo efeitos antioxidativos e anticancerígenos⁵⁶. Assim como o resveratrol, a quercetina, que aparece em grandes quantidades na maçã, também pode sofrer alterações na sua composição química e concentrações, de acordo com as variações ambientais e demais características já citadas anteriormente⁶⁰.

Um trabalho anterior utilizando técnicas de HPLC, também demonstrou que a quantidade de polifenóis como a quercetina, presentes nas cascas das frutas é muito maior do que nas polpas das mesmas⁶⁰.

Em adição a estas propriedades, outro efeito terapêutico relevante dos polifenóis no sistema cardiovascular que pode ser relatado, é o da capacidade de interação com a síntese e liberação de NO do endotélio vascular^{49,61}. Um estudo prévio de Coimbra et al. 2005, mostrou que o efeito de vasodilatação produzido a partir do NO, *in vitro*, foi obtido tanto em presença de vinho tinto como de suco de uva⁶¹. Embora inúmeros estudos tenham demonstrado a importância do Resveratrol e da Quercitina (flavonóides presentes no vinho e no suco de uva) na prevenção de doenças, seus efeitos biológicos *in vivo* e detalhes sobre seus mecanismos de ação ainda permanecem desconhecidos^{56,62}. A atividade destes dois flavonóides *in vivo*, depende de sua bio disponibilidade, mas informações relatando detalhes a este respeito ainda permanecem inconclusivos⁵⁶.

É importante salientar que a Adenosina, produzida através da hidrólise do ATP por uma cascata enzimática (NTPDase mais 5'-nucleotidase) em soro de ratos^{23,63}, tem uma grande importância na promoção da dilatação vascular, e desta forma é considerada estrutura cardioprotetora e talvez neuroprotetora.

Neste trabalho, foi avaliado se flavonóides poderiam interferir na hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos. O estudo foi realizado *in vitro* e *in vivo* utilizando para isso alguns flavonóides e suco de uva. Nossos resultados mostraram que dois dos flavonóides testados *in vitro*, a Quercitina e seu derivado glicosídeo, a Rutina, os quais são compostos bastante comuns na dieta e bem caracterizados como compostos antioxidantes *in vitro*⁶⁴, inibiram a NTPDase (ATPase e ADPase)

e a 5'-nucleotidase (Anexo 1, A e B). Por outro lado, o resveratrol outro flavonóide testado *in vitro*, mostrou ativação das NTPDases. Baseado nos resultados obtidos, nos quais a Quercitina e a Rutina inibiram a hidrólise dos três nucleotídeos e o Resveratrol ativou a hidrólise do ATP e do ADP, nós concluímos que os flavonóides em estudo poderiam estar atuando por diferentes mecanismos sobre as enzimas, provavelmente devido a sua diferença estrutural.

Dando continuidade ao trabalho, avaliamos os efeitos da administração diária de suco de uva (contendo os flavonóides estudados *in vitro*) a um grupo de animais. Este grupo recebia somente suco de uva para beber, e para comparação, um outro grupo de animais recebia somente água. Os resultados mostraram que após quinze dias de tratamento, os animais que beberam apenas suco de uva apresentaram ativação da NTPDase e 5'-nucleotidase em soro, quando comparados com o grupo controle. Os animais que receberam suco para beber durante cinco e dez dias, não apresentaram ativação das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase. Fato semelhante pôde ser verificado em um estudo realizado anteriormente, no qual se administrava Resveratrol para beber à porcos, com o objetivo de avaliar se este induzia a atividade de uma outra enzima, a DT-diaforase (que converte a menadiona em uma hidroquinona, reduzindo sua toxicidade). Foi verificado que com um tratamento de seis dias não houve qualquer ativação desta enzima, somente com um tratamento mais prolongado, durante dezesseis dias, é que realmente pode se observar algum efeito do Resveratrol sobre a enzima⁶⁵. Um tratamento ainda mais prolongado, de 43 a 45 dias de administração diária de resveratrol, foi usado em um outro trabalho com o objetivo de avaliar neuroproteção em ratos⁶⁵.

Desta forma verificamos que o consumo crescente de suco de uva (diário e cumulativo), reafirma algumas teorias sobre alimentos funcionais, que defendem que o consumo diário de frutas e vegetais, ou derivados contendo Resveratrol e demais flavonóides, poderiam colaborar para reduzir os riscos de muitas doenças³³⁻³⁵.

Inúmeras pesquisas bioquímicas e clínicas vêm mostrando a presença em alimentos destes componentes químicos que podem ter ação biológica importante na manutenção da saúde, além dos nutrientes já conhecidos de acordo com as necessidades diárias já estabelecidas⁶⁶. Nos últimos anos, os alimentos passaram a ser vistos como sinônimos de bem-estar, redução de riscos a doenças e veículos de uma melhor qualidade de vida⁶⁷, além de mudança nos conceitos referentes às necessidades e recomendações nutricionais. Importante ainda ressaltar que esses alimentos podem ter ações diferentes no organismo de acordo com a maneira como se apresentam, se na forma *in natura* ou processados⁶⁸.

Seguindo esta idéia, outro fato importante observado em nosso trabalho, foi que a Quercitina e o Resveratrol, quando testados separadamente *in vitro*, apresentaram resultados opostos sobre a hidrólise dos nucleotídeos. No entanto ambos flavonóides, de acordo com a literatura^{56,65}, estão presentes no suco de uva, o qual mostrou ativação das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em soro de ratos adultos tratados. Uma hipótese para explicar esse acontecimento, seria a de que os efeitos do Resveratrol sobre a enzima poderiam ser mais eficientes do que os da Quercitina quando estes dois estão presentes, talvez por afinidades diferentes ao receptor; ou estes efeitos opostos poderiam ocorrer por diferenças na absorção destes compostos, devido à diferenças estruturais apresentadas por

eles. Ou ainda, uma outra hipótese, seria que o Resveratrol poderia estar atuando como uma espécie de inibidor competitivo, ligando-se ao sítio ativo das enzimas e impedindo a Quercitina de atuar.

Um estudo recente de Meng et al. 2004, demonstrou que quando se administra Resveratrol puro a humanos, este é provavelmente absorvido pelo trato gastrointestinal, enquanto a Quercetina seria absorvida somente pelo intestino delgado⁵⁶. O que não justificaria a diferença nos efeitos, já que independente do local de absorção, o destino final de ambos compostos é a luz dos vasos sanguíneos.

Após obtermos um resultado satisfatório com a administração do suco aos animais, e com base em um estudo prévio de nosso laboratório²³, no qual um modelo de hiperargininemia promoveu a diminuição na hidrólise do ATP, ADP e AMP em soro de ratos (efeitos que podem ser deletérios), nós também testamos os efeitos do tratamento com suco de uva antecedendo um tratamento agudo com a arginina. Com base em resultados anteriores do nosso trabalho, foi feito um tratamento prévio com suco de uva por quinze dias (tempo no qual se observou a ativação na hidrólise dos nucleotídeos em soro), e após então, foi administrada a arginina de forma aguda. O trabalho do modelo de hiperargininemia demonstrou que a arginina inibe a hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos, provavelmente através da formação de óxido nítrico (NO)²³. Esta hipótese parece estar de acordo com os nossos resultados, nos quais foi observado que o suco de uva parece reverter ou mesmo inibir os efeitos da arginina.

A arginina quando presente em excesso no organismo, representa um marcador bioquímico de hiperargininemia, uma desordem metabólica hereditária

causada por um defeito na etapa final do Ciclo da Uréia , que se resume a deficiência severa da enzima arginase no fígado, a qual hidrolisa arginina à uréia. Como resultado aumentam os níveis de arginina e amônia plasmática. Pacientes acometidos apresentam demência progressiva, epilepsia e deterioração do trato cortical e piramidal. Os mecanismos de patofisiologia pelos quais estes sintomas ocorrem ainda não estão totalmente esclarecidos, embora aumento dos níveis de arginina parecem estar relacionados a aumento nos níveis de NO²³. Anteriormente, um estudo já havia demonstrado que modelo experimental de hiperargininemia em ratos, permitia observar que os animais mostravam deficiência no aprendizado e memória, indicando um provável dano neurológico⁶⁹.

O aminoácido L-arginina é conhecido por apresentar inúmeras funções moduladoras sobre o sistema endócrino e imune. A arginina estimula a proliferação de células T e a produção de insulina em animais e humanos^{70,71}. Se sabe que os níveis de arginina no soro diminuem com o passar dos anos em pacientes que sofrem de diabetes⁷⁰ , por este motivo, tem-se utilizado nos dias de hoje, suplementação deste aminoácido para pacientes acometidos por esta disfunção⁷⁰. Muitos experimentos e estudos clínicos tem mostrado também efeitos benéficos da L-arginina sobre o sistema cardiovascular (vasos e coração), quando há alguma disfunção envolvendo a síntese de NO. Estudos envolvendo pacientes saudáveis e pacientes acometidos por hipertensão e diabetes, demonstraram que o uso da L-arginina pode regular a homeostase vascular, melhorando o fluxo sanguíneo⁷².

Hoje já se sabe que a síntese de NO parece ter um papel fundamental no dano oxidativo, e que esta síntese tem como consequência a formação de radicais

livres, o que pode resultar em dano celular. A relação entre NO e arginina, um composto intermediário do Ciclo da Uréia e um precursor ou substrato do NO, levanta a questão de que alterações em genes envolvidos no Ciclo da Uréia, poderiam estar envolvidas na patofisiologia da hipertensão pulmonar de neonatos, hipertensão pulmonar pós cirurgia cardíaca, e complicações no transplante de medula óssea⁷³. O NO parece ter um importante papel fisiológico em condições normais, incluindo liberação de neurotransmissores, expressão de genes, percepção da dor, plasticidade sináptica e aprendizado⁷⁴. Por outro lado, o NO também é considerado um importante mediador de neurotoxicidade em uma variedade de desordens neurológicas, como isquemia cerebral, doença de Alzheimer e Parkinson⁷⁴.

Considerando que um aumento nos níveis de arginina pode resultar em um aumento na produção de NO, um possível papel do NO na patofisiologia da hiperargininemia é discutido⁷⁵. Um estudo anterior que testou o efeito de polifenóis como a Quercetina e o Tanino sobre a enzima óxido nítrico sintase, já havia demonstrado que estes compostos são capazes de inibir os efeitos desta enzima a nível endotelial, inibindo de forma direta a formação de NO⁷⁵.

Entre os efeitos deletérios causados por radicais livres, podem ser citadas as desordens neurodegenerativas⁷⁶. Estas desordens resultam em uma diminuição na memória o que está diretamente associado a uma dependência funcional do indivíduo acometido⁷⁷. Evidências indicam que o stress oxidativo poderia estar envolvido em doenças como Alzheimer e Parkinson, pois se sabe que o sistema nervoso central em cérebro de humanos é bastante vulnerável ao ataque por radicais livres⁷⁶. Muitos estudos afirmam que polifenóis poderiam

atuar diminuindo o dano causado pelos radicais livres e metais de transição, quelando estes compostos e desta forma protegendo o cérebro à danos muitas vezes irreversíveis. Em um destes estudos, é citado que o Resveratrol parece reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio⁶⁵. Isto nos dá suporte para acreditar que os flavonóides também podem inibir a produção de NO, um importante radical livre derivado do oxigênio, e consequentemente diminuir os efeitos da arginina sobre a hidrólise dos nucleotídeos, melhorando de certa forma os efeitos causados em pacientes acometidos pela hiperargininemia. Inibindo a produção de NO, desordens neurológicas com as quais este estaria envolvido, também poderiam estar, de certa forma, sendo inibidas. Heo et al. 2004, demonstraram que a quercetina tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, e desta forma proteger o cérebro dos efeitos tóxicos causados por radicais livres⁷⁶.

Pinder et al. 2004, observou o efeito do consumo de bebidas alcoólicas em geral e do vinho sobre a saúde mental, e constatou que o consumo moderado de álcool, e principalmente de vinho (devido a todas as características já citadas anteriormente), pode reduzir de forma bastante expressiva o risco de derrame cerebral e doença de Alzheimer. O álcool, por possuir propriedades anticoagulantes provavelmente estaria diminuindo a agregação plaquetária e a atividade fibrinolítica, diminuindo assim a aterosclerose, e consequentemente protegendo o organismo de um derrame cerebral⁵⁷.

Com base em nossos resultados, e em resultados de trabalhos anteriores^{16,19,39}, observamos que os efeitos produzidos pelos flavonóides e pela adenosina, são de certa forma, bastante semelhantes. Podemos até afirmar que

possuem uma relação bastante próxima e direta. Sabe-se que a adenosina é cardio e talvez neuro protetora, e que os flavonóides parecem também promover estes mesmos efeitos. Desta forma, como a alimentação é essencial para a manutenção da vida, e cada vez mais se sabe que certos compostos presentes em alimentos possuem ações benéficas sobre enzimas, parece simples pensar em buscar cada vez mais uma alimentação equilibrada, saudável e rica em frutas e verduras, para manutenção do perfeito funcionamento de nosso organismo.

Neste trabalho observamos que o flavonóide resveratrol, assim como o suco de uva, aparentemente induziram a atividades das enzimas NTPDase e 5'Nucleotidase, que em conjunto, degradaram o ATP até adenosina; o que foi verificado devido ao aumento na atividade de hidrólise obtida em nossos experimentos. Este resultado é de grande interesse, principalmente quando relacionado ao efeito cardioprotetor realizado pela adenosina, a qual pode exercer efeitos como a vasodilatação, redução da contratibilidade cardíaca, bem como efeitos protetores sobre episódios isquêmicos¹⁶.

Um detalhe importante deste trabalho, foi que os efeitos da vasodilatação promovidos pela presença da Adenina, foram obtidos pelo suco de uva, um composto sem álcool. Um aspecto bastante relevante para a clinica de pacientes com riscos de eventos cardiovasculares, para os quais o consumo de álcool, mesmo que moderado, não é recomendado.

5 - Conclusões

Neste trabalho, verificamos que os flavonóides Quercetina e Rutina, quando testados *in vitro*, apresentaram inibição da hidrólise dos nucleotídeos da adenina em soro, e que o flavonóide Resveratrol quando testado nas mesmas condições, apresentou efeito contrário, ativando a hidrólise destes nucleotídeos.

Baseado neste resultado apresentado *in vitro* pelo Resveratrol, optamos por tratar ratos adultos com suco de uva, o qual, como se sabe pela literatura (pois não quantificamos os flavonóides presentes no suco de uva que utilizamos em nossos testes), parece apresentar em sua composição principalmente o Resveratrol, além de vários outros compostos. O suco de uva mostrou ativação na hidrólise dos nucleotídeos da adenina no soro destes animais, quando comparamos estes, com animais controles tratados somente com água. Observamos *in vivo*, tratando os animais com suco de uva, o mesmo efeito que o Resveratrol apresentou *in vitro*.

O último passo foi avaliar os efeitos deste mesmo tratamento com suco de uva, sobre o acúmulo de arginina no organismo. Após o tratamento de ratos com o suco de uva, seguido da injeção de arginina, verificamos no soro, que o suco de uva parece reverter ou prevenir os efeitos causados pelo acúmulo de arginina, de inibição da hidrólise dos nucleotídeos da adenina.

Como perspectivas futuras deste trabalho, podemos citar a quantificação de flavonóides presentes em suco de uva, para que possamos ter a certeza dos componentes com os quais estamos trabalhando.

6 - Referências Bibliográficas

1. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci* 2001; 24:31-55.
2. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor in cell membrane receptors for drugs and hormones: A Multidisciplinary Approach, Raven Press, New York 1978,pp. 107-118.
3. Ralevic V, Burnstock B. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.*,1998; 50:413-492.
4. Communi D, Gonzales NS, Detheux M. Identification of a novel human ADP receptor couple to Gi. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276:41479-41485.
5. Czajkowski R, Baranska J. Cross talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signaling pathway in glioma C6 cells. *Acta Biochem. Polonica*, 2002; 49:877-889.
6. Fielder JL, Polalrd HB, Rojas E. Quantitative analysis of depolarization-induced ATP release from mouse brain synaptosomes: external calcium dependent and independent process. *J. Memb. Biol.* 1992; 127(1):21-33.
7. Nagy A, Shuster TA, Delgado-Escueta SV. Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymatic characterization. *J. Neurochem.*, 1986; 47:976-986.
8. Phillips JW, Wu PH. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.*, 1981; 16:187-239.

9. Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Develop* 2001; 52:44-56.
10. Sandona D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R. Characterization of the ATP-hydrolysing activity of α -sarcoglycan. *Biochem., J.* 2004; 381: 105–112.
11. Shi JD, Kukar Ti, Wang CY, Li QZ, Cruz PE, Semiromi AD, Yang P, Gu Y, Lian W, Wu DH, She JX. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Mammalian Endo-apyrase (*LALP1*). *The Jour of Bilo Chem.*,2001; 276: 17474–17478.
12. Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, Sevigny J. Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*, 2004; 43: 5511-5519.
13. Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys. Res. Commun*, 1996; 218: 916-923.
14. Vasconcelos EG, Ferreira ST, De Carvalho TMU, De Souza W, Ketlun AM, Mancilla M, Valenzuela MA, Verjovski-Almeida S. Partial modification and immunological cross-reactives with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J. Biol. Chem*, 1996;271: 22139-22145.
15. Zimmermann H, Braun N. Ecto-nucleotides: molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the central nervous system. *Prog. Brain. Res.*, 1999; 120: 371-385.
16. Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, et al. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Science*, 2004; 74:3275-3284.

17. Pochmann D, Rucker B, Battastini AMO, Sarkis JJF. Ovariectomy and estradiol replacement therapy alters the adenine nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Thrombosis Research*, 2004; 114: 275-281.
18. Zimmermann H. Biochemistry localization and functional roles of ecto-nucleotides in the nervous system. *Prog. Neurobiol* ,1996; 49:589-618.
19. Motte S, Communi S, Piroton S, Boeynaems JM. Involvement of multiple receptors in the action of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1995; 27:1-7.
20. Fontella FU, Bruno AN, Balk RS, et al. Repeated stress effects on nociception and on ectonucleotidase activities in spinal cord synaptosomes of female rats. *Psychology and Behavior*, 2005; 85:213-219.
21. Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS. Role of Estrogen Receptor in the Regulation of Ecto-5'-Nucleotidase and Adenosine in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2004; 10: 708–717.
22. Wilot LC, Silva RS, Ferreira OJ, Bonam CD, Sarkis JJF, Rocha E, Battastini AMO. Chronic treatment with lithium increases the ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes, 2004; 368:167–170.
23. Delwing D, Gonçalves MCF, Sarkis JJF, Wyse ATS. L-Name administration prevents the inhibition of nucleotide hydrolysis by rat blood serum subject to hyperargininemia. *Amino Acids*, 2005; In press.
24. Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoid radicals. In Rice Evans C, Packer L Ed. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, 1998: p 137-61.

25. King RD, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jour of American Dietetic Association*, 1999; 99: 213-219.
26. Dillard CJ, German JB. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Jour of Science of Food and Agriculture*, 2000; 80:1744-1756.
27. Peterson J, Duyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*; 1998: 18(12):1995-2018.
28. Middleton E, Kandaswami C. The impact of flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harbone, JB, Ed. *The Flavonoids: 1986; Advances in Research Since*.
29. Croft KD. The Chemistry And Biological Effects Of Flavonoids And Phenolic Acids. *Annas Of The New York Academy Of Science* 1998; 854:435-42
30. Ferguson Lr, Harris Pj. Protection Agaisnst Cancer By Wheat Bran: Role Of Dietary Fibre And Phytochemicals. *European Journal Of Cancer Prevention*, 1999; 8(1):17-25.
31. Kryadl D, Lukito W. Functional food and contemporary nutrition-health paradigm: tempeh and its potential beneficial effects in disease prevention and treatment *J. Nutr*, 2000;16(697):7-8.
32. Da Cruz IBM, Alho CS. Envelhecimento populacional: panorama epidemiológico e de saúde do Brasil e do Rio Grande do Sul. In: Jeckel-Neto EA, Da Cruz IBM, orgs. *Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II*. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2000. p. 175-91.
33. Greene GW, Yensan NF, Padula C, Rossi S, Rossi JS, Clark PG. Differences in Psychosocial Variables by Stage of Change for Fruits and Vegetables in Older Adults. *Jour Am Diet Assoc.*, 2004; 104:1236-1243.

34. Hasler CM. Functional foods their role in disease prevention and health promotion. *Food. Technol*, 1998; 52(11): 63-70.
35. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, 1998; 56(11):317-33.
36. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-26.
37. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001.
38. Halliwell B, Gutteridge JMC, *Free radicals in Biology and Medicine*. 2a ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
39. Halliwell B. Free radicals, antioxidantes and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 1994; 344:721-24.
40. Li S, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of celular glutathione peroxidase redox regulation in the supression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Câncer Research*, 2000; 60:3927-9.
41. Bradford RW, Allen HW, Culbert ML. *Oxidology-The study of reactive oxygen toxic species and their metabolism in the health and disease*. Published by The Robert W Bradford Foundation, Los Altos, Califórnia 1985.
42. Halliwell B. Antioxidant defence mechanism: from beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 1999;31(4):261-72.

43. Pansarasa O, Felzani G, Vecchiet J, Marzatico F. Antioxidant pathways in human aged skeletal muscle: relationship with the distribution of type II fibers. *Experimental Gerontology*, 2002; 37: 1069-1079.
44. Linton S, Davies MJ, Dean RT. Protein oxidation and ageing. *Experimental Gerontology*, 2001; 36: 1503-1518.
45. Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 1995; 16(4): 661-674.
46. Functional foods – position of the American Dietetic Association. *J Am Diet Assoc*, 1999; 99:1278-85.
47. Vannucchi H, Jordão Jr A. Radicais livres, antioxidantes e dieta: a importância das frutas e verduras. In: de Angelis RC. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 193-201.
48. Graig WJ. Phytochemicals: Guardians of our Health. *J Am Diet Assoc*, 1997; 10(suppl2):199-204.
49. Mendes A, Desgrange C, Che'zec C, Vercauteren J, Freslon JL. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2003; 17:673–681.
50. Manach C, Regeat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research*, 1996; 16:517-544.
51. Ortiz D, Shea TB. Apple juice prevents oxidative stress induced by amyloid-beta in culture. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2004; 6:27-30.

52. Rogers EJ, Milhalik S, Ortiz D, Shea TB. Apple juice prevents oxidative stress and impaired cognitive performance caused by genetic and dietary deficiencies in mice. *The Journal of Nutrition*, 2003; 7:1-5
53. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radicals Biology and Medicine*, 2004; 36:829-837.
54. Leontowicz H, Gorinstein S, Lojek A, et al. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidants capacity in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002; 13:603-610.
55. Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high performance liquid chromatography (HPLC). *Jour Agric Food Chem.*, 2003; 51:6347-6353.
56. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and Plasma Levels of Resveratrol and Quercetin in Humans, Mice, and Rats after Ingestion of Pure Compounds and Grape Juice. *Jour Agric Food Chem.*, 2004; 52:935-942.
57. Pinder RM, Sander M. Alcohol, wine and mental health: focus on dementia and stroke, 2004; 18(4):449–456.
58. Dell’Agli M, Galli GV, Vrhovsek U, Mattivi F, Bosisio E. In vitro Inhibition of Human cGMP-Specific Phosphodiesterase-5 by Polyphenols from Red Grapes. *Jour Agric Food Chem.*, 2005; 53:1960-1965.
59. Auger C, Gerain P, Bichon FL, et al. Phenolic from Commercialized Grape Extracts Prevent Early Atherosclerotic Lesions in Hamsters by Mechanisms Others than Antioxidant Effect. *Jour Agric Food Chem.*, 2004; 52:5297-5302.

60. Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high performance liquid chromatography (HPLC). *Jour Agric Food Chem.*, 2003; 51:6347-6353.
61. Coimbra SR, Lage SH, Brandizzi L, Yoshida V, Luz PL. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients. *Braz Jour of Med and Biol Research*, 2005; 38: 1339-1347.
62. Lotito SB, Frei B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radicals Biology and Medicine*, 2004; 37:251-258.
63. Bruno AN, Bonan CD, Wolfchuk ST, Sarkis JJF, Battastini AMO. ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. *Life Science*, 2002; 71:215-225.
64. Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, BravoL, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr*, 2005; In press.
65. Floreani M, Napoli E, Quintieri L, Palatini P. Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life Science* 2003; 72:2741-2750.
66. Graig WJ. Phytochemicals: Guardians of our Health. *J Am Diet Assoc*, 1997; 10 (suppl 2): 199-204.

67. Salder MJ and Salt MM. Functional Foods. The Consumer the Product and the Evidence. The Royal Soc Chemistry, UK; 1998.p. 215.
68. Arai S. Studies on functional foods in Japan State of the art. Biosci Biotech Biochem, 1998; 60: 9-15.
69. Reis EA, Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse ATS. Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. Brain Res, 2002; 951:151-157.
70. White MB, Thornton FJ, Tantry U, Barbul A. L-Arginine Supplementation Enhances Diabetic Wound Healing: Involvement of the Nitric Oxide Synthase and Arginase Pathways. Metabolism, 2002; 51:1269-1273
71. Mendez JD, Hernandez RH. L-Arginine and polyamine administration protect b-cells against alloxan diabetogenic effect in Sprague–Dawley rats. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2005; 59: 283–289.
72. Cylwik D, Mogielnicki A, Buczko W. L-arginine and cardiovascular system. Pharmacological Reports, 2005; 57:14-22.
73. Scaglia F, Brunetti-Pierri N, Kleppe S et al. Clinical Consequences of Urea Cycle Enzyme Deficiencies and Potential Links to Arginine and Nitric Oxide Metabolism. J. Nutr., 2004; 134: 2775S–2782S.
74. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. J Chem Neuroanat, 1996; 10:179-190.
75. Chiesi M, Schwaller R. Inhibition of constitutive endothelial nosynthase activity bytaniin and quercetin. Biochemical Pharmacology, 1995; 49: 495-501.

76. Heo HJ, Lee CY. Protective Effects of Quercetin and Vitamin C against Oxidative Stress-Induced Neurodegeneration. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 7514-7517.
77. Kuresch AY, Joseph JA. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001; 30:583–594.

7. Anexo 1

Figura A : Efeitos da **Quercetina** sobre a hidrólise de ATP, ADP e AMP em soro de ratos.

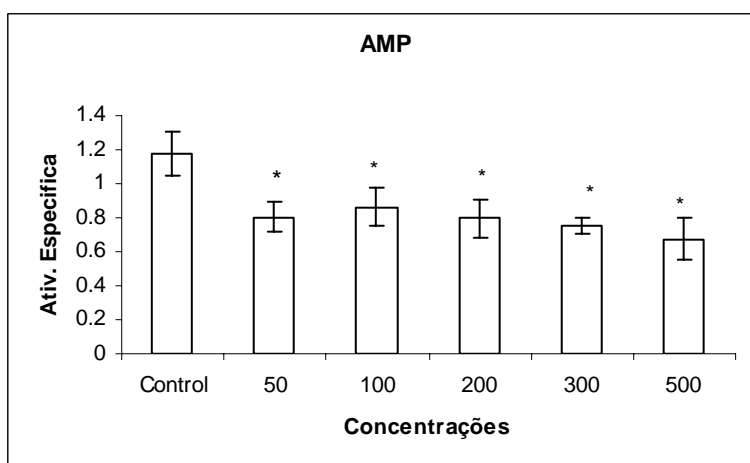
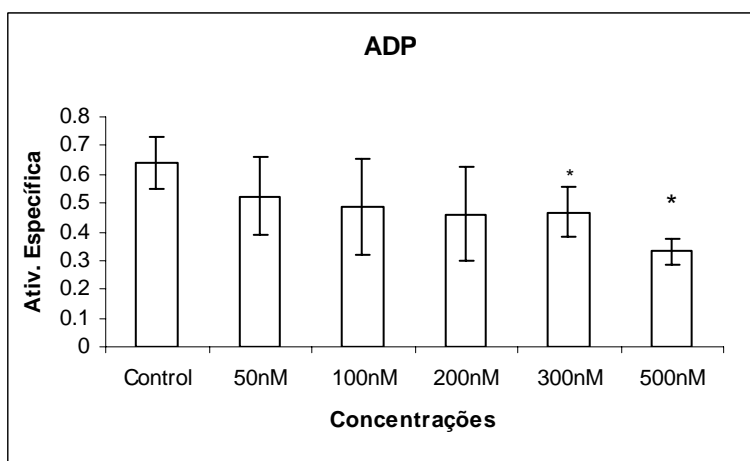
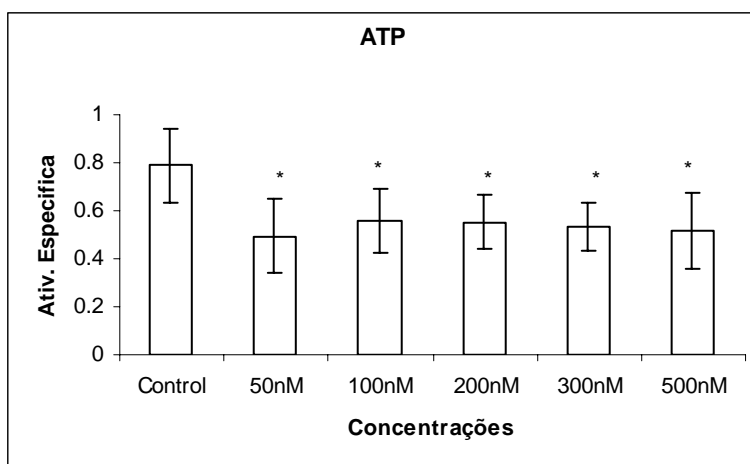
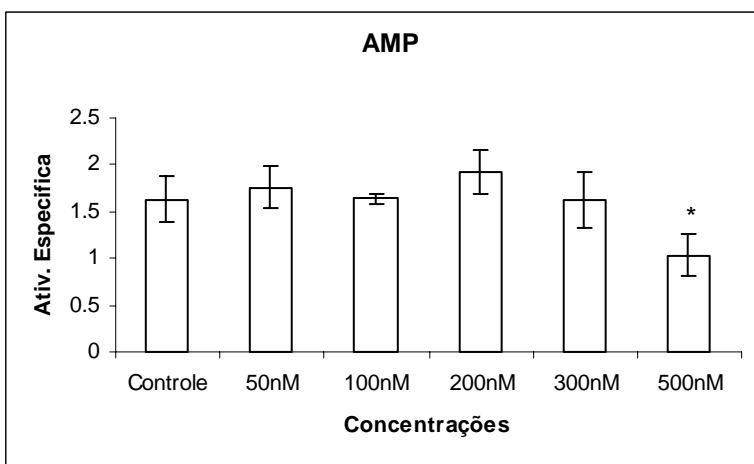
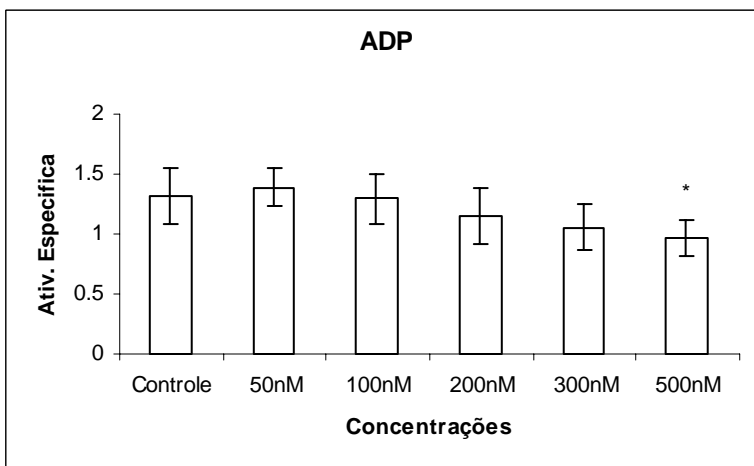
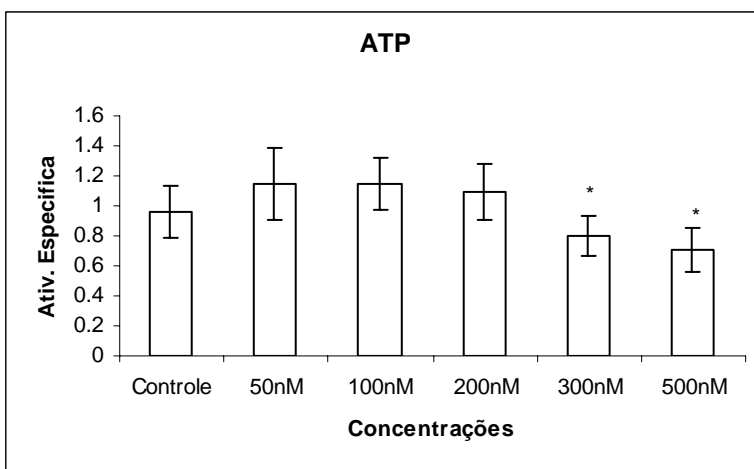


Figura B : Efeitos da **Rutina** sobre a hidrólise de ATP, ADP e AMP em soro de ratos.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)