



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

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DO ESTRESSE  
OXIDATIVO EM RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS  
TRATADOS COM N-ACETILCISTEÍNA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ANDRÉ VALLE DE BAIROS**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DO ESTRESSE  
OXIDATIVO EM RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS  
TRATADOS COM N-ACETILCISTEÍNA**

por

**André Valle de Bairros**

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

**Orientadora: Vera Maria Morsch  
Co-orientadora: Solange Cristina Garcia**

**SANTA MARIA, RS, BRASIL  
2009**

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

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

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM  
RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS TRATADOS COM N-  
ACETILCISTEÍNA**

Elaborada por  
**André Valle de Bairros**

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

**Comissão examinadora:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Maria Morsch**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof. Dr. Rafael Noal Moresco**

---

**Prof. Dr. Vânia Lúcia Loro**

Santa Maria, 20 outubro de 2009

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Vera e Selsso por acreditarem em mim em todos os momentos.*

*À minha querida irmã Jacqueline, cuja alegria presente em suas ações é motivo de inspiração para mim.*

*À minha namorada, Lilitiana (Lica), que foi capaz de pacificar minha alma, além de sempre me incentivar a ultrapassar os desafios que se apresentam ao longo da vida.*

*Agradeço a todos por todo o amor, carinho, compreensão, esforços, paciência, sacrifícios e renúncias. Amo muito vocês!*

*Dedico também, a todos aqueles que acreditam na possibilidade de construirmos um mundo mais fraterno, justo, equânime, mais sustentável e, portanto, mais humano para nós e para as gerações vindouras.*

## **Agradecimento especial**

A professora **Dr<sup>a</sup> Vera Maria Morsch** pela oportunidade de aprendizado, pela dedicação, paciência e orientação deste trabalho. Também pelo exemplo de profissionalismo, organização e sinceridade em seus atos, mostrando caminhos e dando apoio em vários momentos.

A professora **Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia** pela oportunidade de aprendizado, pela dedicação, paciência e orientação desde minha iniciação científica até este trabalho. É um exemplo de perseverança, determinação e garra, sempre estimulando o crescimento profissional de seus alunos.

## **Agradecimentos**

A toda a minha família pelo constante apoio emocional, amizade, carinho e por ser um grupo maravilhoso, que serve de estrutura e segurança para alçar vôos maiores.

Aos meus amigos: Lucas, Everton, Cristiano, Rafael, Felipe e Maurício que me acompanham desde o trote ao ingressar na universidade até o presente momento.

Em especial ao Clóvis, Helena, Fernando, Miguel e Rachel pelo tempo juntos no LATOX, do qual o meu envolvimento com vocês foi fundamental para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Agradeço a Denise, Gabriela, Janisse, Juliana Va, Juliana Vi, Juniara, Karen, Natália, Silvana e Sílvia pela amizade e convívio durante os primeiros anos do LATOX.

Aos colegas do LATOX: Ana Paula, Ângela Maria, Gianine, Marieli, Raquelzinha, Fernanda pelo convívio, a disponibilidade, o esforço e a aprendizagem que me proporcionaram. Além de todo o suporte técnico na realização de todo o projeto, na coleta das amostras e na realização de todas as análises.

Agradeço os colegas do laboratório de enzimologia toxicológica: Cínthia Saydelles, Cíntia Mellazzo, Lara, Jessié, Jeandre, Javed, Gustavo, Júlia, Liana, Roberta, Jucimara, Caroline, Naiara, Jamile, Amanda, Margarete, João, Viviane, Vanessa, Jader, Claudio, Jonas, Rosélia, Liési e professora Maria Rosa por me receberem de braços abertos no começo deste ano, permitindo que eu fizesse parte deste grupo de pesquisa.

Ao professor Leandro Carvalho, que sempre esteve disposto a ensinar-me no período em que trabalhamos juntos.

Agradeço os colegas e amigos do CPESM e SEG por acreditarem no meu potencial oferecendo-me uma oportunidade de trabalho em um turbulento momento de minha vida.

Aos professores Rafael Noal Moresco, Vânia Lúcia Loro e Daniela Bitencourt Rosa Leal por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À Universidade Federal de Santa Maria por toda estrutura, professores dedicados e oportunidades que me ofereceu durante o tempo em que estudei nesta instituição.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“A vida é como andar de bicicleta: para manter o equilíbrio, deve-se ficar em movimento.”*

**Albert Einstein**

*“...não se trata de quão forte você é capaz de bater. Mas sim o quão forte você é capaz de agüentar os golpes e continuar seguindo em frente. Quanto você pode receber e continuar seguindo em frente.*

*Assim que a vitória é conquistada”.*

**Silvestre Stallone** - Trecho do filme Rocky Balboa

# RESUMO

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

## **BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS TRATADOS COM N-ACETILCISTEÍNA**

Autor: ANDRÉ VALLE DE BAIRROS

Orientadora: VERA MARIA MORSCH

Co-orientadora: SOLANGE CRISTINA GARCIA

Data e local de defesa: Santa Maria, 20 de outubro de 2009

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica provocada pela diminuição da produção e/ou ação da insulina que induz a hiperglicemia. Isto ocasiona o aumento do estresse oxidativo que está relacionado a várias patologias e, conseqüentemente, aos danos celulares. Neste sentido, estudos com pró-drogas como a N-acetilcisteína (NAC) tornam-se interessantes como uma possível terapia medicamentosa. A NAC é um medicamento com capacidade antioxidante além de ser precursor da glutatona reduzida (GSH), um importante antioxidante endógeno. Este trabalho objetivou avaliar os níveis dos biomarcadores sanguíneos do estresse oxidativo como: GSH, malondialdeído (MDA), superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GPx). Além disso, avaliou-se os biomarcadores de função renal, hepática, glicemia, hemoglobina glicada (HbA1C) e a atividade da butirilcolinesterase (BuChE) em ratos normais e diabéticos induzidos com aloxano tratados com NAC durante 30 dias. Os grupos estudados foram (n=6): Controle/salina; Controle/ NAC 25 mg/kg; Controle/ NAC 75 mg/kg; Diabético/ salina; Diabético/ NAC 25 mg/kg; Diabético/ NAC 75 mg/kg. A suplementação de NAC não apresentou efeitos sobre a glicemia, HbA1C e biomarcadores de função renal e hepática em todos os grupos estudados. Os níveis de GPx, GSH, catalase e MDA não apresentaram diferenças estatísticas nos grupos diabéticos tratados com NAC quando comparados ao grupo diabético/ salina. Entretanto, os níveis de SOD em ratos diabéticos que receberam NAC foi mais elevado ( $p < 0.05$ ) quando comparado ao grupo diabético/ salina. Por outro lado, os níveis de BuChE sérica diminuíram em animais diabéticos tratados com NAC quando comparado aos ratos diabéticos/ salina ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a NAC não alterou significativamente os biomarcadores sanguíneos do estresse oxidativo. Porém, a NAC demonstrou efeito sobre as enzimas SOD e BuChE em grupos diabéticos, o que indica que estas enzimas têm importante papel na DM e que são necessários mais estudos para investigar a ação desta droga e sua relação com SOD e BuChE nesta endocrinopatia.

*Palavras chave:* Diabetes Mellitus; biomarcadores sanguíneos; N-acetilcisteína; Butirilcolinesterase; Ratos.



# ABSTRACT

Master dissertation  
Post Graduate Course in Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

## BLOOD BIOMARKERS OF THE OXIDATIVE STRESS IN NORMAL AND DIABETIC RATS TREATED WITH N-ACETYLCYSTEINE

AUTHOR: ANDRÉ VALLE DE BAIRROS  
ADVISOR: VERA MARIA MORSCH  
CO-ADVISOR: SOLANGE CRISTINA GARCIA  
Date and place of defense: Santa Maria, October 20, 2009

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder caused by decreased production and/or action of insulin which leads to hyperglycemia. This results in increased oxidative stress, which is related to several pathologies and, consequently, to cell damage. In this regard, studies investigating pro-drugs such as N-acetylcysteine (NAC) as a possible drug therapy are important. NAC is a drug with antioxidant capacity as well as a precursor of reduced glutathione (GSH), an important endogenous antioxidant. This study aimed to assess the levels of blood biomarkers of oxidative stress such as GSH, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPx). In addition, we evaluated biomarkers of renal and hepatic function, blood glucose and glycated hemoglobin (HbA1C) and butyrylcholinesterase activity (BuChE) in healthy mice and alloxan-induced diabetic mice treated with NAC for 30 days. The groups were (n = 6): Control / saline; Control / NAC 25 mg / kg; Control / NAC 75 mg / kg; Diabetic / saline; Diabetic / NAC 25 mg / kg; Diabetic / NAC 75 mg / kg. Supplementation of NAC had no effect on blood glucose, HbA1C and biomarkers of renal and hepatic function in any group. The levels of GPx, GSH, catalase and MDA did not differ in the diabetic groups treated with NAC when compared to the diabetic / saline group. However, the levels of SOD in diabetic rats that received NAC were higher ( $p < 0.05$ ) when compared to the diabetic / saline group. Moreover, the levels of serum BuChE decreased in diabetic animals treated with NAC compared to diabetic / saline rats ( $p < 0.05$ ). The results of this study demonstrate that NAC did not significantly alter blood biomarkers of oxidative stress. However, NAC was shown to effect the enzymes SOD and BuChE in diabetic groups, indicating that these enzymes play an important role in DM and that further studies are needed to investigate the action of this drug and its relationship with SOD and BuChE in this endocrinopathy.

*Keyword:* Diabetes Mellitus; Blood biomarkers; N-acetylcysteine; Butyrylcholinesterase; Rats.

## LISTA DE FIGURAS

### DISSERTAÇÃO

<b>Figura 1</b> – Estrutura química do aloxano. Adaptado de Szkudelski (2001) .....	23
<b>Figura 2</b> – Mecanismo de ação do aloxano. Adaptado de Szkudelski (2001) .....	24
<b>Figura 3</b> – Estrutura química da N-acetilcisteína. Adaptado de ( <a href="http://www.benbest.com/nutrceut/NAC.jpg">http://www.benbest.com/nutrceut/NAC.jpg</a> ) .....	26
<b>Figura 4</b> – Reação de Fenton. Adaptado de ( <a href="http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Radicaislivres.htm">http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Radicaislivres.htm</a> ).....	29
<b>Figura 5</b> – Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons. Adaptado de ( <a href="http://biobioradicaais.blogspot.com/2008/11/produo-de-radicaais-livres.html">http://biobioradicaais.blogspot.com/2008/11/produo-de-radicaais-livres.html</a> ) .....	32
<b>Figura 6</b> - Hiperglicemia induz geração de EROs e conseqüentemente ativação das principais vias patológicas ( ____ papel direto; ----- papel indireto). <b>GlcNac</b> = N-acetilglicosamina; <b>PAI</b> = inibidor da ativação de plasminogênio; <b>TGF-β</b> = fator de crescimento Beta transformado. Adaptado de ROLO & PALMEIRA (2006).....	34
<b>Figura 7</b> - A hiperglicemia persistente e seus efeitos fisiológicos. Adaptado de ( <a href="http://3.bp.blogspot.com/_XHLtDw9I4gA/Sk9Tpt_BVI/AAAAAAAAAXc/3wkKHYxRz8g/s400.gif">http://3.bp.blogspot.com/_XHLtDw9I4gA/Sk9Tpt_BVI/AAAAAAAAAXc/3wkKHYxRz8g/s400.gif</a> ) .....	35
<b>Figura 8</b> – Enzimas antioxidantes. Adaptado por VASCONCELOS et al (2007).....	39
<b>Figura 9</b> – Estrutura química da glutathiona reduzida (GSH). Adaptado de ( <a href="http://quiprona.files.wordpress.com/2009/07/antioxidantes.png">http://quiprona.files.wordpress.com/2009/07/antioxidantes.png</a> ).....	40
<b>Figura 10</b> – Sistema antioxidante da glutathiona e suas enzimas envolvidas. Adaptado de SIES et al (1997).....	40
<b>Figura 11</b> - Formação do MDA. Adaptado de ALESSIO et al (2000).....	43
<b>Figura 12</b> – Estrutura química da acetilcolina. Adaptado de ( <a href="http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymoduleport.html">http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymoduleport.html</a> ) .....	44
<b>Figura 13</b> – Relação entre hiperglicemia, EROs e fatores de inflamação. Adaptado de GUO et al (2007) .....	47
<b>Figura 14</b> – Interação entre fatores de inflamação e colinesterases. Adaptado de DAS (2007) .....	48

## LISTA DE TABELAS

### DISSERTAÇÃO

<b>Tabela 1</b> - Espécies reativas de oxigênio e suas meias-vidas, em segundos. (Adaptado de Jordão Jr. et al, 1998).....	31
--	----

### MANUSCRITO I

Table 1. Glucose and glycated haemoglobin levels in control and diabetic rats treated with NAC.....	75
Table 2. Inicial and final body weight, haemoglobin and hematocrite in control and diabetic rats treated with NAC.....	75
Table 3. $\gamma$ -GT, TGO, TGP, creatinine and urea in control and diabetic rats treated with NAC.....	76
Table 4. Catalase and GPx of in control and diabetic rats treated with NAC.....	76

### MANUSCRITO

#### Legends

Figure 1. Malondialdehyde levels in plasma of rats measured by HPLC ( $\mu\text{mol/L}$ ). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means $\pm$ S.E.M. (n= 6 samples/ group). * Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); ** Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ).....	77
---	----

Figure 2. Erythrocyte glutathione in total blood of rats quantified by HPLC-UV ( $\mu\text{mol/g Hb}$ ). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means $\pm$ S.E.M. (n = 6 samples/group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ).....77

Figure. 3. Superoxide dismutase activity in total blood of rats using epinephrine as substrate (U SOD/ mg Hb). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means  $\pm$  SEM (n = 6 samples/ group). \* Significantly different from control group ( $P< 0.05$ ); \*\* Significantly different from untreated diabetic group ( $P< 0.05$ ).....78

Fig. 4. Butyrylcholinesterase activity in serum of rats using propionyl choline as substrate (UI/ mL). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means  $\pm$  SEM (n= 6 samples/ group). \* Significantly different from control group ( $P< 0.05$ ); \*\* Significantly different from untreated diabetic group ( $P< 0.05$ ).....78

## **LISTA DE ABREVIACOES**

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ALT – Alanina transaminase

AST – Aspartato transaminase

BuChE – Butirilcolinesterase

DM – Diabetes mellitus

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

$\gamma$ -GT – Gama glutamil transferase

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH – Glutaciona reduzida

MDA – Malondialdeido

NAC – N-acetil-L-cisteina

SOD – Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	13
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	19
2.1.1 Objetivos específicos.....	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>3.1. Diabetes Mellitus</b> .....	20
3.1.1 Classificação e etiologia.....	20
3.1.2 Fisiopatologia.....	21
3.1.3 Epidemiologia.....	21
3.1.4 Diabetes mellitus experimental.....	22
<b>3.2 N-acetilcisteína</b> .....	25
3.2.1 Uso terapêutico da N-acetilcisteína .....	27
3.2.2 N-acetilcisteína na terapia do diabetes mellitus .....	29
<b>3.3 Radicais livres e espécies reativas</b> .....	31
<b>3.4 Estresse oxidativo no diabetes mellitus</b> .....	33
<b>3.5 Antioxidantes</b> .....	35
<b>3.5.1 Sistema enzimático</b> .....	36
3.5.1.1 Superóxido dismutase (SOD).....	36
3.5.1.2 Catalase (CAT).....	37
3.5.1.4 Glutathione peroxidase (GPx).....	38
<b>3.5.2 Sistema não enzimático</b> .....	39
3.5.2.1 Glutathione reduzida (GSH).....	39
<b>3.6 Biomarcadores do estresse oxidativo</b> .....	41

<b>3.7 Sistema colinérgico</b> .....	43
3.7.1 Colinesterases.....	45
3.7.2 Butirilcolinesterase .....	45
3.7.3 Butirilcolinesterase no diabetes mellitus .....	46
<b>4. MANUSCRITO</b>	
<b>Manuscrito</b> : Does N-acetylcysteine have protective effect on oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats? .....	49
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	84
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	86

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão descritos sob a forma de manuscrito, os quais se encontram no item manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final da dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura, Discussão e Conclusões desta Dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica ao qual foi submetida:

Manuscrito – Journal of Diabetes and Its Complications



## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem se observado um aumento surpreendente na prevalência de *diabetes mellitus* (DM). Em vários países, as complicações crônicas desta doença estão entre as dez principais causas de morte, inclusive no Brasil (KOPELMAN, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O DM é uma desordem metabólica de etiologia múltipla oriunda da diminuição da secreção de insulina e/ou perda da capacidade deste hormônio exercer adequadamente seus efeitos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007). O DM tem como principal característica a hiperglicemia persistente, que é responsável por um aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou de nitrogênio (ERNs) produzidas pela célula (DOMINGUEZ et al., 1998; MARITIM, et al., 2003). Diversos mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo em situação de hiperglicemia, por exemplo, auto oxidação da glicose; glicação de proteínas, bem como a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (O'DONNELL & FREEMAN, 2001).

O estresse oxidativo associado ao diabetes desenvolve complicações neurológicas, renais, micro e macrovasculares, que são a principal causa da morbidade e mortalidade na DM. Além disso, há relatos de alteração na atividade colinérgica e também nos marcadores de função renal e hepática no estado diabético (ABBOTT et al., 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2005; WEST et al., 2006).

As espécies reativas produzidas em excesso nas células exercem efeitos citotóxicos sobre fosfolípidios de membrana resultando em peroxidação lipídica, oxidação protéica e alterações na atividade de enzimas antioxidantes (ANANTHAN et al., 2003; SEVEN et al., 2004). Dentre os principais antioxidantes endógenos temos a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutational peroxidase (GPx) e a glutational reduzida (GSH), sendo que estas biomoléculas fazem a detoxificação de EROs e ERNs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Além disso, também ocorrem alterações em outros biomarcadores do estresse oxidativo tais como proteínas carbonilas (PCO) e malondialdeído (MDA) (MAXWELL, 1995; DOMINGUEZ et al., 1998; FERNÁNDEZ et al., 1999; ÇAKATAY et al., 2000).

Diante disso, terapias antioxidantes como o uso de vitaminas, fitoterápicos, aminoácidos e/ou drogas, inclusive a N-acetilcisteína (NAC), têm sido usadas no combate ao estresse oxidativo no DM. (RAO et al., 2001; ODETTI et al., 2003; MARITIM et al., 2003; AL-SHAMSI et al., 2006; BARBOSA et al., 2006). A NAC é uma droga mucolítica e precursora de L-cisteína e GSH nas células. Esta pró-droga possui a capacidade de combater radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), radicais superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), além de ser o antídoto de escolha em intoxicações por paracetamol (ARUOMA et al., 1989; TRIMARCHI et al., 2003). A NAC também foi capaz de diminuir os níveis de MDA, restaurar GSH e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes em várias doenças como AIDS, câncer, nefropatias e diabetes (KELLY, 1998; KANETO et al., 1999; COYLE et al., 2006; ODETTI et al., 2003).

No DM, a NAC isoladamente pode diminuir as concentrações de MDA, a glicemia e os níveis de hemoglobina glicada em ratos diabéticos (KANETO et al., 1999; TRIMARCHI et al., 2003). Em uma suplementação antioxidante composta por NAC, vitamina C e vitamina E, as disfunções das células beta-pancreáticas puderam ser prevenidas da toxicidade da glicose (KANETO et al., 1999). Além disso, a NAC tem a capacidade de diminuir os níveis de glicose em determinados tecidos como miócitos, restaurar a atividade da Mn-SOD nestas células e com isso atenuar a disfunção miocárdica em ratos diabéticos (FIORDALISO et al., 2004; XIA et al., 2006). Tem sido demonstrado que a NAC diminui os níveis de uréia e creatinina quando usada na nefropatia induzida por contraste em pacientes diabéticos (COYLE et al., 2006) e as concentrações de proteínas carbonílicas, inibindo o desenvolvimento de catarata em ratos diabéticos (JAIN et al., 2002). Esta droga também apresentou um efeito neuroprotetor em relação à encefalopatia diabética, atenuando o estresse oxidativo e melhorando os níveis de antioxidantes endógenos (KAMBOJ et al., 2008).

Porém, outros trabalhos demonstraram que a administração oral de NAC não interferiu na glicemia de ratos diabéticos e tampouco aumentou os níveis de GSH, sugerindo que a própria NAC combate diretamente as EROs (PIEPER & SIEBENEICH, 1998; PATRIARCA et al., 2005). Em relação à concentração de NAC que deve ser administrada para obter efeitos biológicos, pesquisas anteriores utilizaram doses variando entre 10 a 950 mg/Kg de NAC com diferentes formas de aplicação (oral e intraperitoneal). Nestes estudos verificou-se que as menores doses

apresentavam proteção contra os radicais livres enquanto as maiores doses podem causar efeitos apoptóticos (SPRONG et al, 1998; PEREIRA FILHO, 2002).

Neste contexto, é muito importante avaliar o uso da N-acetilcisteína como droga antioxidante em um modelo experimental de diabetes a fim de contribuir na terapia desta patologia principalmente no auxílio da redução dos efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo, normalmente associado ao estado hiperglicêmico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os parâmetros sanguíneos do estresse oxidativo, a atividade da enzima butirilcolinesterase e biomarcadores da função renal e hepática em ratos normais e diabéticos tratados com N-acetilcisteína.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Avaliar os níveis de glicose e hemoglobina glicada em sangue total.
- Determinar os níveis de malondialdeído no plasma.
- Avaliar a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em sangue total.
- Determinar os níveis de uréia, creatinina, alanina e aspartato transaminase, gama-glutamyl transferase e butirilcolinesterase no soro.
- Avaliar os níveis de glutathione reduzida em eritrócitos.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Diabetes Mellitus**

#### **3.1.1 Classificação e etiologia**

De acordo com o Comitê Executivo para Diagnóstico e Classificação do DM da American Diabetes Association, a classificação atual do DM toma como referência a etiologia dos distúrbios glicêmicos. A grande maioria dos pacientes diabéticos pertence a uma das duas classes etiopatogênicas: diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O diabetes tipo 1 antigamente era conhecido como diabetes mellitus insulino dependente (IDDM). Apresenta-se geralmente em crianças, adolescentes e jovens adultos, onde há uma ausência de secreção de insulina devido a uma severa ou total destruição das células  $\beta$  pancreáticas (CNOP et al., 2005). A incidência desta patologia se deve a associação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos que são considerados os principais responsáveis pela destruição das células  $\beta$  do pâncreas e, conseqüentemente, pela manifestação da doença. Também se verificou que infecções virais podem desencadear o processo auto-imune característico do DM tipo 1 (CNOP et al, 2005; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O diabetes tipo 2, que era conhecido como diabetes mellitus não-insulino dependente (NIDDM) ou diabetes senil é considerado a forma mais comum da doença, afetando aproximadamente 90% dos diabéticos. Caracteriza-se por graus variáveis de resistência tecidual à insulina e uma deficiência relativa na secreção desse hormônio pelas células  $\beta$  pancreáticas, manifestando-se geralmente em pacientes com idade superior a 40 anos e apresenta elevado componente hereditário. Somado a isso, fatores genéticos, ambientais e obesidade contribuem para o surgimento da DM tipo 2 (ARNER et al., 1991; GERICH,1998; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007). Como consequência, os pacientes desenvolvem complicações no sistema micro e macrovascular (VÉRICEL, 2004).

Outro tipo de diabetes encontrado com freqüência é o diabetes gestacional caracterizado por uma diminuição da tolerância a glicose. É diagnosticado durante a

gestação, podendo ou não persistir após o parto (GANON, 2001). Há também outros tipos específicos de diabetes, porém menos freqüentes e que podem surgir de forma secundária à destruição das células  $\beta$  do pâncreas como defeitos genéticos das ilhotas e na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções e efeito colateral de medicamentos e produtos químicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

### **3.1.2 Fisiopatologia**

A maioria dos pacientes com DM manifesta uma série de distúrbios a curto-prazo como glicosúria, polifagia, polidipsia, poliúria e perda de peso, sendo considerados sintomas clássicos na população diabética. Porém, a ausência dos mesmos é comum em muitos pacientes e não descarta a possibilidade de que exista um grau de hiperglicemia suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas antes que o diagnóstico seja estabelecido (ATKINSON & EISENBARTH, 2001).

O DM a longo prazo desenvolve complicações micro e macrovasculares, que são a principal causa da morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos. As complicações crônicas compreendem a nefropatia com possível evolução para insuficiência renal, retinopatia com possibilidade de cegueira e neuropatia periférica, com risco de úlceras nos membros inferiores e até amputações (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

### **3.1.3 Epidemiologia**

A Organização Mundial de Saúde estima que existam mais de 177 milhões de pessoas com diabetes no mundo, e para o ano de 2030, as projeções podem alcançar os 366 milhões (WILD, 2004). No Brasil, existem aproximadamente 11 milhões de diabéticos compreendendo cerca de 5,9% da população total, do qual 10% delas são portadoras de diabetes do tipo 1 (FRANCO et al., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Tal fenômeno epidemiológico se deve à associação entre fatores genéticos (pouco conhecidos), fatores comportamentais (sedentarismo e mudança do hábito alimentar), envelhecimento progressivo da população e um aumento

alarmante da obesidade (O'RAHILLY, 2005; PEREIRA et al., 2005; SCHWARTZ & PORTE, 2005).

Apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar as conseqüências letais desta patologia (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH; 1993; NORTHAM et al., 2006). As conseqüências humanas, sociais e econômicas são devastadoras: 4 milhões de mortes por ano relativas ao diabetes e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial. No Brasil, é a sexta causa mais freqüente de internação hospitalar e representa aproximadamente 40% dos pacientes que internam em Unidades Coronarianas Intensivas e 46% dos pacientes que ingressam em tratamento de diálise. Esta síndrome é capaz de aumentar significativamente o acidente vascular cerebral e hipertensão arterial. Além disso, o DM é considerado a principal causa de amputações de membros inferiores e de cegueira adquirida devido a problemas de microvascularização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006)

### **3.1.4 Diabetes mellitus experimental**

Os agentes diabetogênicos como o aloxano e estreptozotocina tem sido utilizados em estudos experimentais para indução ao diabetes mellitus, pois estas drogas têm a capacidade de reproduzirem em animais de laboratório o quadro de alterações metabólicas e sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem na doença naturalmente adquirida (MENDES & RAMOS, 1994). Ambos xenobióticos caracterizam-se por seu efeito tóxico seletivo às células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas (MORDES & ROSSINI, 1981; SZKUDELSKI, 2001).

O aloxano (2,4,5,6-tetraxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) é uma substância hidrofílica e instável, onde sua meia vida em pH neutro a 37°C é de aproximadamente 2 minutos, mas ocorre um aumento da estabilidade em baixas temperaturas (figura 1) (LENZEN & MUNDAY, 1991). Foi inicialmente descrita por Brugnatelli em 1818, mas Wöhler e Liebig usaram o nome "aloxano" e sua síntese através da oxidação do ácido úrico. Suas propriedades diabetogênicas foram reportadas por Dunn, Sheehan e McLethie em 1943 ao administrar esta droga em coelhos e observaram uma necrose específica das ilhotas pancreáticas. Desde então, o aloxano tem sido utilizado como indutor do DM tipo 1 em modelos animais,

pois apesar de sua instabilidade, o tempo de decomposição do aloxano é o suficiente para afetar o pâncreas e promover seus efeitos deletérios (LENZEN & MUNDAY, 1991).

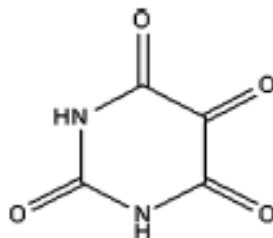


Figura 1. Estrutura química do aloxano. Adaptado de SZKUDELSKI (2001).

O aloxano exerce suas ações diabetogênicas quando administrado de forma parenteral: intravenosa, intraperitoneal e subcutânea. A dose de aloxano requerida para indução ao DM depende da espécie de animal, forma de administração e status nutricional. Já foi verificado que humanos apresentam ilhotas de Langerhans mais resistentes ao aloxano quando comparadas as de ratos e camundongos (EIZIRIK et al., 1994). A concentração desta droga quando aplicada de forma intraperitoneal deve ser a partir de 150 mg/kg, pois abaixo deste valor há possibilidade de não ocorrer à instalação do diabetes (KATSUMATA et al., 1992).

O mecanismo de ação do aloxano é através da repentina elevação na secreção de insulina na presença ou ausência de glicose. Este fenômeno acontece após a aplicação do aloxano e não foi observada ação diabetogênica depois de repetidas aplicações da droga sobre as células  $\beta$  pancreáticas (WEAVER et al., 1978). O aloxano atua sobre as células  $\beta$  do pâncreas, induzindo a liberação maciça de insulina com posterior supressão das ilhotas de Langerhans ao responder a um estímulo externo da glicose.

Outro aspecto importante é a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da redução do aloxano com posterior formação do ácido dialúrico (HEIKKILA et al., 1982; LENZEN & MUNDAY, 1991). A reação entre aloxano e ácido dialúrico é um processo do qual forma um radical aloxano intermediário ( $HA\cdot$ ) e um composto sem identificação chamado “composto 305”, devido a sua máxima absorção espectrofotométrica ocorrer no comprimento de onda 305 nm. Este agente diabetogênico também reage com dois grupamentos  $-SH$  no sítio de ligação da glicose na enzima glicoquinase, resultando na formação de ligações dissulfeto e inativação da glicoquinase (LENZEN & MIRZAIIE-PETRI, 1991). Também ocorre a

ação de radicais superóxidos ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) que são capazes de liberar íons férrico da ferritina e reduzi-los a íons ferroso, processo do qual pode ocorrer também através de radicais aloxano. Um dos alvos das EROs é o DNA das ilhotas pancreáticas que leva a destruição das membranas celulares e indução de quebra no DNA (SAKURAI & OGISO, 1995). Outro importante passo da ação diabetogênica do aloxano são os distúrbios na homeostase intracelular do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), onde foi demonstrado que esta droga eleva a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico nas células  $\beta$  do pâncreas, despolarizando as ilhotas de Langerhans (PARK et al., 1995).

Desta maneira, a ação tóxica do aloxano sobre as células  $\beta$  do pâncreas envolve diferentes processos, como a oxidação de grupamentos  $-\text{SH}$ , inibição da glicoquinase, geração de radicais livres e distúrbios na homeostase intracelular de cálcio, sendo as últimas duas causas as principais responsáveis pela liberação supra fisiológica de insulina e consequente desgaste das ilhotas de Langerhans (KLIBER et al., 1996; SZKUDELSKI, 2001, LENZEN, 2008). A figura 1 descrita por SZKUDELSKI, 2001 demonstra como ocorre o mecanismo de ação do aloxano nas células  $\beta$  do pâncreas:

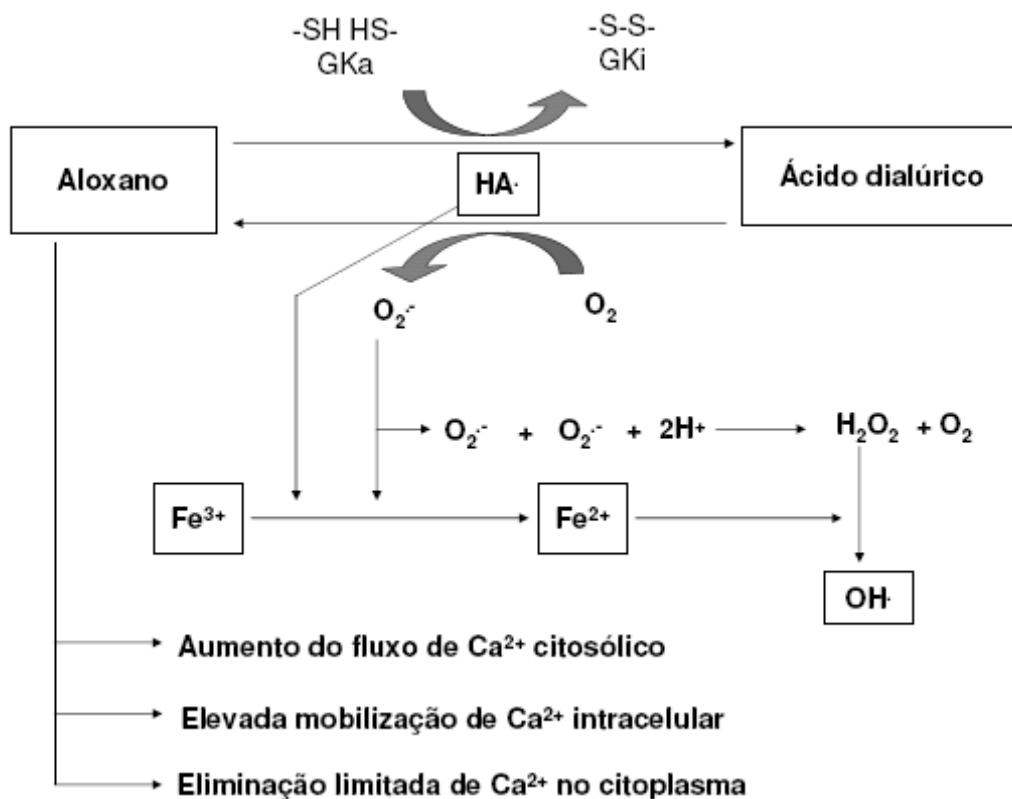


Figura 2. Mecanismo de ação do aloxano. Adaptado de SZKUDELSKI (2001).



Os ratos diabéticos induzidos com aloxano apresentam sintomas idênticos aos pacientes diabéticos, pois os animais desenvolvem danos no sistema ocular, renal, cardíaco, vascular e nervoso, constituindo assim um importante modelo para o estudo de complicações agudas e crônicas do DM (BIESSEL, 2005).

### **3.2 N-acetilcisteína**

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto com um grupamento sulfidrílico (-SH) que tem sido usado a mais de 30 anos como agente mucolítico, mas também atua como pró-droga de cisteína. Devido a sua atividade protetora do fígado, as administrações intravenosa e oral deste medicamento têm sido usadas em casos de intoxicações por acetaminofeno (paracetamol) (GREGORY & KELLY, 1998). A NAC é uma doadora de grupo sulfidrílico facilmente transportado para o interior das células, onde é deacilada e aumenta o pool de tióis, primariamente, a concentração de glutathione reduzida (OGA, 2003).

A NAC é um composto tiólico com fórmula química  $C_5H_9NO_3S$  e peso molecular de 163,2 conforme verificado na figura 2. É uma substância que pode ser administrada por via oral, intravenosa e tópica (ATKURI et al., 2007). A absorção oral apresenta um metabolismo de primeira passagem extenso pelas células do intestino delgado e no fígado que resultam na incorporação desta droga em cadeias protéicas e na formação de uma variedade de metabólitos da NAC (De CARO et al., 1989).

O grupamento sulfidrílico é responsável por grande parte da atividade metabólica da NAC, enquanto o grupo acetil garante maior estabilidade à molécula contra a oxidação. Também foi verificado que o grupo amida garante uma maior solubilidade em água e menor toxicidade da NAC se comparada ao aminoácido cisteína, além de permitir a preservação da droga no fluido gástrico, pois a maioria dos compostos sulfidrílicos apresentam alta instabilidade nestas condições (BONANOMI & GAZZANIGA, 1980).

Após ingestão da droga, o pico de concentração plasmática aparece em menos de 1 hora, do qual se estima que o tempo de meia vida da NAC livre na circulação seja em torno de 2 horas, sendo possível a detecção da droga até 12 horas pós-administração (De CARO et al., 1989). Cerca de 16% de NAC é oxidada

ao passar pelo trato gastrointestinal, enquanto outros compostos sulfidrílicos apresentam perdas entre 75 e até 100% (BONANOMI & GAZZANIGA, 1980). Porém, esta molécula fica intacta em torno de 4 a 10%, provavelmente devido a ligação dissulfito com as proteínas e desacetilação desta substância na mucosa e lúmen intestinal, que são os maiores fatores na baixa biodisponibilidade oral da NAC (BORGSTROM et al., 1986; SJODIN et al., 1989). Já foi verificado que a administração oral e intravenosa de NAC aumenta o pool de tióis no plasma humano. Isto se deve a facilidade de transporte da NAC para o interior das células, onde é deacilada e converte-se em cisteína. Consequentemente ocorre um aumento do pool de tióis na circulação, entre eles a glutathiona reduzida e também em outros compostos, os quais a cisteína e o sulfito inorgânico são os metabólitos mais abundantes (De CARO et al., 1989; OGA, 2003).

Diante das complicações ocasionadas pelo metabolismo de primeira passagem ocorrida pela administração oral, a via intravenosa se faz necessária em certas situações como em intoxicações agudas por paracetamol ou desobstrução das vias aéreas em crises asmáticas agudas (OGA, 2003; OLIVEIRA et al., 2002). Esta via de aplicação permite um rápido aumento transitório de NAC no plasma a altos níveis, com posterior decréscimo após aplicação. Porém, desta forma o fármaco pode causar alguns efeitos adversos, como reações anafiláticas, urticária, vômitos e até hipotensão (ATKURI et al., 2007).

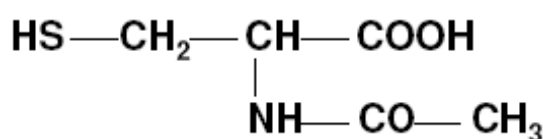


Figura 3. Estrutura química da N-acetilcisteína (<http://www.benbest.com/nutrceut/NAC.jpg>)

A NAC é considerada uma pró-droga, fornecedora de grupamento -SH, servindo como fonte para restaurar os níveis de cisteína e GSH. Isto ocorre devido a sua habilidade em reduzir a cistina extracelular em cisteína e/ou por ser uma fonte de grupos -SH, estimulando o sistema glutathiona e suas enzimas, principalmente a glutathiona-S-transferase para síntese da glutathiona reduzida (GSH) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ISSELS et al., 1988; De VRIES & FLORA, 1993).

A NAC também tem atividade direta contra radicais livres como o ácido hipocloroso, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio devido ao grupo sulfidrílico

presente em sua estrutura química (ARUOMA et al., 1989). Porém, já foi verificado que a atividade de enzimas antioxidantes endógenas como a SOD, catalase e GPx apresentam uma maior capacidade de varredura de radicais livres se comparado a ação direta de NAC (BONANOMI & GAZZANIGA, 1980; ATKURI et al., 2007).

Embora a NAC não afete a concentração de citocromo P-450 microsossomais de fígado e pulmões, ela estimula as atividades das enzimas citosólicas envolvidas na redução de NADP (glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase), na redução da glutatona (GSSG-redutase), na desintoxicação reductiva de xenobióticos e também é capaz de aumentar a guanosina cíclica monofosfato (DEVLIN et al., 1997; GREGORY & KELLY, 1998). Além disso, a NAC reduz a ativação do fator transcripcional nuclear-kB (NF-kB) por bloqueio das moléculas de adesão vascular (V-CAM 1) das células endoteliais regulando a atividade de expressão de vários genes (ARUOMA et al., 1989; WARDLE, 2005). Somando-se a isso, esta droga promove o decréscimo da produção de citocinas e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) com a diminuição do estresse oxidativo e/ou aumento da SOD (DEVLIN et al., 1997; KIM et al., 2000; CHEN et al., 2007).

### **3.2.1 Uso terapêutico da N-acetilcisteína**

A N-acetilcisteína tem sido usada como agente mucolítico e em casos de intoxicações agudas por acetaminofeno (GREGORY & KELLY, 1998; OGA, 2003). Porém, vários estudos demonstram que esta droga pode ser utilizada para outras aplicações clínicas, como a sua utilização em pacientes com doenças pulmonares, HIV, câncer, problemas cardiovasculares, nefropatia induzida por contraste, hemodialisados e intoxicações por metais pesados (GREGORY & KELLY, 1998; ATKURI et al., 2007; KELLY et al., 2008).

A NAC é um medicamento de ampla utilidade clínica, conhecido por sua ação mucolítica ao quebrar as ligações peptídicas das proteínas que constituem o muco, fazendo com que ele seja menos viscoso e assim mais facilmente eliminado das vias áreas. Esta droga também estimula a produção do fator surfactante dos pneumócitos tipo II, auxiliando na respiração do indivíduo (GREGORY & KELLY, 1998). Além disso, a NAC apresenta efeito protetivo sobre os pulmões, pois é capaz de aumentar as concentrações de GSH nos granulócitos pulmonares (LAURENT et

al., 1996). No tratamento do HIV, o uso da NAC permitiu um aumento dos níveis de GSH nos eritrócitos e linfócitos desses pacientes, além de elevar a capacidade de defesa das células T contra agentes virais (SPADA et al., 2002).

No tratamento do câncer, a NAC ainda se apresenta em fase preliminar. Foi demonstrado que esta droga é capaz de bloquear danos deletérios no DNA, pois apresenta atividade antimutagênica direta e também atua de forma indireta ao combater as EROs. Outro fato é que a NAC pode diminuir a incidência de câncer intestinal, inibir a angiogênese, além de reduzir a carcinogênese causada pelo fumo. Também promove a indução da apoptose seletiva de células com transformações, interferindo no ciclo da célula e tem efeitos antiinvasivos e antimetastáticos (De FLORA et al., 1986).

Em relação a problemas cardiovasculares, a NAC parece ter impactos positivos sobre complicações dessa natureza. Além de afetar positivamente as lipoproteínas séricas (diminuição do colesterol total e LDL), também é capaz de diminuir as concentrações de homocisteína, um fator de risco ao infarto agudo do miocárdio, e ainda garante proteção contra a isquemia e reperfusão (GREGORY & KELLY, 1998; GIORNO et al., 2006).

A NAC demonstrou redução da disfunção endotelial, inflamação, fibrose e diminuir a lesão provocada pelo tempo de isquemia do enxerto e os níveis de MDA em pacientes renais crônicos, com apresentação de melhora clínica considerável (MASSY & N-GUVEN, 2002; VAZIRI et al., 2002). Outra consequência é a capacidade desta droga em diminuir a nefropatia induzida por contraste, com diminuição acentuada dos valores de creatinina sérica e albuminúria (COYLE et al., 2006; LEVIN et al., 2006). Entretanto, há estudos que indicam que esta substância não possui atividade biológica sobre pacientes com doença renal crônica, pois não houve mudanças significativas sobre outros parâmetros renais, como uréia e cistatina C (MAINRA et al., 2007; LOGNARD et al., 2008).

Em relação às intoxicações por metais pesados, a NAC apresenta resultados positivos na terapia contra esses agentes. Isto se deve ao seu grupamento sulfidrílico, ao qual se liga aos metais pesados promovendo complexos, evitando que estes xenobióticos se acumulem no organismo e atuem diretamente nos sistemas celulares causando danos oxidativos (BENITE et al., 2007). Em nível de comparação, a capacidade de quelação da NAC apresentou uma efetividade maior em ligar-se aos metais pesados do que EDTA. Além disso, chumbo e mercúrio

complexados com NAC obtiveram um aumento da excreção urinária desses xenobióticos e, conseqüentemente, diminuição da concentração destes agentes tóxicos na circulação e tecidos (BANNER et al., 1986; ROONEY, 2007).

Porém, há estudos que demonstram que a autooxidação dos grupos sulfidrílicos podem aumentar a produção de radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MUNDAY, 1989). Diante disso, verificou-se que a cisteína é o único aminoácido que sofre oxidação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) (BARREIROS et al., 2006). Os estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a NAC na presença de metais de transição como o  $Fe^{3+}$  na presença de superóxido ( $O_2^-$ ), sofre uma redução catalítica para  $Fe^{2+}$ . O íon ferroso na presença de  $H_2O_2$  sofre uma oxidação e isto favorece a geração de radicais hidroxila e assim apresentando efeitos pró-oxidantes. Este processo biológico é conhecido como Reação de Fenton (figura 3), do qual é processado em dois tempos e requer íons ferro. (SPRONG et al., 1998; SAGRISTÁ et al., 2002).

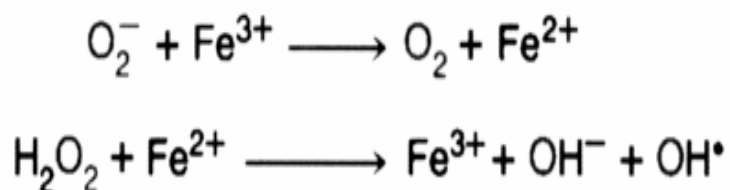


Figura 4. Reação de Fenton (<http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Radicaislivres.htm>)

Outro fato considerável é a capacidade da NAC em aumentar os níveis de metemoglobina, além de potencializar agentes metemoglobinizantes como anilina e dapsona. Isto se deve a capacidade desta droga em regenerar a N-hidroxilamina enquanto promove a regeneração da GSH, pois a N-hidroxilamina promove a oxidação da oxiemoglobina, e este ciclo só termina quando a GSH eritrocitária estiver quase depletada. Enquanto houver doação de grupos sulfidrílicos oriundos da NAC, a formação de metemoglobina continua em andamento nos eritrócitos (MORAES et al., 2008). Recentes observações de possíveis mudanças estruturais provocados pela NAC no DNA sugerem cuidado no uso clínico e instiga maiores investigações em termos de toxicidade (ZAFARULLAH et al., 2003).

### 3.2.2 N-acetilcisteína na terapia do diabetes mellitus

O diabetes mellitus é uma doença que apresenta complicações decorrentes do aumento do estresse oxidativo. O uso da NAC nesta patologia já foi descrita na literatura em humanos (LAZÁROVÁ et al., 2004) e animais (PIEPER & SIEBENEICH, 1998; KANETO et al., 1999; HABER et al., 2003; ODETTI et al., 2003; ROCHA et al., 2005; GUO et al., 2007) como uma alternativa de terapia antioxidante.

A maioria dos estudos relacionados à terapia com NAC propõe a diminuição da hiperglicemia e conseqüentemente do estresse oxidativo. Pesquisas anteriores demonstraram efeitos positivos sobre a glicemia e também nos níveis dos biomarcadores do estresse oxidativo em experimentos com animais (KANETO et al., 1999; HABER et al., 2003; ODETTI et al., 2003; GUO et al., 2007). Entretanto, a diminuição da hiperglicemia e hemoglobina glicada desta doença após tratamento com NAC não significa que houve reais efeitos positivos sobre o organismo nestas condições (KANETO et al., 1999; ODETTI et al., 2003).

Contudo, a terapia com NAC demonstrou diminuição dos valores de MDA, proteínas carbonilas, 4-hidroxinonenal em ratos (ODETTI et al., 2003; HABER et al., 2003). Esta droga também foi capaz de atuar sobre as AGEs e produtos de oxidação protéica avançados (AOPPs), diminuindo a acumulação destes metabólitos e conseqüentemente os danos deletérios ao organismo diabético (ODETTI et al., 2003; LAZÁROVÁ et al., 2004).

A queda dos valores de determinados biomarcadores do estresse oxidativo deve-se também a um aumento das defesas antioxidantes endógenas (enzimas antioxidantes e GSH) após tratamento com NAC é muito bem descrito por vários autores (KANETO et al., 1999; GUO et al., 2007; KAMBOJ et al., 2008). Porém, há autores que relatam que a NAC não aumenta a síntese de GSH em diabéticos, mas verificou-se que os efeitos benéficos desta pró-droga deve-se a sua capacidade de varredura de radicais livres, ou seja, ação direta desta droga contra as EROs (URATA et al., 1996; PATRIARCA et al., 2005).

Outro fato referente à NAC é sua atividade antiinflamatória, pois estudos indicam que esta droga suprime a produção de citocinas inflamatórias, o fator tumoral nuclear-alfa (TNF-alfa), o fator transcripcional nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e o sistema PAI-1 em modelos animais baseado na resposta biológica, do qual ocorre um aumento das enzimas antioxidantes, dos níveis de GSH e a diminuição da

glicemia (HO et al., 1999; KIM et al., 2000; LIN et al, 2005; GUO et al., 2007; CHEN et al., 2007).

### 3.3 Radicais livres e espécies reativas

Os radicais livres (RLs) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (GILLHAN et al., 1997).

Dentre os oxidantes mais importantes envolvidos em processos patológicos estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as de nitrogênio (ERNs). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroxila ( $\cdot\text{OH}^-$ ) peroxila ( $\cdot\text{ROO}^-$ ) e alcoxila ( $\cdot\text{RO}^-$ ); e as não-radicalares: oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^-$ ), o óxido nitroso e o peroxinitrito ( $\text{HNOO}^-$ ), dentre outros (GILLHAM et al., 1997; SIES, 1997). A maioria destes compostos apresenta tempo de vida médio muito curto, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Espécies reativas de oxigênio e suas meias-vidas, em segundos. Adaptado de JORDÃO JR. et al (1998).

<i>Espécie Reativa de Oxigênio</i>		<i>Meia-vida (segundos)</i>
$\text{HO}^-$	Radical Hidroxila	$10^{-9}$
$\text{HOO}^-$	Radical Hidroperoxila	$10^{-8}$
$\text{RO}^-$	Radical Alcoxila	$10^{-6}$
$\text{ROO}^-$	Radical Peroxila	7
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito	0,05 – 1
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio	Variável
$\text{O}_2^-$	Radical Superóxido	Variável
$^1\text{O}^2$	Oxigênio Singleto	$10^{-5}$
$\text{NO}$	Radical Oxido Nítrico	1 – 10
$\text{HOCl}$	Ácido Hipocloroso	Estável

Obs: R é um lipídio, por exemplo, o linoleato.

As espécies reativas podem ser formadas no organismo de diversos modos. Durante a fosforilação oxidativa, mecanismo usado pelas células para produzir energia química (ATP), parte dos elétrons é transferida para o oxigênio, dando origem ao radical ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) (JUNQUEIRA & RAMOS, 2005). Na tabela 2 é demonstrado a formação das principais EROs existentes no organismo a partir do oxigênio molecular. Eles podem ainda ser produzidos durante a oxidação de ácidos graxos, reações do citocromo  $\text{P}_{450}$  e de células fagocíticas, entre outros. Algumas enzimas também são capazes de gerar EROs, sob condições normais ou patológicas. Fontes exógenas como tabaco, radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos, dentre outros, também geram EROs (BIESALSKI, 2002).

Em condições fisiológicas normais, as EROs podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (HALLIWELL, 1994; BIESALSKI, 2002). No entanto, o aumento na sua produção e/ou a redução na sua eliminação gera um desequilíbrio fisiológico, caracterizando o estresse oxidativo (FINKEL e HOLBROOK, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; JUNQUEIRA & RAMOS, 2005).

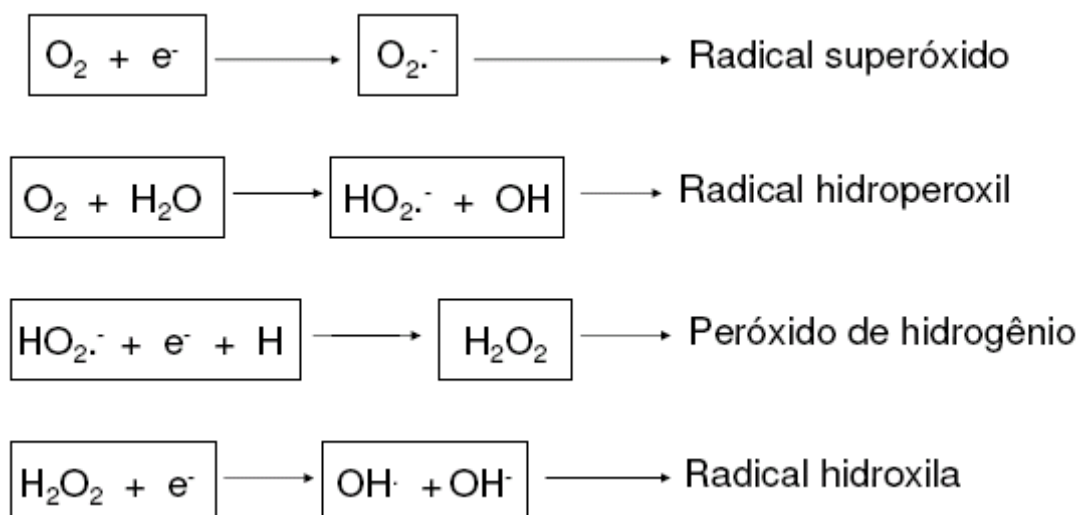


Figura 5. Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons. (<http://biobioradicaais.blogspot.com/2008/11/produo-de-radicaais-livres.html>).



### 3.4 Estresse oxidativo no diabetes mellitus

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes no organismo, causado pela excessiva produção de oxidantes ou depleção dos níveis de antioxidantes (MORENA et al., 2002; MCGRATH et al., 1995). O somatório de danos oxidativos relacionados ao desequilíbrio do sistema antioxidante pode levar a diversos danos celulares, desencadeando alterações progressivas em proteínas, lipídios, açúcares e DNA reduzindo a capacidade funcional e aumentando os riscos de doenças (BERR, 1998; FINKEL e HOLBROOK, 2000).

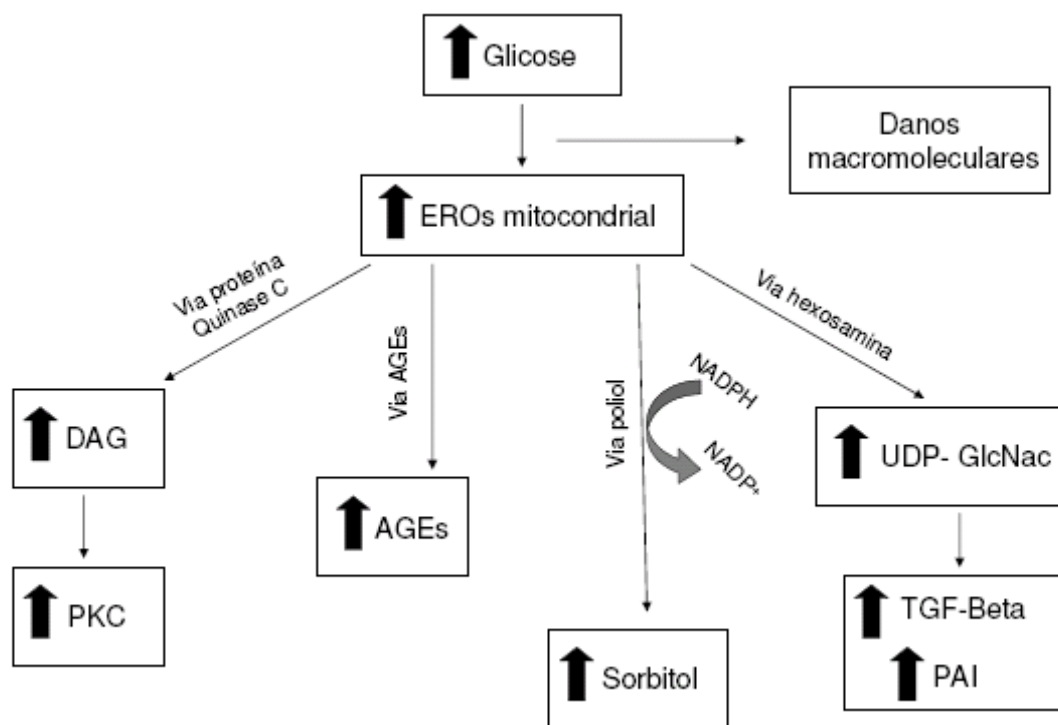
A hiperglicemia persistente promove um aumento da formação de radicais livres, principalmente EROs. Somando-se a isso, há a diminuição das defesas antioxidantes que leva a um desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes em nível celular. A existência desta situação, denominada estresse oxidativo, foi sugerida a partir do acúmulo de lesões oxidativas na estrutura e na função da mitocôndria, sendo considerado uma chave mediadora no desenvolvimento e progressão do diabetes mellitus (ALMADA FILHO, 2002; MARITIM et al., 2003; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2005).

O estresse oxidativo no DM está associado a mudanças celulares em curtos períodos de hiperglicemia em casos agudos, causando mudanças no metabolismo celular. Entretanto, a exposição às altas taxas de glicose sanguínea promove alterações cumulativas ao longo da existência em macromoléculas. Existem quatro vias metabólicas chaves que através do estresse oxidativo são os maiores contribuintes para o dano celular causado por esta endocrinopatia: 1) aumento do fluxo de polióis; 2) aumento da formação de produtos de glicação avançada (AGEs); 3) ativação de isoformas da proteína C quinase (PKC); 4) aumento do fluxo de hexaminase (BROWNLEE, 2001; ROBERTSON, 2004; ROLO e PALMEIRA, 2006).

A hiperglicemia permite a conversão de glicose em sorbitol pela via de polióis juntamente com diminuição do NADPH e GSH. Posteriormente, o sorbitol é metabolizado a frutose pela sorbitol desidrogenase e dessa forma aumenta a razão NADH/NAD<sup>+</sup>. O aumento do diacilglicerol (DAG) ativa a proteína C quinase, responsável por várias patologias derivadas das complicações do DM (BROWNLEE, 2001). Este excesso de glicose circulante pode reagir com um grupo amino (-NH<sub>2</sub>) livre para formar a base de Schiff, uma molécula rápida e reversível que origina o

produto de Amadori. Esta estrutura tende a se acumular em proteínas, iniciando o processo de glicação avançada (AGEs) (BROWNLEE, 2001).

A via de biossíntese da hexosamina é uma via adicional do metabolismo da glicose que pode mediar algum dos efeitos tóxicos da glicose (BROWNLEE, 2001). Em condições metabólicas normais, 2-5% da glicose entra nas células através da via hexosamina com a conversão da frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato graças à enzima frutose-6-fosfato amidotransferase (JAMES et al., 2002). O produto final desta via, UDP-N-acetilglicosamina, é o substrato para a glicosilação dos importantes fatores intracelulares incluindo fatores de transcrição, afetando a expressão de muitos genes inclusive inibidores da ativação de plasminogênio-1 (PAI-1) e a geração de complicações microvasculares da DM conforme é demonstrado os passos da indução de EROs na figura 5 (GOLDBERG, et al., 2002).



**GlcNac** = N-acetilglicosamina; **PAI** = inibidor da ativação de plasminogênio; **TGF-β**= fator de crescimento e transformação-Beta

Figura 6. Hiperglicemia induz geração de EROs e conseqüentemente ativação das principais vias patológicas ( \_\_\_\_ papel direto; ----- papel indireto). Adaptado de ROLO & PALMEIRA (2006)

A hiperglicemia promove o aumento das EROs concomitantemente com a elevação do potencial da membrana mitocondrial. Esse processo leva a uma

diminuição do estado de fosforilação do receptor de insulina e conseqüentemente há uma queda da sensibilidade do receptor de insulina (LIN et al., 2005). Outro aspecto evidenciado no DM é que o aumento das EROs promove uma resposta dos fatores de inflamação e da produção de citocinas através da indução transcricional dos fatores pró-inflamatórios (LIN et al., 2005; GUO et al., 2007).

Deste modo, o estresse oxidativo sistêmico encontra-se intimamente relacionado ao progresso do diabetes, onde o envolvimento das EROs tem um papel fundamental no desenvolvimento das patologias micro e macrovasculares decorrentes desta doença nos casos crônicos como demonstrado na figura 6 (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993; PACHER & SZABO, 2005).

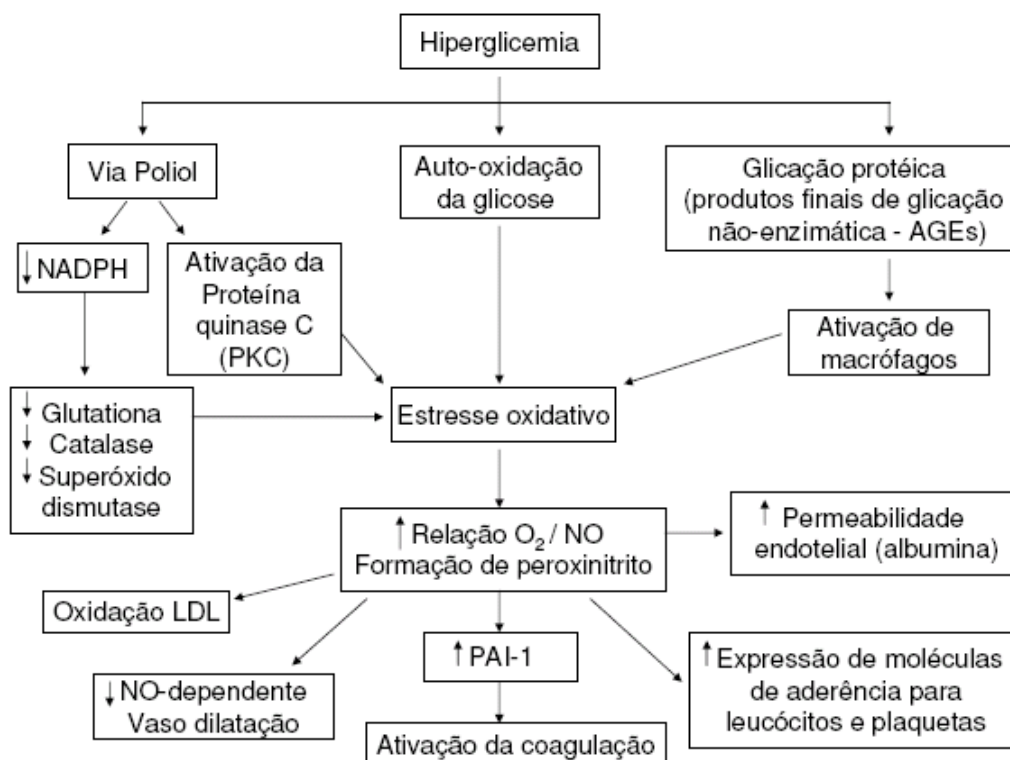


Figura 7. A hiperglicemia persistente e seus efeitos fisiológicos. ([http://3.bp.blogspot.com/\\_XHLtDw9I4gA/Sk9Tpt\\_BVI/AAAAAAAAAXc/3wkKHYxRz8g/s400.gif](http://3.bp.blogspot.com/_XHLtDw9I4gA/Sk9Tpt_BVI/AAAAAAAAAXc/3wkKHYxRz8g/s400.gif))

### 3.5 Antioxidantes

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Dessa forma, os antioxidantes podem, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação (JORDÃO JR. et al., 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; BARREIROS et al., 2006).

Para a proteção dos danos deletérios causados pelo estresse oxidativo, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa contra radicais livres. Para uma melhor distinção entre os vários tipos de antioxidantes, essas biomoléculas são classificadas conforme a sua estrutura em enzimáticos e não-enzimáticos (URSO & CLARKSON, 2003).

### **3.5.1 Sistema Enzimático**

O sistema enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a glutathione peroxidase (GPx); catalase (CAT); e superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; BELLÓ, 2002). Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui as EROs e, conseqüentemente a oxidação de estruturas biológicas.

#### **3.5.1.1 Superóxido dismutase (SOD)**

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas abundantes em células aeróbias e é das mais importantes enzimas antioxidantes. Por ser o primeiro grupo enzimático no combate aos radicais livres, cabe a ela a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio (figura 7). O  $H_2O_2$  é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como catalase ou glutathione peroxidase, do qual é uma reação normal em pH fisiológico, porém muito acelerada na presença dessa enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Esta enzima pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado à mesma: cobre e zinco no citoplasma dos eucariontes, manganês na matriz mitocondrial e ferro em bactérias (FRIDOVICH, 1998). O papel benéfico e protetor da SOD vem sendo demonstrado numa variedade de patologias tanto clínicas quanto pré-clínicas (MAXWELL, 1995).

A literatura referente sobre as atividades das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx no diabetes mellitus, apresenta contradições. A atividade da SOD na DM já foi relatada diminuída (KESAVULU et al., 2000; RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007), inalterada (TELICI et al., 2000) e até aumentada (MARTÍN-GALLÁN et al., 2003). Tem sido sugerido que a atividade de SOD decresce conforme a evolução da DM, sendo que no início da doença esta enzima apresenta-se elevada e que seus níveis diminuem gradativamente conforme o progresso da DM devido a uma glicação não-enzimática que predomina sobre a SOD (ARAI et al., 1987; DOMINGUEZ et al., 1998).

### **3.5.1.2 Catalase (CAT)**

A catalase é uma ferrihemoenzima cujo sítio ativo contém um grupo heme, do qual sua função principal é dismutar peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular (figura 7) (FRIDOVICH, 1998). Em animais, a catalase está presente em todos os órgãos vitais do corpo, principalmente no fígado, o qual possui uma concentração de peróxido de hidrogênio ligeiramente baixa (INOUE, 1994).

Sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro, que possuem poucos peroxissomas. Nestes órgãos a ação antioxidante desta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a corrente sanguínea, através da catalase eritrocitária.

Seguindo esta linha de raciocínio, a atividade de catalase pode apresentar-se diminuída (SELVAM & ANURADHA; 1988; RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007), inalterada (POONAM et al., 1997) e aumentada (KESAVULU et al., 2000). A diminuição da catalase sugere um acréscimo de peróxido de hidrogênio, e geralmente ocorre em um estado de diabetes mais avançado (RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007). Os níveis de catalase podem ser inalterados ou maiores no estado diabético, mas alguns autores indicam que o aumento de peróxido de

hidrogênio é o responsável por esta maior atividade da enzima na tentativa de diminuir os danos oxidativos causados por esta ERO (KESAVULU et al., 2000).

### **3.5.1.3 Glutationa peroxidase (GPx)**

A glutaciona peroxidase (GPx) é uma selenoenzima (utiliza selênio como co-fator), cuja ação é baseada na oxidação da glutiona (GSH), ao dissulfeto correspondente (GSSH) (figura 7) (FRIDOVICH, 1998). Também é capaz de desintoxicação do  $H_2O_2$ , localizada no citoplasma e na matriz mitocondrial. Sua ação ocorre através da redução do  $H_2O_2$  e de hidropeptídeos orgânicos através da utilização da glutaciona reduzida (GSH), um tripeptídeo composto de ácido  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina.

Assim a GSH atua como um co-substrato, de maneira que doa dois hidrogênios dos seus grupamentos sulfidrilas para os peróxidos, transformando-os em álcool e água. A glutaciona oxidada ou dissulfeto (GSSG) formada é regenerada para GSH através da glutaciona redutase (GR) com transferência de elétron do NADPH. A atividade da GPx pode ser promovida pela suplementação dietética com selênio (MAXWELL, 1995) e seus principais locais de ação são fígado e eritrócitos, podendo ocorrer também no coração, pulmões e músculos.

Da mesma maneira que as outras enzimas antioxidantes citadas, a atividade da GPx apresenta valores diminuídos (RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007; KAMBOJ et al., 2008), inalterados (FAURE et al, 1995) e aumentados (NDAHIMANA et al, 1996). A diminuição da GPx ocorre devido a um aumento de peróxido de hidrogênio decorrente de um estado de diabetes mais avançado. Na tentativa de desintoxicação do peróxido de hidrogênio, há o decréscimo da enzima e uma das conseqüências deste decréscimo é a baixa concentração de GSH, pois esta enzima está relacionada com a regeneração da GSH (RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007; KAMBOJ et al., 2008). Os valores inalterados e aumentados de GPx apresentam as mesmas justificativas encontradas pelas demais enzimas antioxidantes.

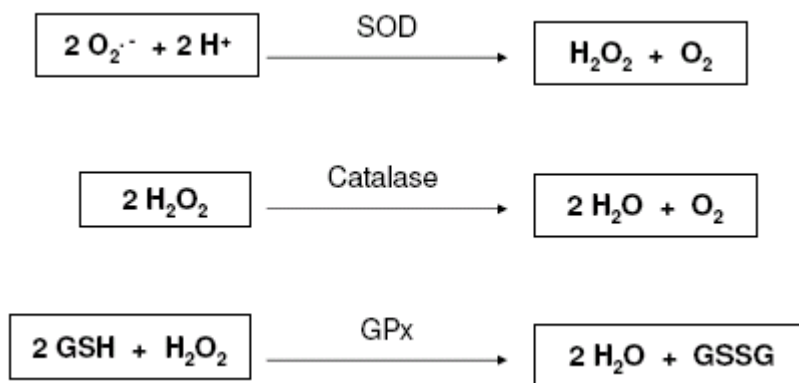


Figura 8. Enzimas antioxidantes. Adaptado de VASCONCELOS et al (2007)

### 3.5.2 Sistema Não Enzimático

Compreende os antioxidantes hidrofílicos (GSH, vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina E e carotenóides). A GSH é o principal antioxidante não-enzimático endógeno e pode ser encontrada em vários tecidos biológicos, sendo que no sangue, 99,5% da GSH é intra-eritrocitária. Sua função antioxidante se dá pela capacidade de ser um doador imediato de elétrons para neutralizar  $\text{H}_2\text{O}_2$  e lipoperóxidos, e também pela capacidade de seqüestrar EROs e ERNs (NOZAL et al., 1997; HALLIWELL & GUTERIDGE, 2000).

#### 3.5.2.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona é um tripeptídeo, L- $\gamma$ -glutamil-L-cistenil-glicina. Além de ser o principal tiol não-protéico intracelular livre, encontrado em vários tecidos biológicos e é considerado o principal antioxidante endógeno (NOZAL et al., 1997). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento  $-\text{SH}$ , presente em sua molécula (figura 8).

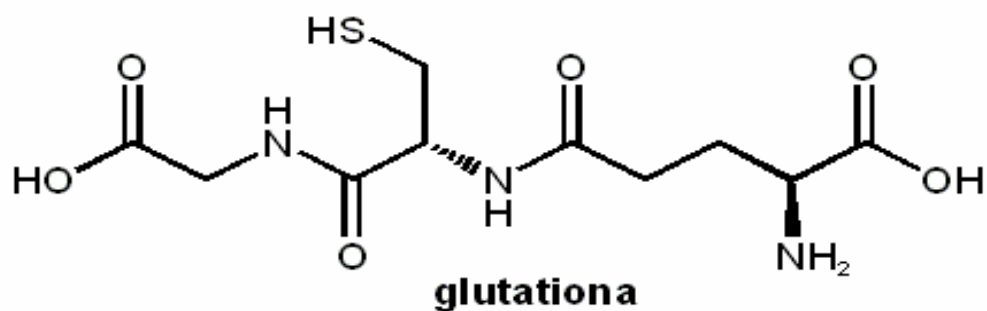


Figura 9. Estrutura química da glutathiona reduzida (GSH) (<http://quiprona.files.wordpress.com/2009/07/antioxidantes.png>)

Dentre outras funções fisiológicas, ela é seqüestradora de radicais livres (NOZAL et al., 1997), detoxificando metabólitos eletrofílicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o  $H_2O_2$  e lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de RLs de oxigênio e nitrogênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Além disso, ela atua na manutenção do equilíbrio tiólico e prevenção da oxidação de grupos sulfidríla e também na promoção de um reservatório para cisteína, modulação de um processo celular da síntese de DNA e função imune (DERESZ et al., 2007). No sangue, 99,5% da glutathiona se encontra no interior dos eritrócitos e uma pequena quantidade está associada às membranas destes (GARCIA et al., 2008). A GSH é a forma mais abundante, embora a glutathiona se apresente em várias formas: reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e ligada às proteínas (PSSG) (NOZAL et al, 1997). A figura 9 demonstra o sistema glutathiona e a interconversão nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e o papel das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).

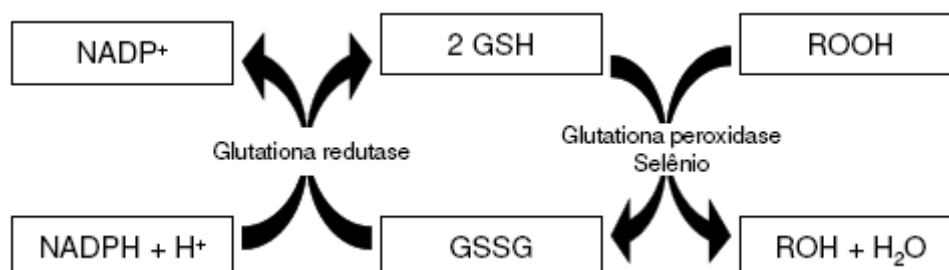


Figura 10. Sistema antioxidante da glutathiona e suas enzimas envolvidas. Adaptado de SIES et al (1997).



O núcleo do resíduo cistetilglicina da glutathiona está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical  $GS^{\cdot}$ , que produz, por dimerização, o GSSG (glutathiona oxidada). A redução de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos a seus álcoois correspondentes com a conversão de GSH em GSSG é catalisada pela enzima GSH-Px dependendo essencialmente da presença de selênio. A GSSG é, então, reduzida pela GR, regenerando o GSH, num processo à custa de NADPH (JORDÃO JR. et al., 1998).

A GSH é sintetizada no citosol das células de mamíferos, e para que ocorra a síntese deve haver disponibilidade de cisteína, o aminoácido sulfuroso precursor e a enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase. O fígado, órgão que possui a maior quantidade de glutathiona, é responsável pela sua biossíntese, convertendo o aminoácido metionina em cisteína (DERESZ et al., 2007). A glutathiona pode ser regenerada pela administração de outros grupamentos tiólicos como a N-acetilcisteína (NAC) (ARUOMA et al., 1989).

A GSH eritrocitária é um antioxidante endógeno considerado o principal composto sulfidrílico em processos redox capaz de atacar radicais livres que ocorre durante os mais diversos processos bioquímicos (NOZAL et al., 1997). Há um consenso que no estado diabético ocorre uma progressiva depleção da glutathiona reduzida (GSH), aumentando os valores da glutathiona oxidada (GSSG) e com isso favorecendo a razão GSH/GSSG (DOMINGUEZ et al 1998; TELCI et al, 2000; MARITIM et al, 2003; PATRIARCA et al., 2005; VALKO et al., 2007; KAMBOJ et al, 2008).

A oxidação da GSH no DM ocorre devido a uma menor capacidade de síntese deste antioxidante e conseqüentemente menores níveis do mesmo (URATA et al., 1996). Também há o excesso de radicais livres formados nesta patologia e a tentativa de desintoxicação das EROs, principalmente dos radicais hidroxila, através da ação da GSH para formação de água e produtos atóxicos para o organismo (DOMINGUEZ et al., 1998; PATRIARCA et al., 2005).

### **3.6 Biomarcadores do estresse oxidativo**

Os radicais livres produzidos pelo metabolismo oxidativo têm uma alta reatividade, e uma meia-vida curta (JORDÃO JR. et al., 1998; VOSS & SIEMS, 2006). Por esse motivo, sua determinação *in vivo* não é viável. Em contrapartida, os lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, após serem modificados pelas espécies reativas, têm uma meia-vida maior, o que os torna marcadores ideais do estresse oxidativo. Dentre esses marcadores encontramos proteínas carbonilas, malondialdeído, 3-nitrotirosina, F2-isoprostanos; 2,4-hidroxinonenal 8-oxo-2'-desoxiguanosina, teste cometa e micronúcleo (DURSUN et al., 2005; GONZÁLES RICO et al., 2006; VOSS & SIEMS, 2006; VASCONCELOS et al., 2007). Os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos também são considerados biomarcadores do dano oxidativo em sistemas biológicos, como as concentrações de GSH, ceruloplasmina, transferrina, vitaminas hidro e lipossolúveis como referência ao sistema não enzimático, enquanto os níveis de tiroxina, SOD, catalase, GPx e glutathione redutase são pertencentes ao sistema de enzimas antioxidantes (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

O ataque dos radicais livres a membranas biológicas forma uma série de aldeídos, entre eles o MDA, que apresenta capacidade de aumentar o dano oxidativo (UCHIDA, 2000). A formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e o fenômeno da peroxidação de um ácido graxo poliinsaturado dá-se justamente devido à existência de várias insaturações em sua molécula, pois é na dupla ligação que o radical peróxido se insere, formando então, um lipoperóxido conforme demonstrado na figura 10 (ALESSIO et al., 2000). O contínuo dano oxidativo leva à destruição das membranas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados, diminuindo sua fluidez e contribuindo para o dano celular (HERSHKO, 1989).

Diante disso, os níveis destes produtos reativos, especialmente malondialdeído (MDA), podem ser utilizados como biomarcadores da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, células e tecidos (BONNES & GUÉRIN, 1992; DEL RIO et al., 2005; GROTTTO et al., 2008). O aumento dos níveis de produtos do dano oxidativo aos lipídios tem sido detectado em soro de pacientes diabéticos, do qual é correlacionado com o desenvolvimento das complicações desta doença (MARITIM et al., 2003; GUILLERMO et al., 2006). Diante disso, verificou-se que a concentração de MDA é considerada o melhor biomarcador de dano oxidativo *in vivo*. (VOSS & SIEMS, 2006).

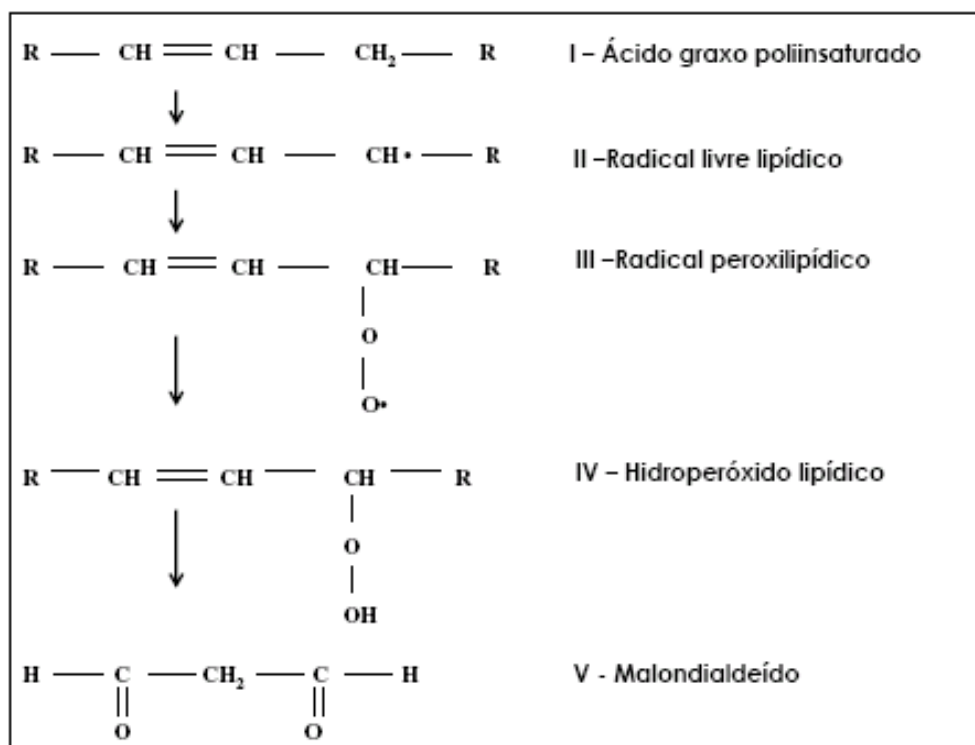


Figura 11. Formação do MDA. Adaptado de ALESSIO et al (2000).

O estresse oxidativo é a chave mediadora no desenvolvimento e progressão do diabetes mellitus e suas complicações devido ao aumento da produção de radicais livres e queda da eficiência das defesas antioxidantes (MARITIM et al., 2003; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2005; ROLO & PALMERA, 2006). Em virtude disso, no DM é comum ocorrerem alterações nos níveis de MDA e em outros biomarcadores do dano oxidativo, além de modificações nas concentrações de GSH e da atividade de enzimas antioxidantes (VALKO et al., 2007).

Os níveis de MDA, PCO, 3-nitrotirosina, F<sub>2</sub>-isoprostanos e até os produtos de glicação avançada (AGEs) são considerados biomarcadores de dano oxidativo no DM e estão elevados em pacientes diabéticos e também em animais induzidos a esta patologia como resposta à toxicidade provocada pela hiperglicemia persistente e a sua autooxidação sobre proteínas e membranas celulares (DOMINGUEZ et al., 1998; TELCI et al., 2000; RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007).

### 3.7 Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico é um dos mais importantes caminhos de modulação do SNC desempenhando um papel fundamental em várias funções vitais, como aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM et al., 2002).

A ACh (figura 11) foi o primeiro composto a ser identificado como um neurotransmissor catiônico e passou a ser amplamente estudado nas sinapses do SNC e SNP. Sua síntese ocorre na junção neuroefetora e ganglionar a partir do acetil CoA, um produto do metabolismo celular, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta pela ação da enzima colina acetilcolinesterase (ChAT; EC 2.3.1.6) (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Este neurotransmissor é transportado até as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular da acetilcolina onde fica alojada até sua liberação (RAND, 2007). Um potencial de ação permite a liberação da ACh na fenda sináptica onde exerce seus efeitos mediados pela ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos (RANG et al., 2004).

A acetilcolina que se encontra na fenda sináptica é hidrolisada por uma colinesterase específica produzindo ácido acético e colina. A colina resultante é em parte recaptada para o terminal pré-sináptico através de um mecanismo de recaptação de alta afinidade (SOREQ & SEIDMAN, 2001) onde poderá ser reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh (MESULAM et al., 2002).

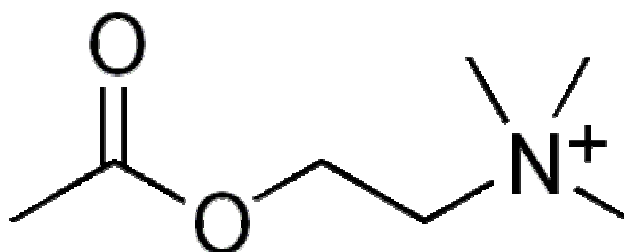


Figura 12. Estrutura química da acetilcolina. (<http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymoduleport.html>)

### **3.7.1 Colinesterases**

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise e detoxicação de xenobióticos (DELFINO et al., 2009). Estas enzimas são classificadas de acordo com as suas propriedades catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ et al., 1993).

Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). A AChE (E.C. 3.1.1.7) também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como ACh) e a BuChE (E.C. 3.1.8) ou pseudocolinesterase hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. A AChE é predominante no cérebro, junção neuromuscular e eritrócitos (COKUGRAS, 2003). Porém a BuChE tem distribuição neuronal muito restrita se comparada a AChE, mas é amplamente distribuída no rins, intestinos, pulmão, fígado e plasma (MESULAM et al., 2002)

### **3.7.2 Butirilcolinesterase**

A BuChE é uma enzima regulatória do sistema colinérgico sintetizada pelo fígado capaz de promover a degradação de ésteres de colina, distribuída em vários tecidos e plasma, onde é a colinesterase mais abundante (MASSOULIÉ et al., 1993; MESULAM et al., 2002). Embora tenha sido descoberta a mais de 70 anos atrás, sua importância fisiológica é pouco compreendida (STEDMAN et al., 1932; STEFANELO et al., 2005), mas há indícios que esta enzima tem participação nos estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso. Apesar disso, a atividade desta enzima tem sido usada para o diagnóstico de intoxicações e monitoramento de pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos (DELFINO et al., 2009).

A BuChE encontra-se na forma solúvel no cérebro e plasma, porém no cérebro também é encontrada a forma hidrofóbica fixado na membrana celular dos neurônios (DARVESH et al., 2003). Recentes estudos demonstram que esta enzima colinérgica é capaz de hidrolisar ACh e pode aparentemente substituir AChE na manutenção da integridade estrutural e funcional da via central colinérgica

(MESULAM et al., 2002). Nos últimos anos, estudos demonstraram que os níveis da BuChE estão associadas a uma série de patologias como o mal de Alzheimer, doenças cardiovasculares e o aumento da morbidade e mortalidade (CALDERON-MARGALIT et al., 2006). Além disso, alterações na atividade desta enzima estão presentes em pacientes hemodialisados e diabéticos (CALDERON-MARGALIT et al., 2006, GARCIA et al., 2008; IWASAKI et al., 2007).

### **3.7.3 Butirilcolinesterase no diabetes mellitus**

Na literatura, os valores da butirilcolinesterase sérica no diabetes mellitus apresentam-se elevados em humanos (ABBOT et al; 1993; CALDERÓN-MARGALIT et al., 2006; IWASAKI et al, 2007) e animais (DAVE & KATYARE, 2002; MAZZANTI et al., 2004; KAMBOJ et al., 2008; SCHMATZ et al., 2009). A causa do aumento dos níveis da BuChE sérica ainda é desconhecida, mas pesquisas indicam que a elevação desta enzima na circulação ocorre devido a uma resposta ao perfil lipídico alterado que ocorre nesta patologia (ABBOT et al., 1993). Possivelmente, o fluxo de ácidos graxos dos adipócitos que partem em direção ao fígado estimula indiretamente a síntese de BuChE sérica e por isso a elevação da concentração desta enzima (IWASAKI et al., 2007). Outra sugestão descrita na literatura refere-se ao tecido cardíaco, que devido às lesões ocasionadas no estado diabético, permite o extravasamento das formas solúveis da BuChE do coração. Um aspecto interessante em relação à BuChE na DM é que aplicações de insulina exógena não apresentam efeitos sobre os níveis de BuChE nesta patologia, o que indica a independência do hormônio hipoglicemiante na atividade desta enzima colinérgica (DAVE & KATYARE, 2002).

No DM, o aumento da EROs provocado pela hiperglicemia persistente promove a ativação dos fatores inflamatórios, como foi demonstrado no tecido cardíaco da figura 12.

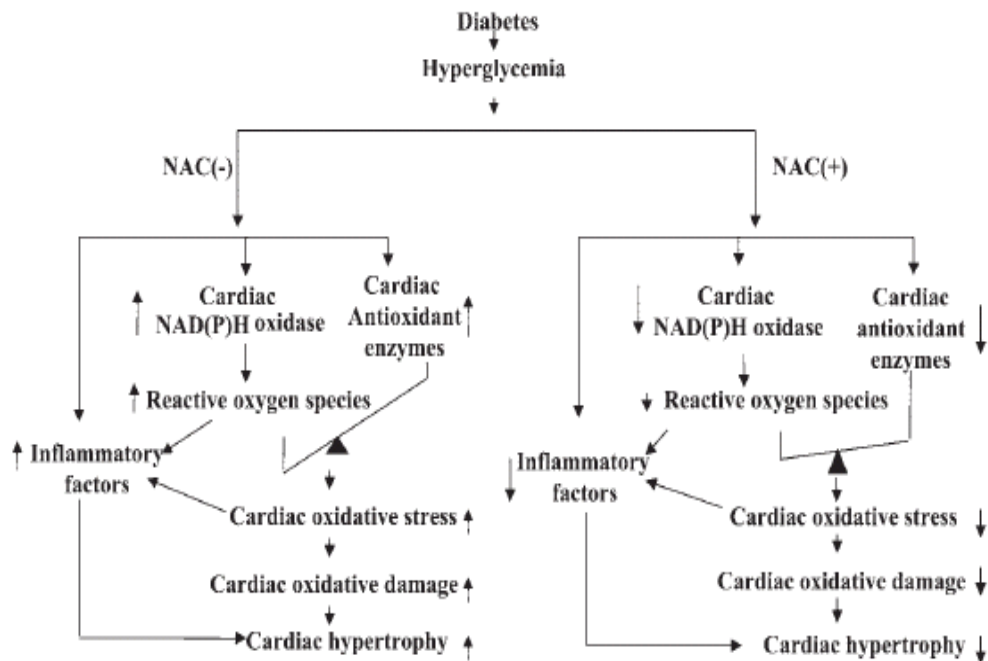


Figura 13. Relação entre hiperglicemia, EROs e fatores de inflamação. Adaptado de GUO et al (2007).

Entretanto, estes fatores de inflamação estão associados com a elevação da BuChE sérica e diante disso esta enzima colinérgica seria considerada um marcador de atividade inflamatória (figura 13) (GUO et al., 2007; DAS, 2007).

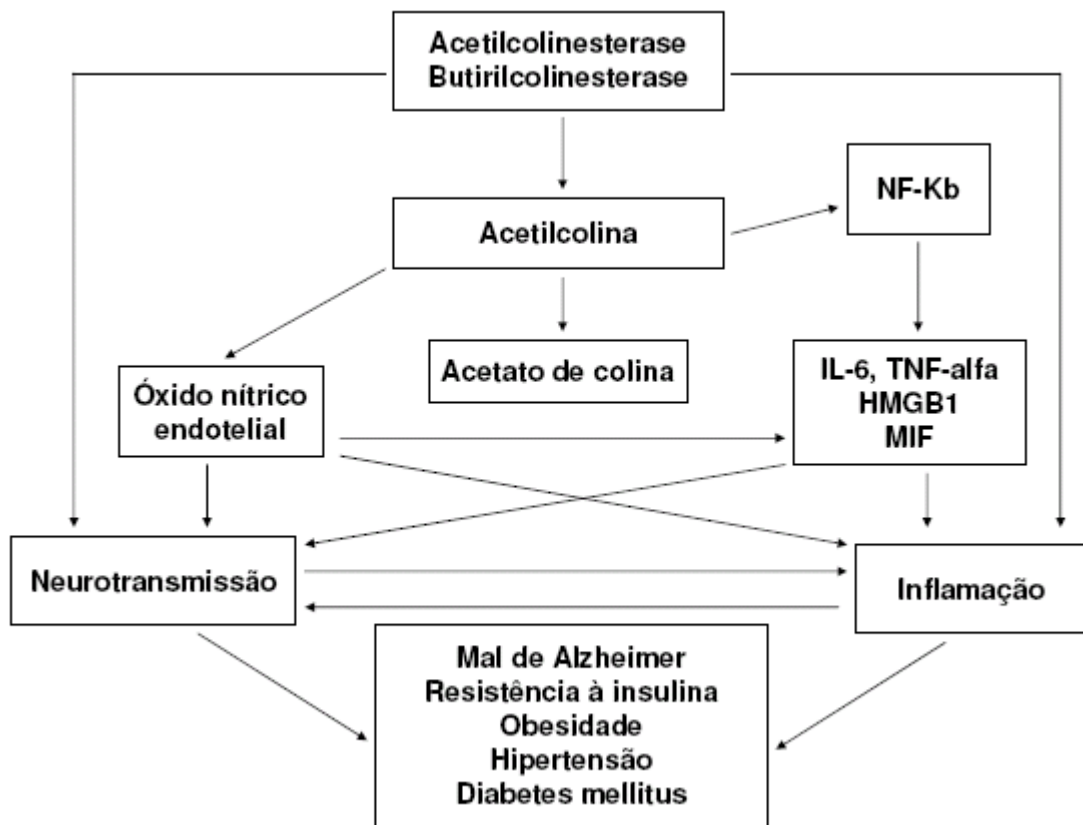


Figura 14. Interação entre fatores de inflamação e colinesterases. Adaptado de DAS (2007).



## 4. MANUSCRITO

### **Does N-Acetylcysteine have a protective effect on Oxidative Stress in Alloxan-Induced Diabetic Rats?**

André Valle de Bairros<sup>1,2</sup>, Miguel Roehrs<sup>2</sup>, Gianine Ribeiro<sup>2</sup>, Raquel Tonello<sup>2,4</sup>, Fernando de Freitas<sup>2</sup>, Ana Paula Moreira<sup>2,4</sup>, Cinthia Mazzanti<sup>4</sup>, Mirna Leal<sup>3</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>2\*</sup>, Vera Maria Morsch<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.*

<sup>2</sup>*Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>3</sup>*Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>4</sup>*Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.*

Corresponding authors:

*Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.*

*E-mail adress: [garciapomblum@yahoo.com.br](mailto:garciapomblum@yahoo.com.br) (S.C.Garcia)*

*Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Fax: +55 55 32208978*

*E-mail adress: [veramorsch@gmail.com](mailto:veramorsch@gmail.com) (V.M.Morsch)*

## **ABSTRACT**

In the present study, the effects of N-acetylcysteine (NAC) were investigated in normal glycemia and alloxan-induced diabetic rats. Blood parameters such as blood glucose, glycated hemoglobin (HbA1C), hepatic function, renal function, oxidative stress biomarkers and serum butyrylcholinesterase (BuChE) activity were assessed. The results showed that intraperitoneal NAC supplementation in the diabetic group did not bring about significant differences in glucose, HbA1C and hepatic and renal marker levels among the groups. Glutathione peroxidase (GPx), catalase, reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) did not show significant differences between the diabetic groups treated with NAC and the diabetic saline group. On the other hand, SOD activity was significantly higher ( $P<.05$ ) in blood of diabetic rats treated with NAC compared to the diabetic saline group. Serum BuChE activity was significantly lower ( $P<.05$ ) in the serum of diabetic rats that received NAC compared to the diabetic saline group. In summary, we demonstrated that NAC supplementation, in the conditions tested, did not change the levels of blood glucose, glycated hemoglobin and renal and hepatic markers in any group. This treatment was not able to reestablish the antioxidant system and nor did it protect against lipid peroxidation. Nevertheless, alterations in SOD and BuChE activities in diabetic groups that received NAC showed that these enzymes have an important role in this disease. Therefore, more studies are necessary to investigate the action of this drug on SOD and BuChE activities and their relationship in the diabetes.

*Keywords:* Diabetes; N-acetylcysteine; Oxidative stress; Blood biomarkers; Butyrylcholinesterase activity.

## 1. Introduction

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion and insulin action, or both. In diabetes, persistent hyperglycemia may cause high production of free radicals generated in direct autoxidation processes of glucose (Wolff & Dean, 1987). In addition, oxidant species and subsequent oxidative stress (Desco et al., 2002) can be produced by the nonenzymatic and progressive glycation of proteins with the consequent increased formation of glucose-derived advanced glycosylation end products (AGEs) (Brownlee et al., 1988), activation of NAD(P)H oxidases (Inoguchi et al., 2000), nitric oxide synthase and xanthine oxidase activity (Consentino et al., 1997).

This pathology has been shown an increase in the renal and hepatic function markers (Halliwell & Gutteridge, 2000; Komosinska-Vassev et al., 2005; West et al., 2006; Al-Shamsi et al., 2006) and free radical formation with high production of reactive oxygen species (ROS) that has been attributed to protein glycation and/or glucose auto-oxidation due to a hyperglycemic environment (Gillery et al., 1989; Hunt et al., 1990; Baynes, 1991). Increased oxidative stress may be a result of the pathologic process (Halliwell & Gutteridge, 2000; Rolo e Palmeira, 2006). ROS play a role in a variety of physiologic and pathophysiological processes such as microangiopathy and nephropathy (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; Halliwell & Gutteridge, 2000), non-alcoholic fatty liver disease (Federico et al., 2006; West et al., 2006) and cardiovascular dysfunction (Pacher & Szabo, 2005).

Another common effect in diabetes is the high activity of serum butyrylcholinesterase (BuChE) in rats (Dave & Katyare, 2002) and humans (Abbott et al., 1993). Despite its physiologic importance, BuChE activity is poorly understood (Darvesh et al., 2003), but there are studies that correlated this enzyme with vascular alterations (Calderon-Margalit et al., 2006; Garcia et al., 2008b), inflammatory factors and cytokines production (Borovikova et al., 2000; Das, 2007). In this line, it is known that serum BuChE activity can to be utilized as peripheric marker of acetylcholine (Koga et al., 1997; Delfino et al., 2009). One of the mechanisms that explains the increased BuChE activity in diabetes is the increase of ROS and consequently the increase of oxidative stress (Dave & Katyare, 2002; Guo et al., 2007).

Moreover, several experimental studies have shown a decrease in the occurrence of complications after supplementation with different antioxidants in diabetic animal models supporting the role of oxidative stress in the development of diabetic complications (Maxwell, 1995; Kaneto et al., 1999; Rao et al., 2001; Odetti et al., 2003; Maritim et al., 2003; Mazzanti et al., 2003; Al-Shamsi et al., 2006; Barbosa et al., 2006; Haidara et al., 2009). One of these supplements is N-acetylcysteine (NAC), a thiol (sulfhydryl-containing) compound with antioxidant properties utilized for paracetamol intoxications.

NAC is an oxygen radical scavenger and a precursor for the biosynthesis of glutathione (GSH), replenishing the intracellular stores of GSH and promoting detoxification caused by free radicals (Aruoma et al., 1989). It has been shown that NAC has beneficial effects on the treatment of HIV infection, cancer, heart disease, nephropathy and diabetes (Kelly, 1998; Kaneto et al., 1999; Odetti et al., 2003; Coyle et al., 2006). Many studies have reported the effects of NAC against oxidative stress caused by diabetes, which includes reduction in the level of advanced oxidation protein products (AOPPs), reduction of lipid and protein oxidation and an increase in antioxidant enzymes (Kaneto et al., 1999; Jain et al., 2002; Trimachi et al., 2003; Lazárová et al., 2004; Kamboj et al., 2008).

In the present study, the effects of NAC administrated intraperitoneally were investigated in normal and alloxan-induced diabetic rats. Blood glucose and glycated hemoglobin (HbA1C) levels, renal, hepatic and oxidative stress biomarkers, antioxidant enzyme activities and serum butyrylcholinesterase (BuChE) activity were analyzed in order to verify the potential therapeutic use of this compound in the diabetic state.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Chemicals*

N-acetylcysteine (NAC), albumin, alloxan monohydrate, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), dinitrophenylhydrazine (DNPH), dithiothreitol, epinephrine, propionyl choline, glycine, NADPH and malondialdehyde (MDA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), sodium monohydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), D-glucose anhydrous, sodium hydroxide (NaOH), trichloroacetic acid (TCA), potassium ironcyanide, potassium cyanide and

copper sulphate were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, BR). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), methanol, ethanol, ethylacetate e acetonitrile were obtained from the Tedia Company (Fairfield, OH, USA). For glycated hemoglobin, butyrylcholinesterase, hepatic and renal markers were used commercials kits from DOLES®. All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

## *2.2. Animals*

36 Male albino rats Wistar from Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil) were used in this experiment. The animals were maintained at a constant temperature (23±1 °C) on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria (protocol under number: 54/2008).

### *2.2.1. Diabetes Induction*

Male albino rats Wistar weighing between 215 and 350 g were used. After fasting for 24 hs, the animals received a single intraperitoneal injection of freshly prepared alloxan using 2% sodium citrate solution 0,05M (pH = 4,5) as vehicle, at a dose of 150 mg alloxan/kg body weight (Szkudelski et al., 1998). The control animals only received saline vehicle. After 6 hours, the diabetic rats received 2 mL glucose solution 20% by gavage. For 24 hours, a glucose solution 5% was only the hidric fountain. Later 15 days, the blood levels of glucose were measured by portable glucometer ADVANTAGE (Roche®, Boehringer Mannheim, MO, USA). Symptoms of diabetes were observed within a week of alloxan injection. The rats with blood levels glucose above 200 mg/dl were considered diabetics and selected for experiment.

### *2.2.2. Treatment with N-Acetylcysteine (NAC)*

The animals were randomly divided into 6 groups (6 rats per group): I – Control/ saline; II – Control 25 mg/Kg NAC; III – Control 75 mg/kg NAC; IV- Diabetic/ saline; V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. One week after diabetes induction, the animals belonging to group II and V received intraperitoneally 25 mg/Kg of NAC and the animals of the groups III and VI received 75 mg/kg of NAC, while the animals of the groups I and IV were injected intraperitoneally with

saline solution. NAC was freshly prepared in saline solution 0.9% and was administered between 14 and 16 p.m. during 30 days. After the treatment period, the animals were submitted to euthanasia, and the blood was collected by cardiac puncture for biochemical assay.

### *2.3. Samples*

Blood was collected by cardiac puncture from diabetic and control rats and divided in heparinized tubes, EDTA-containing tubes and tubes with no anticoagulant. Plasma-EDTA and serum were obtained by centrifugation at 1500g for 10 min at 4°C.

#### *2.3.1. Biochemical measurements*

Creatinine, urea, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) and glycated hemoglobin were determined by Doles® commercial kits.

#### *2.3.2. Butyrylcholinesterase (BuChE) assay*

BuChE activity in serum was determined by Doles® commercial kits according to the method of Ellman et al (1961) using propionyl choline as substrate. Plasma protein concentrations were determined using the method of Bradford using bovine serum albumin as standard. Serum BuChE activity is defined as the amount of enzyme required to convert mmol of substrate in 1 min per mg of serum protein (mM enzyme/ min/ mg protein).

#### *2.3.3. Catalase assay*

Erythrocyte catalase activity was measured by the method of Aebi (1984), which is based on the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by catalase. The decrease in absorbance at 240 nm was measured at 20°C and CAT activity was expressed as K units per gram of hemoglobin (K/ g Hb).

#### *2.3.4. Superoxide dismutase (SOD) assay*

SOD activity measurement is based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin in whole heparinized blood as described by McCord and Fridovich (1969). In this method, SOD present in the sample competes with the

detection system for radical superoxide. An unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50% the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM). SOD activity was expressed as an unit of SOD per mg hemoglobin (U SOD/ mg Hb).

#### *2.3.5. Gluthathione peroxidase (GPx) assay*

GPx activity in whole heparinized blood was assayed spectrophotometrically by the method of Wendel (1981) through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 340 nm. Heparinized blood was added in GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this assay, the enzyme activity is indirectly measured by means of NADPH decay. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is decomposed, generating GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase presents in the assay medium at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as  $\mu\text{mol NADPH}$  in 1 min per gram of hemoglobin ( $\mu\text{mol NADPH/ min/ g Hb}$ ).

#### *2.3.6. Malondialdehyde (MDA) assay*

The measurement of MDA was determined in plasma-EDTA by high performance liquid chromatographic with visible detection (HPLC-VIS), according to the method of Grotto et al (2006). MDA levels as expressed as  $\mu\text{mol per liter}$  ( $\mu\text{mol/L}$ ).

#### *2.3.7. Gluthathione (GSH) assay*

Erythrocytes were deproteinized with an equal volume of trichloroacetic acid (TCA) 10% after hemolysis. GSH was measured in acid derivate with DTNB (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) by high performance liquid chromatographic (HPLC) with UV detector at 330 nm, using gradient elution at 39°C, according to the method of Garcia et al (2008a). GSH levels were expressed as  $\mu\text{mol per gram of hemoglobin}$  ( $\mu\text{mol/ g Hb}$ ).

#### *2.3.8. Protein determination*

Protein content was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

### **3. Statistical analysis**

The analysis of the data was performed with Statistica® 6.0 software system (Statsoft Inc., 2001). The statistical analysis used was Two-way ANOVA, followed by Duncan multiple range test. Effects were considered significant at values of  $P < .05$ . All data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### **4. Results**

#### *4.1. Blood glucose and glycated hemoglobin*

The blood glucose levels were determined at the onset and at the end of the experiment. Glycated hemoglobin was determined at the end of the experiment and these results are presented in table 1. The blood glucose levels for the diabetic/ saline group (IV) ( $P < .05$ ) were significantly increased when compared to the control/ saline group at the onset and end of the experiment. The treatment with NAC had no effects on glucose levels in diabetic groups (V, VI), which remained increased, when compared to the control/ saline group (I) at the end of experiment. Similarly, no significant differences in glucose levels were observed when NAC was administered per se in control groups (II, III) at the end of the study when compared to the control/ saline group (I).

The glycated hemoglobin levels for the diabetic/ saline group (IV) ( $P < .05$ ) were significantly increased when compared to the control/ saline group at the end of experiment. The treatment with NAC had no effects on glycated hemoglobin levels in diabetic groups (V, VI), which remained increased, when compared to the control/ saline group (I). Similarly, no significant differences in glucose levels were observed when NAC was administered per se in control groups (II, III) at the end of the study when compared to the control/ saline group (I).

#### *4.2. Body weight, hematocrit and hemoglobin*

The body weight levels were determined at the onset and at the end of the experiment. The hematocrit and hemoglobin levels were determined at the end of the



experiment. These parameters are presented in table 2. In relation to body weight, no significant differences among the groups were observed at the onset of the experiment. In diabetic/ saline group (IV) a significant decrease ( $P<.05$ ) in body weight was observed when compared to the control/ saline group (I) at the end of the experiment. The treatment with NAC had no effects on body weight in diabetic groups (V, VI) at the end of the study, which remained reduced in relation to the control/ saline group (I). NAC supplementation also had no effects on body weight in control groups (II, III) when compared to control/ saline group (I) at the end of the study.

The hematocrit and hemoglobin levels did not show significant differences among the groups at the end of the experiment. The treatment with NAC had no effects on hematocrit and hemoglobin levels in diabetic groups (V, VI) when compared to control/ saline group (I). NAC supplementation per se also had no effects on hematocrit and hemoglobin levels in control groups (II, III) when compared to the control/ saline group (I).

#### *4.3. Renal and hepatic markers*

Levels of renal markers (urea, creatinine) and hepatic markers (AST, ALT and  $\gamma$ -GT) were determined at the end of the experiment and are presented in table 3. Creatinine, urea, AST, ALT and  $\gamma$ -GT levels did not show significant differences among the groups. Treatment with NAC had no effects on these parameters in control groups (II, III) when compared to the control/ saline group (I). NAC supplementation also had no effects on these parameters in diabetic groups (V, VI) when compared to the control/ saline group (I).

#### *4.4. Antioxidant enzymes and oxidative stress biomarkers*

Antioxidant enzyme activities (catalase and GPx) were determined at the end of the experiment and are presented in table 4. Oxidative stress biomarkers (MDA and GSH) were determined at the end of experiment and are presented in figure 1 and 2 respectively. Catalase and GPx activities did not show significant differences among the groups. GSH levels for diabetic/ saline group (IV) ( $P<.05$ ) were significantly decreased when compared to the control/ saline group (I). Treatment with NAC had no effects on GSH levels in diabetic groups (V, VI), which remained decreased, when compared to the control/ saline group (I). Similarly, no significant

differences in GSH levels were observed when NAC was administered in control groups (II, III) when compared to the control/ saline group (I).

MDA levels for the diabetic/ saline group ( $P<.05$ ) were significantly increased when compared to the control/ saline group (I). Treatment with NAC had no effects on MDA levels in diabetic groups (V, VI), which remained increased, when compared to the control/ saline group (I). Similarly, no significant differences in MDA levels were observed when NAC was administered per se in control groups (II, III) when compared to the control/ saline group (I).

#### *4.5. Activity of SOD on whole blood*

The results obtained for SOD activity in whole blood is presented in figure 3. As can be observed, SOD activity was significantly decreased in the diabetic/ saline group (IV) ( $P<.05$ ) compared to the control/ saline group (I). Treatment with NAC significantly increased ( $P<.05$ ) SOD activity in diabetic groups (V, VI) when compared to the diabetic/ saline group (IV). However, treatment with NAC had no effects on SOD activity in control groups (II, III) when compared to the control/ saline group (I).

#### *4.6. Activity of BuChE in serum*

The results obtained for BuChE activity are presented in figure 4. As can be observed, BuChE activity was significantly increased in the diabetic/ saline group (IV) ( $P<.05$ ) compared to the control/ saline group (I). Treatment with NAC significantly decreased ( $P<.05$ ) BuChE activity in diabetic groups (V, VI) when compared to the diabetic/ saline group (IV). However, treatment with NAC significantly increased ( $P<.05$ ) BuChE activity in control/ NAC 75 group (III) when compared to the control/ saline group (I).

## **5. Discussion**

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia may cause high production of free radicals and consequently increase of the oxidative stress (Wolff & Dean, 1987; Rolo & Palmeira, 2006). Oxidative stress is widely associated with the pathogenesis of secondary complications of DM and various studies have shown that increased oxidative stress can lead to microvascular cerebral diseases, cerebral hemorrhage, and brain

infarction (Kannel & McGee, 1979; Halliwell & Gutteridge, 2000; Rolo & Palmeira, 2006).

The literature suggests that NAC is a powerful antioxidant with the capacity to restore levels of GSH and antioxidant enzymes in various pathologies (Akerlund et al., 1996; Trimarchi et al., 2003; Coyle et al., 2006; Kamboj et al., 2008). In this line, we tested some doses of NAC, administered intraperitoneally, on blood oxidative stress parameters, renal and hepatic function and serum BuChE activity in normal and alloxan-induced diabetic rats.

Alloxan-induced diabetic rats treated produced significant increase in plasma glucose levels along with reduction in body weight. In our experiment, NAC supplementation in diabetic rats was not able to decrease blood glucose and glycated hemoglobin levels when compared to diabetic/saline group, as had been shown in other studies in humans (Lazárová et al., 2004) and diabetic animals (Pieper & Siebeneich, 1998; Rocha et al., 2005).

Possibly the destruction of pancreatic beta cells by alloxan-induced ROS generation (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008) hindered a potentially therapeutic effect of NAC on these cells, and consequently on hyperglycemia status. Perhaps the only way to bring about a decrease in hyperglycemia in this animal model of diabetes would be through the injection of NAC simultaneously with alloxan in order to reduce alloxan extracellularly so that less would be available for intracellular accumulation, avoiding necrosis of pancreatic beta cells caused by ROS generation (Sen & Bhattacharya, 1952; Sakurai & Miura, 1989). On the other hand, treatment with NAC has been shown to improve glycemic control by the preservation of pancreatic  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes in mice (Kaneto et al., 1999) and to prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in rats through protection of the pancreatic  $\beta$ -cell against free radicals (Haber et al., 2003). Probably NAC supplementation only had an effect on hyperglycemia in type 2 diabetes and in streptozotocin-induced animals as has been shown by other authors (Kaneto et al., 1999; Odetti et al., 2003; Haber et al., 2003; Guo et al., 2007).

Some studies have shown alterations in hepatic markers in the diabetic patients (West et al., 2006) and rats (Al-Shamsi et al., 2006). Federico et al (2006) showed that NAC supplementation was able to reestablish enzymatic hepatic levels in diabetic patients. Our results showed that NAC supplementation had no effects on hepatic markers among the groups. Furthermore, treatment with NAC was not able to

restore renal markers to the levels of the control group as was also described by Odetti et al (2003).

MDA is a sensitive and specific biomarker of lipoperoxidation and high levels are common in diabetes (Halliwell & Gutteridge, 2000; Komosinska-Vassev et al., 2005; Haidara et al., 2009). Voss & Siems (2006) showed that alterations of this biomarker reflect the real redox status *in vivo*. In this study, MDA levels were not altered in the diabetic rats treated with NAC. In figure 1, the control groups that received NAC showed increased MDA levels, though not significantly, when compared to the control/saline group. We suggest that NAC had pro-oxidant effects through increased hydroxyl radical generation in a system with Fe(III)-citrate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by reducing ferric iron to its catalytic active Fe<sup>+2</sup> form (Sprong et al., 1998; Sagristá et al., 2002). Therefore, our data indicate that NAC had no effects on this specific biomarker in diabetic rats, probably due to uncontrolled hyperglycemia with subsequent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ·OH radical formation together with an imbalance in the antioxidant system.

The status of antioxidant enzymes in diabetes is controversial. Superoxide dismutase (SOD) and catalase are the major antioxidant enzymes against oxidative stress. SOD offers protection from highly reactive superoxide anions (·O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and converts them to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell & Gutteridge, 2000; Ramakrishna & Jailkhani, 2007). Studies indicate that the hyperglycemic state promotes reduction in the activity of erythrocyte SOD in humans (Kesavulu et al., 2000; Ramakrishna & Jailkhani, 2007). It has been suggested that there is a decrease in SOD activity in prolonged diabetes, but in early diabetes there is an increase in SOD formation and its activity progressively decreases with disease progress because of non-enzymatic glycation (Arai et al., 1987). In the figure 3, diabetic rats that received NAC showed increased erythrocyte SOD activity when compared to the diabetic/ saline group. We suggest that increased SOD activity after NAC administration to the diabetic rats was due to the capacity of NAC to avoid non-enzymatic glycation of SOD. Consequently, NAC promote pro-antioxidant activities of this enzyme faster than other antioxidant enzymes measured in this experiment. In that case, increased SOD activity in diabetic rats treated with NAC could act directly against superoxide anions produced by diabetes, increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels because of O<sub>2</sub><sup>-</sup> conversion into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell & Gutteridge, 2000). However, GSH levels and catalase activity would not be able to keep pace with the speed of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation in the detoxification process, which

could be demonstrated by lower GSH levels and catalase activity in the diabetic groups treated with NAC.

Catalase is responsible for the catalytic decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ . In diabetes, catalase activity may be decreased (Selvam & Anuradha; 1988), unchanged (Poonam et al.; 1997) and increased (Ramakrishna & Jaikhan; 2007). In our study, catalase activity did not show significant differences among the groups. However, catalase activity was lower in the control groups treated with NAC when compared to the control/ saline group. This data indicates that NAC acted as a pro-oxidant agent, possibly through a  $\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2$  -dependent reaction (Sagrístá et al., 2002) and consequently decreased the capacity of  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition. Diabetic rats treated with NAC showed lower catalase activities than the control groups, though not significantly, which indicates that NAC supplementation had no effects on catalase activity. We suggest that  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\cdot\text{OH}$  radical formation from increased SOD activity in diabetic rats treated with NAC inhibited the restoration of catalase activity in these groups and consequently impeded an effective detoxification process.

Glutathione peroxidase (GPx) activity has been reported to be increased (Ndahimana et al., 1996), decreased (Ramakrishna & Jaikhan, 2007; Kamboj et al., 2008) and unchanged (Faure et al., 1995) in diabetes. In table 4, the statistically non-significant increase in GPx activity in diabetic rats treated with NAC may have been a response to the increased peroxidative stress from the high SOD activity which converts  $\cdot\text{O}_2^-$  into  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This may demonstrate that NAC in diabetic rats promoted GPx activity, which acted to decrease peroxidative stress while catalase activity remained low. However, these effects did not increase GSH levels, possibly because GPx activity was involved in the conversion of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$  and consequently in the increase of GSSG.

Reduced glutathione (GSH) is the main cellular thiol participating in the cellular redox reaction in which erythrocyte GSH is physiological free radical scavenger (Dominguez et al., 1998). In accordance with previous reports (Dominguez et al 1998; Telci et al., 2000; Maritim et al., 2003; kamboj et al., 2008), diabetes induced significant depletion of GSH. Surprisingly, our treatment with NAC in the diabetic groups failed to restore erythrocyte GSH levels (figure 2). This was unexpected, since NAC is a metabolic precursor of GSH and has been used to restore GSH (Aruoma et al., 1989). Possibly these diabetic rats had impaired glutathione

synthesis, as was described by Urata et al (1996). However, the small increase of GPx activity in the diabetic rats treated with NAC allowed an increase in the GSSG/GSH ratio and probably NAC was not an effective metabolic precursor of GSH. Patriarca et al (2005) showed the failure of NAC in the reestablishment of GSH levels could be attributed to the unbalanced ratio between GSH synthesis and consumption, where the high consumption rate could lower GSH even in the presence of substrate for the synthesis. All these aspects could be involved in the decrease of erythrocyte GSH levels and consequently the high levels of MDA.

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) are enzymes that catalyze the hydrolysis of neurotransmitter acetylcholine (ACh), a key process in the regulation of cholinergic neurotransmission (Darvesh et al., 2003). Some authors have studied the relationship AChE and BuChE activities with diabetes in humans (Abbot et al., 1993; Iwasaki et al., 2007) and animals (Dave & Katyare, 2002; Mazzanti et al., 2004; Kamboj et al., 2008; Schmatz et al., 2009). Dave & Katyare (2002) demonstrated that in diabetic rats treated with insulin there was no decrease in BuChE activity.

One important data observed in our study is that diabetic rats showed higher serum BuChE activity than normal glycemia rats, which is in agreement with the literature (Dave & Katyare, 2002). However, a significant ( $P < .05$ ) decrease of the serum BuChE activity was observed in the diabetic rats treated with NAC. On other hand, NAC supplementation was able to increase the activity of this enzyme in the control groups in the dose of the 75 mg/kg (figure 4). This result suggests that NAC supplementation in control group could be altering cholinergic neurotransmission. The cause of increased BuChE activity is still unknown, in spite of evidence indicating that the increase of this enzyme may be a response to the serum lipid profile and/or the soluble form of cardiac BuChE (Dave & Katyare, 2002; Iwasaki et al., 2007). However, hyperglycemia increases ROS production and consequently oxidative stress (Rolo & Palmeira, 2006), and this situation promotes increased inflammatory factors (Guo et al., 2007). According with Das (2007), both AChE and BuChE activities are possible markers of low-grade systemic inflammation because acetylcholine (ACh) have anti-inflammatory actions and suppress the production of pro-inflammatory cytokines (Borovikova et al., 2000).

The high activity of AChE and BuChE observed in diabetes may be due to a reduction of anti-inflammatory actions exerted by decreased of ACh levels. Guo et al

(2007) showed that NAC decreased inflammatory factors by decreasing ROS production. Thus, in our study, NAC may have decreased butyrylcholinesterase activity (figure 4) in diabetic rats through the reduction of inflammatory factors because NAC have anti-inflammatory actions as was described by Kim et al (2000). Nevertheless, diabetic rats treated with NAC did not show decreased MDA levels or increased GSH levels, but rather showed an increase in erythrocyte SOD activity (figure 3). Therefore, the increase of erythrocyte SOD activity could be indirectly related with the decrease of butyrylcholinesterase activity in diabetic rats after treatment with NAC. Kim et al (2000) demonstrated a similar correlation between NAC and SOD in their inhibitions of pancreatic NF- $\kappa$ B activation and cytokine production mediated by ROS. Chen et al (2007) suggested that the increase of SOD activity could be a result of its capability in attenuating TNF- $\alpha$  in brain and Kamboj et al (2008) reported an increase of this antioxidant enzyme together with a decrease of AChE activity in brain in diabetic rats treated with NAC. In our study, we suggest that NAC supplementation and the increase of the SOD activity in diabetic rats could be associated with the inhibition of inflammatory factors and cytokine production, and consequently the decrease of serum BuChE activity in these animals. However, there were no changes in antioxidant system, suggesting that NAC decreased BuChE activity in diabetic rats possibly acting directly in inflammatory factors and cytokine production independent of the ROS generation.

In summary, we demonstrated that intraperitoneal NAC supplementation in the doses of 25 and 75 mg/Kg did not lead to significant changes in renal and hepatic markers, blood glucose and glycated hemoglobin levels. Furthermore, treatment with NAC in alloxan-induced diabetic rats was not able to reestablishing the antioxidant system and nor did it protect against free radicals as was anticipated in this study. Nevertheless, alterations in SOD and BuChE activities in diabetic groups that received NAC show that these enzymes have an important role in this disease. More studies are necessary to investigate the action of this drug on SOD and BuChE activities and their relationship with the diabetic state.

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande

do Sul (FAPERGS), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Doles® and Roche®. S.C. Garcia and V. Morsch are recipients of CNPq Research Fellowships.

## References:

Abbott, C.A., Mackness, M.I., Kumar, S., Olukoga, A.O., Gordon, C., Arrol, S., Bhatnagar, D., Boulton, A.J., Durrington, P.N. (1993). Relationship between butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Clinical Science*, 85 (1), 77-81.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

Al-Shamsi, M., Amin, A., Adeghate, E. (2006). Vitamin E ameliorates some biochemical parameters in normal and diabetic rats. *Annals of the New York Academy of Science*, 1084, 411-431.

Akerlund, B., Jarstrand, C., Lindeke, B., Sonneborg, A., Akerblad, A-C., Rasool, O. (1996). Effect of N-acetylcysteine (NAC) treatment on HIV-1 infection: a double-blind placebo-controlled trial. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 50 (6), 457-461.

Arai, K., Maguchi, S., Fujii, S., Ishibashi, H., Oikawa, K., Taniguchi, N (1987). Glycation and inactivation of human Cu-Zn superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 262, 16969-16972.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 6, 593-597.

Barbosa, N.B., Rocha, J.B., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W. (2006). Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 163(3), 230-238.



Baynes, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. *Diabetes*, 40, 405-412.

Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405, 458-462.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *The New England journal of medicine*, 318, 1315–1321.

Calderon-Margalit, R., Adler, B., Abramson, J.H., Gofin, J., Kark, J. (2006). Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Clinical Chemistry*, 52(5), 845-852.

Chen, C.M., Yin, M.C., Hsu, C.C., Liu, T.C. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP treated mice. *Nutrition*, 23, 589-597.

Cosentino, F., Hishikawa, K., Katusic, Z.S., Luscher, T.F. (1997). High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 96, 25–28.

Coyle, L.C., Rodriguez, A., Jeschke, R.E., Simon-Lee, A., Abbott, K.C., Taylor, A.J. (2006). Acetylcysteine In Diabetes (AID): A randomized study of acetylcysteine for the prevention of contrast nephropathy in diabetics. *American Heart Journal*, 151(5), 1032.e9 - 1032.e12.

Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17, 131-138.

Das, U.N. (2007). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 13(2), 214-221.

Dave, K.R., Katyare, S.S. (2002). Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterase in the rat. *Journal of Endocrinology*, 175, 241-250.

Delfino, R.T., Ribeiro, T.S., Figueroa-Villar, J.D. (2009). Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(3), 407-428.

Desco, M.C., Asensi, M., Márquez, R., Martínez-Valls, J., Vento, M., Pallardó, F., Sastre, J., Viña, J. (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*, 51, 1118–1124.

Dominguez, C., Ruiz, E., Gussinye, M., Carrascosa, A. (1998). Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*, 21, 1736–1742.

Ellman, G.L., Callaway, E., Andres, K.D. (1961). A new and rapide colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.

Faure, P., Benhamou, P.Y., Perard, A., Halimi, S., Roussel, A.M. (1995). Lipid peroxidation in insulin dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: Effects of an oral zinc supplementation. *European journal of clinical nutrition*, 49, 282-288.

Federico, A., Trappoliere, M., Loguercio, C. (2006). Treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: Current views and perspectives. *Digestive and Liver Disease*, 38, 789–801.

Garcia, S.C., Schott, K.L., Charão, M.F., Moro, A.M., Bulcão, R., Grotto, D., Valentini, J., Bohrer, D., Cardoso, S., Pomblum, V.J. (2008a). Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes haemodialysis patients. *Biomedical Chromatography*, 22(5), 460-468.

Garcia, S.C., Wyse, A.T.S., Valentini, J., Roehrs, M., Moro, A.M., Paniz, C., Schmitt, G., Grotto, D., Pomblum, V.J. (2008b). Butyrylcholinesterase activity is reduced in haemodialysis patients: Is there association with hyperhomocysteinemia and/or oxidative stress? *Clinical Biochemistry*, 41, 474-479.

Gillery, P., Monboissa, J.C., Mauquart, F.X., Borel, J.P. (1989). Does oxygen free radical increased formation explain long term complications of diabetes mellitus. *Medical Hypothesis*, 29, 47-50.

Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M.F., Moro, A.M., Nascimento, P.C., Pomblum, V.J., Garcia, S.C. (2006). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography- visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(2), 619-624.

Guo, Z., Xia, Z., Jiang, J., McNeill, J. (2007). Downregulation of NADPH oxidase, antioxidant enzymes and inflammatory markers in the heart of streptozotocin-induced diabetics rats by N-acetyl-L-cysteine. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 292, H1728-H1736.

Haber, C.A., Lam, T.K.T., Yu, Z., Gupta, N., Goh, T., Bogdanovic, E., Giacca, A., Fantus, I.G. (2003). N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285, E744-E752.

Haidara, M.A., Mikhailidis, D.P., Rateb, M.A., Ahmed, Z.A., Yassin, H.Z., Ibrahim, I.M., Rashed, L.A. (2009). Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced Type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 23, 130-136.

Halliwell, B., Gutteridge, J.C. (2000). Free Radicals and antioxidants in the year 2000. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-147.

Hunt, J.V., Smith, C.C., Wolff, S.P. (1990). Auto oxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*, 39, 1420-1424.

Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H.Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., Nawata, H. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49, 1939–1945.

Iwasaki, T., Yoneda, M., Nakajima, A., Terauchi, Y. (2007). Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Internal Medicine*, 46(19), 1633-1639.

Jain, A.K., Lim, G., Langford, M., Jain, S.K. (2002). Effect of high-glucose levels on protein oxidation in cultured lens cells and in crystalline and albumin solution and its inhibition by vitamin B6 and N-acetylcysteine: Its possible relevance to cataract formation in diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(12), 1615–1621.

Kamboj, S.S., Chopra, K., Sandhir, R. (2008). Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Metabolic Brain Disease*, 23, 427-443.

Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J.I., Matsuoka, T.A., Fujitani, Y., Yutaka, U., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., Hori, M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes: Possible protection of pancreatic b-cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 48, 2398-2406.

Kannel, W.B. & McGee, D.L. (1979). Diabetes and cardiovascular disease: The Framingham study. *The Journal of American Medical Association*, 241, 2035–2038.

Kelly, G.S. (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alternative Medicine Review*, 3(2), 114-127.

Kessavulu, M.M., Giri, R., Rao, B.K., Apparao, C. (2000). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complication. *Diabetes & Metabolism*, 26, 387-392.

Kim, H., Seo, J.Y., Roh, K.H., Lim, J.W., Kim, K.H. (2000). Suppression of NF- $\kappa$ B activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radical & Medicine*, 29(7), 674-683.

Koga, M., Miyata, H., Tsuno, N., Nakayama, K., Ushijima, S., Tanaka, Y., Hiraga, Y., Kobayashi, N. (1997). Relationship between cholinergic symptoms caused by distigmine and the activities of serum AChE and BuChE. *Japanese Journal of Psychopharmacology*, 17(3), 143-147. *In Japanese*.

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, K., Olczyk, P., Winsz-Szczotka, K. (2005). Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 68, 207-216.

Lazárová, M., Stejskal, D., Lacnac, B., Václavik, J., Adamovská, S., Ochmanová, R., Hanák, V., Skácelová, M. (2004). The antioxidant acetylcysteine reduces oxidative stress by decreasing level of AOPPs. *Biomedical Papers*, 148(2), 131-133.

Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51, 216-226.

Maritim, A.C., Sandres, R.A., Watkins, J.B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and Antioxidants: A Review. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 17, 24-38.

Maxwell, S.R. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 39, 345-361.

Mazzanti, C.M., Schossler, D.R., Fillapi, A., Prestes, D., Balz, D., Morsch, A., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Cecim, M. (2003). *Syzygium cumini* Baker extract in controlling glycemia and oxidative stress of normal and diabetic rats. *Ciência Rural*, 33(6), 1061-1066. *In Portuguese*.

Mazzanti, C.M., Schossler, D.R., Filappi, A., Prestes, D., Silva, A.C., Correa, M., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Lunkes, G., Gonzaga, W.A., Cecim, M. (2004). *Syzygium cumini* bark extract effect on acetylcholinesterase activity in normal and diabetic rats. *Ciência Rural*, 34(3), 803-807. *In Portuguese*.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6056-6063.

Ndahimana, J., Dorchy, H., Vertongen, E.C. (1996). Erythrocyte and plasma antioxidant activity in type I diabetes mellitus. *Presse Médicale*, 25, 188-192. *In French*.

Odetti, P., Pesce, C., Traverso, N., Menini, S., Maineri, E.P., Cosso, L., Valentini, S., Patriarca, S., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A. (2003). Comparative trial of *N*-acetyl-cysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. *Diabetes*, 2, 499-505.

Pacher, P., Szabo, C. (2005). Role of poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7, 1568–1580.

Patriarca, S., Furfaro, A.L., Domenicotti, C., Odetti, P., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Traverso, N. (2005). Supplementation with *N*-acetylcysteine and taurine failed to restore glutathione content in liver of streptozotocin-induced diabetics rats but protected from oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1741, 48 – 54.

Pieper, G.M., Siebeneich, W. (1998). Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 32(1), 101-105.

Poonam, Y., Sarkar, S., Bhatnagar, D. (1997). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes and tissues in aged diabetics rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 35, 389-392.

Ramakrishna, V., Jailkhani, R. (2007). Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. *Diagnostic Pathology*, 2(22), 1-6.

Rao, B.K., Kesavulu, M.M., Apparao, C.H. (2001). Antihyperglycemic activity of *Momordica cymbalaria* in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, 67-71.

Rocha, K.K.R.R., Souza, G.A., Fukuju, M., Galhardi, C.M., Faine, L.A., Rodrigues, H.G., Ebaid, G.M.X., Diniz, Y.S., Novelli Filho, J.L.V.B., Novelli, E.L.B. (2005). Effects of N-acetylcysteine (NAC) on hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress induced by carbohydrate-rich diet. *Diabetes Clínica*, 3, 72-76. *In Portuguese*.

Rolo, A.P., Palmeira, C.M. (2006). Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212, 167-178.

Sagristá, M.L., García, A.F., Madariaga, A., Mora, M. (2002). Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 36(3), 329-340.

Sakurai, K., Miura, T. (1989). Generation of free radicals by alloxan in the presence of bovine serum albumin: a role of protein sulfhydryl groups in alloxan cytotoxicity. *Biochemistry International*, 19, 405-412.

Selvam, R., Anuradha, C.V. (1988). Lipid peroxidation and anti peroxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 25, 268-272.

Sen, P.B., Bhattacharya, G. (1952). Reversal of the diabetogenic action of alloxan by sulfhydryl compounds. *Science*, 115, 41–43.

Schmatz, R., Mazzanti, C.M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Corrêa, M., Rosa, M.M., Rubin, M.A., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M. (2009). Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 610(1-3), 42-48.

Sprong, R.C., Winkelhuyzen-Janssen, A.M.L., Aarsman, C.J.M., Oirschott, J.F.L.M., Bruggen, T., Asbeck, B.S. (1998). Low dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157, 1283-1293.

Szkudelski, T., Kandulska, K., Okulicz, M. (1998). Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 47, 343-346.

Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*, 50, 536-546.

Telci, A., Çakatay, U., Salman, S., Satman, I., Sivas, A. (2000). Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 50, 213-223.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 329, 977–986.



Trimarchi, H., Mongitore, M.R., Baglioni, P., Forrester, B., Freixas, M., Schropp, M., Pereira, H., Alonso, M. (2003). N-Acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients – a pilot study. *Clinical Nephrology*, 59, 441-446.

Urata, Y., Yamamoto, H., Goto, S., Tsushima, H., Akazawa, S., Yamashita, S., Nagataki, S., Kondo, T. (1996). Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 15146-15152.

Voss, P., Siems, W. (2006). Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radical Research*, 40, 1339–1349.

Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 77, 325–333.

West, J., Brouil, J., Gazis, A., Jackson, L., Mansell, P., Bennett, A., Aithal, G.P. (2006). Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *The Quarterly Journal of Medicine*, 99, 871-876.

Wolff, S.P., Dean, R.T. (1987). Glucose auto oxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *The Biochemical Journal*, 245, 243–250.

## Legends

Figure 1. Malondialdehyde levels in plasma of rats measured by HPLC ( $\mu\text{mol/L}$ ). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means $\pm$ S.E.M. (n= 6 samples/ group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ).

Figure 2. Erythrocyte glutathione in total blood of rats quantified by HPLC-UV ( $\mu\text{mol/g Hb}$ ). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means $\pm$ S.E.M. (n = 6 samples/ group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ).

Figure 3. Superoxide dismutase activity in total blood of rats using epinephrine as substrate (U SOD/ mg Hb). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means $\pm$ S.E.M. (n = 6 samples/ group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ).

Figure 4. Butyrylcholinesterase activity in total blood of rats using propionyl choline as substrate (mM enzyme/ min/ mg protein). Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC. Bars represent means $\pm$ S.E.M. (n = 6 samples/ group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ).

Table 1. Onset and final glucose and glycated hemoglobin levels of alloxan-induced diabetic rats treated with NAC.

Groups	Onset Glucose (mg/dl)	End glucose (mg/dl)	Glycated hemoglobin (% HbA1C)
I	69.50 ± 3.52	69.25 ± 3.40	4.04 ± 0.12
II	68.60 ± 1.60	60.00 ± 1.76	3.71 ± 0.06
III	66.11 ± 2.51	65.20 ± 3.00	3.90 ± 0.10
IV	347.66 ± 34.26*	400.33 ± 26.02*	15.57 ± 0.90*
V	347 ± 13.98*	415.42 ± 13.14*	16.10 ± 0.45*
VI	337 ± 26.79*	379.60 ± 33.91*	14.85 ± 1.18*

Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC (n = 6 samples/ group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ). Result are expressed as mean ± S.E.M.

Table 2. Onset and final body weight, hemoglobin and hematocrite of alloxan-induced diabetic rats treated with NAC.

Groups	Onset weight (grams)	End weight (grams)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)
I	332 ± 8.53	325 ± 11.90	13.71 ± 0.23	46 ± 0.70
II	334 ± 37.36	370 ± 24.89	14.78 ± 0.61	46 ± 0.54
III	332 ± 6.63	332 ± 5.83	14.45 ± 0.52	47.4 ± 2.29
IV	240 ± 5.77*	226 ± 8.82*	16.26 ± 1.49	47.33 ± 1.20
V	228.57 ± 12.03*	194.28 ± 10.87*	15.72 ± 0.89	45.28 ± 1.35
VI	216 ± 7.48*	182 ± 9.69*	15.57 ± 0.56	49.4 ± 2.25

Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC (n = 6 samples/ group).\* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ). Results are expressed as mean ± S.E.M.

Table 3.  $\gamma$ -GT, TGO, TGP, creatinine and urea of alloxan-induced diabetic rats treated with NAC.

Groups	$\gamma$ -GT (UI/ L)	TGO (UI/ L)	TGP (UI/ L)	Creatinine (mg/ dl)	Urea (mg/ dl)
I	2.97 $\pm$ 0.42	36.75 $\pm$ 4.49	21.75 $\pm$ 1.03	0.45 $\pm$ 0.028	47.67 $\pm$ 5.71
II	2.53 $\pm$ 0.19	36.44 $\pm$ 6.34	22.00 $\pm$ 1.55	0.46 $\pm$ 0.024	42.51 $\pm$ 2.87
III	2.68 $\pm$ 0.19	29.50 $\pm$ 2.88	22.80 $\pm$ 1.06	0.40 $\pm$ 0.010	49.56 $\pm$ 6.15
IV	3.46 $\pm$ 0.23	29.56 $\pm$ 3.94	29.33 $\pm$ 0.33	0.60 $\pm$ 0.057	152.50 $\pm$ 0.90*
V	4.31 $\pm$ 0.40	37.69 $\pm$ 6.86	25.85 $\pm$ 1.62	0.55 $\pm$ 0.020	136.54 $\pm$ 9.06*
VI	3.70 $\pm$ 0.61	46.27 $\pm$ 2.04	26.75 $\pm$ 2.25	0.52 $\pm$ 0.020	172.42 $\pm$ 18.06*

Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC (n = 6 samples/ group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ). Result are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

Table 4. Catalase and GPx activities of alloxan-induced diabetic rats treated with NAC.

Groups	Catalase (K/ g Hb)	GPx ( $\mu$ mol NADPH/ min/ g Hb)
I	39.82 $\pm$ 2.85	38.86 $\pm$ 4.54
II	35.80 $\pm$ 0.90	33.52 $\pm$ 1.28
III	34.65 $\pm$ 3.87	36.01 $\pm$ 3.08
IV	30.00 $\pm$ 5.22	34.00 $\pm$ 1.21
V	31.64 $\pm$ 3.29	39.74 $\pm$ 2.27
VI	29.66 $\pm$ 2.22	39.93 $\pm$ 1.49

Group I - Control (saline); Group II – Control 25 mg/Kg NAC; Group III – Control 75 mg/kg NAC; Group IV- Diabetic (saline); Group V- Diabetic 25 mg/Kg NAC; VI - Diabetic 75 mg/Kg NAC (n = 6 samples/ group). \* Significantly different from control/saline group ( $P<.05$ ); \*\* Significantly different from diabetic/saline group ( $P<.05$ ). Result are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

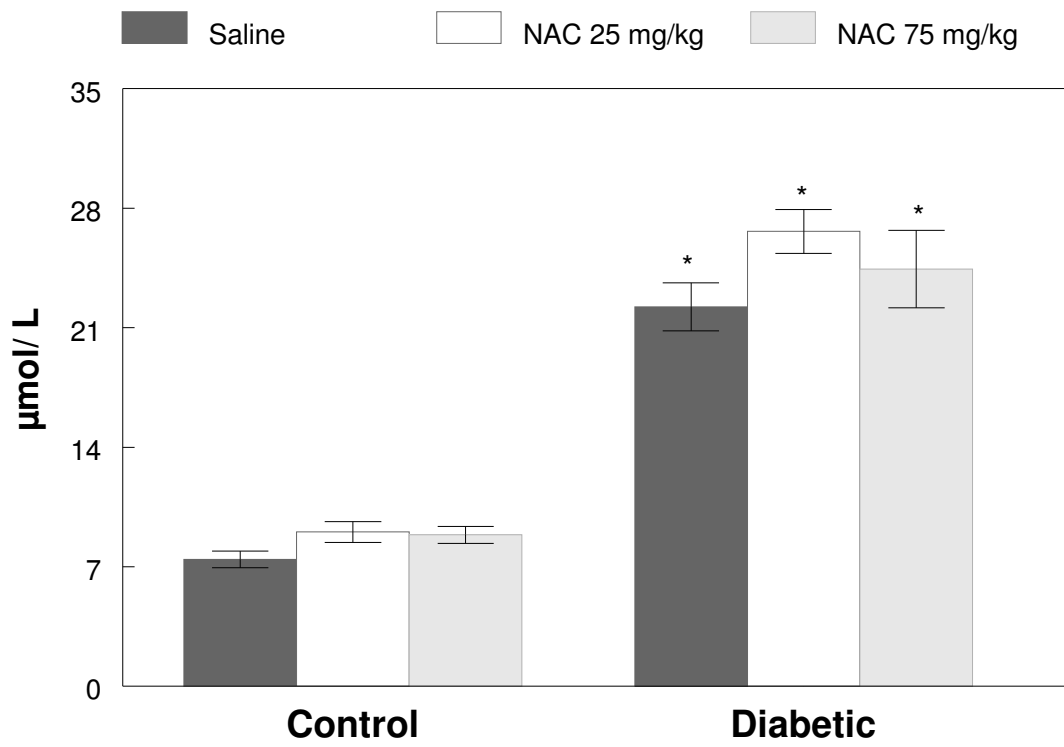


Figure 1

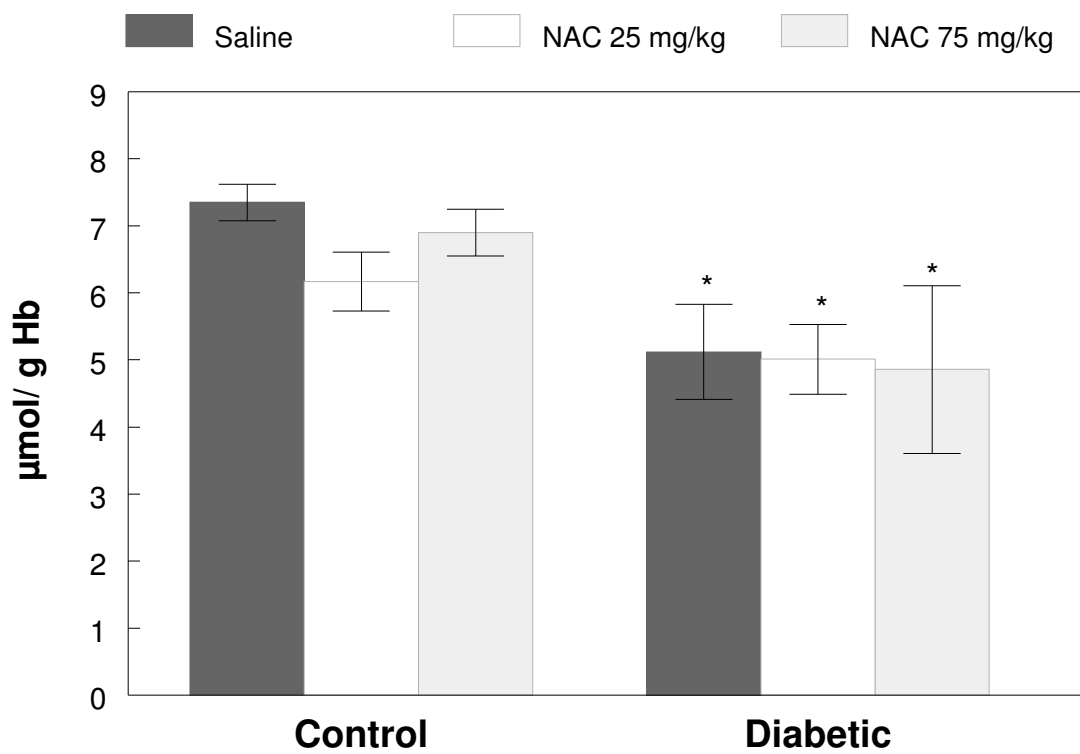


Figure 2

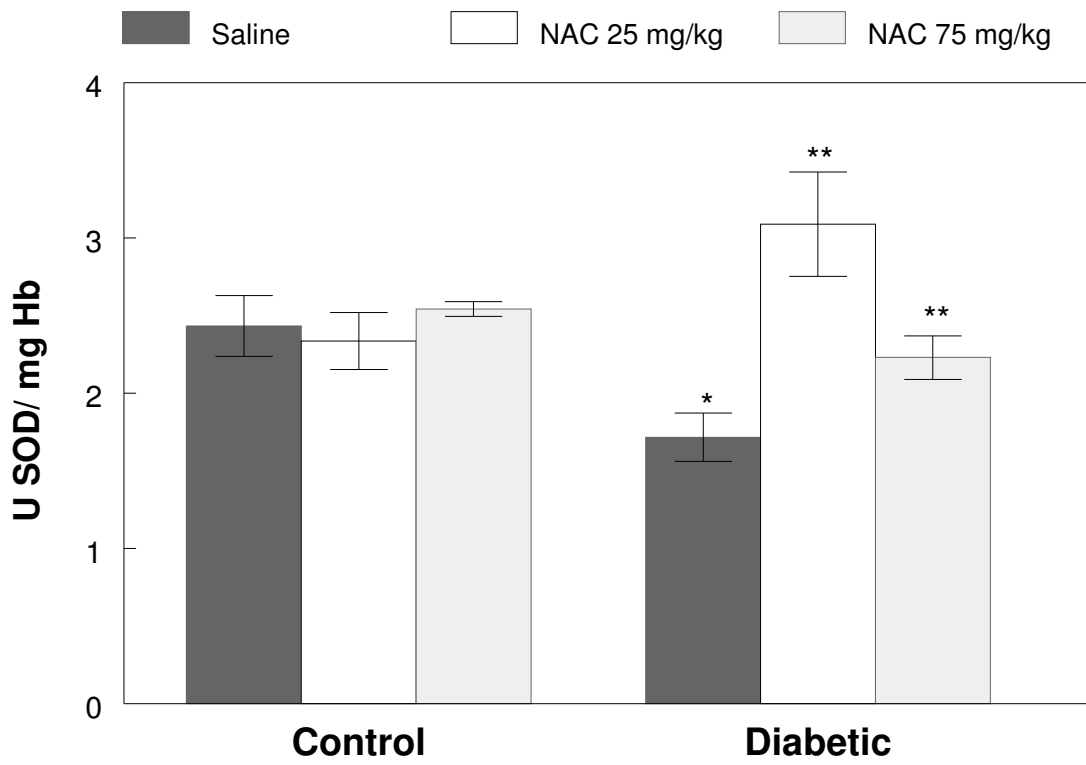


Figure 3

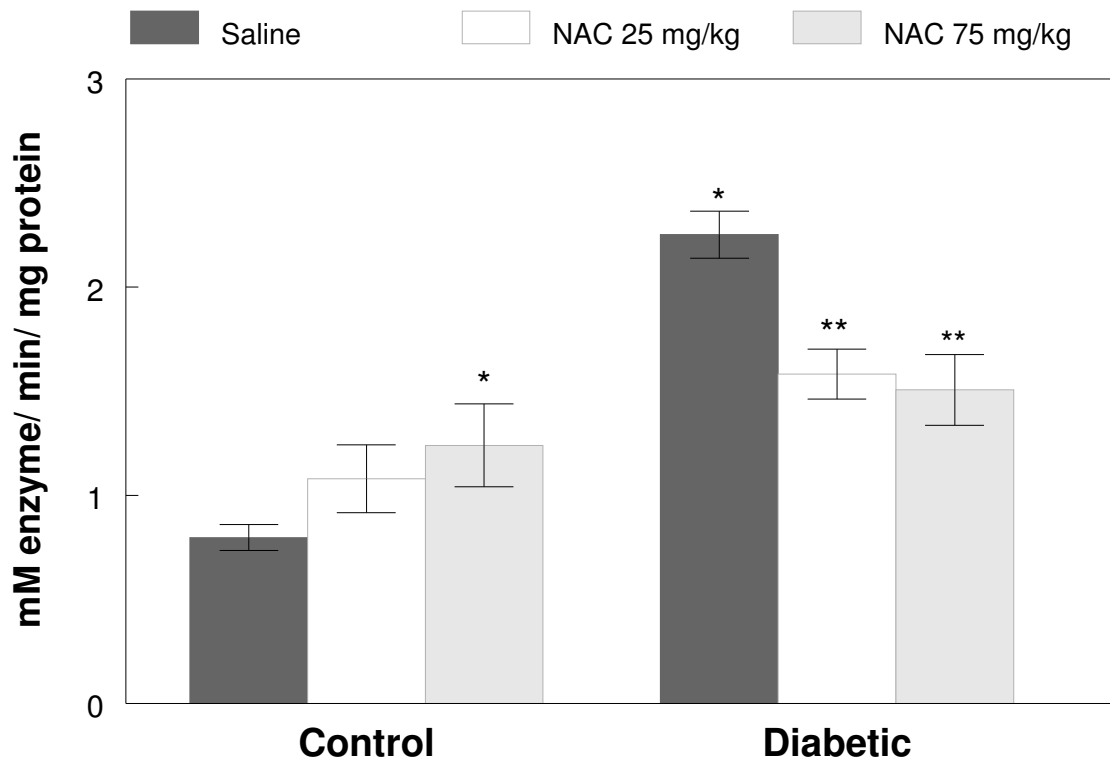


Figure 4

## 5. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é largamente associado com as complicações secundárias da DM e pode causar problemas vasculares periféricos e cerebrais, além de outros danos ao resto do organismo (KANNEL & MCGEE, 1979; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; ROLO & PALMEIRA, 2006). Por isso sugerem-se terapias antioxidantes como a N-acetilcisteína, uma substância com a capacidade de combater as EROs, restaurar os níveis de GSH e também de enzimas antioxidantes em várias patologias, inclusive no diabetes mellitus (AKERLUND et al., 1996; TRIMARCHI et al., 2003; COYLE et al., 2006; KAMBOJ et al., 2008).

Desta maneira, este estudo analisou o possível efeito da NAC nas doses de 25 mg e 75 mg/kg, administradas via intraperitoneal, sobre a glicemia, hemoglobina glicada, biomarcadores de função renal e hepática, biomarcadores do estresse oxidativo e atividade sérica da butirilcolinesterase em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano.

Os ratos diabéticos apresentaram um aumento significativo da glicemia com a concomitante redução de peso dos animais. Nestes animais, a suplementação com NAC não foi capaz de diminuir a concentração de glicose sanguínea e tampouco a hemoglobina glicada se comparado ao grupo diabético salina, como outros estudos tinham já constatado em humanos (LAZÁROVÁ et al., 2004) e animais (PIEPER & SIEBENEICH, 1998; ROCHA et al., 2005). Sugere-se que após destruição das células beta pancreáticas, a NAC não obteve seu potencial terapêutico sobre as ilhotas de Langerhans e conseqüentemente na hiperglicemia (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008). Provavelmente a única maneira de diminuir o status glicêmico neste modelo animal de diabetes seria através de uma injeção simultânea do antioxidante com aloxano na tentativa de reduzir esse xenobiótico a nível extracelular, e assim permitir um menor acúmulo intracelular, evitando a necrose das ilhotas de Langerhans (SEN & BHATTACHARYA, 1952; SAKURAI & MIURA, 1989).

Por outro lado, o tratamento com NAC tem demonstrado um aumento do controle da glicemia em camundongos, diminuindo a resistência à insulina causada pela hiperglicemia em ratos através de modelos experimentais de DM tipo 2. Esses resultados provavelmente devem-se à preservação das células beta pancreáticas e de suas funções graças a NAC que combateu os radicais livres que atacariam o

pâncreas (KANETO et al., 1999; HABER et al., 2003). Diante disso, sugere-se que este composto somente teria efeitos positivos sobre a hiperglicemia no DM tipo 2 e em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina conforme discutido por outros pesquisadores (KANETO et al., 1999; ODETTI et al., 2003; HABER et al., 2003; GUO et al., 2007).

Em relação aos biomarcadores de função hepática, alguns estudos têm demonstrado alterações das concentrações séricas de transaminases e  $\gamma$ -GT em pacientes diabéticos (WEST et al., 2006) e ratos (AL-SHAMSI et al., 2006). FEDERICO et al (2006) verificou que o tratamento com NAC foi capaz de reestabelecer os valores normais das enzimas de função hepática em pacientes diabéticos. Nossos resultados demonstraram que a suplementação com NAC não alterou os níveis de TGO, TGP e  $\gamma$ -GT em nenhum grupo. Além disso, os biomarcadores de função renal não foram afetados por esta droga, já que os níveis séricos de creatinina e uréia mantiveram-se altos se comparados ao grupo controle, como já havia sido descrito por ODETTI et al (2003).

No diabetes mellitus ocorrem mudanças no controle oxidativo, principalmente ao que se refere à lipoperoxidação. O malondialdeído, um biomarcador sensível e específico que reflete o dano das membranas celulares, apresenta altas concentrações no DM (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2005; HAIDARA et al., 2009). As alterações nos níveis de MDA indicam o real status redox *in vivo* (VOSS & SIEMS, 2006). Em nosso experimento, os níveis de MDA plasmático apresentaram pequena elevação nos ratos com glicemia normal tratados com NAC, porém estatisticamente não significativo, quando comparados ao grupo controle/salina. Além disso, nossos dados indicam que o tratamento com a NAC não afetou as concentrações de MDA nos ratos diabéticos, provavelmente devido a persistente hiperglicemia com a subsequente formação de  $H_2O_2$  e radicais  $\cdot OH$  associado a um desequilíbrio no sistema antioxidante que é comum no DM.

Em relação ao status das enzimas antioxidantes, seus níveis sanguíneos são controversos no diabetes mellitus. As enzimas antioxidantes que tem maior poder de combate contra as espécies reativas são a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007). Estudos anteriores indicam que o estado hiperglicêmico promove redução na atividade da SOD eritrocitária em humanos (KESAVULU et al., 2000; RAMAKRISHNA &



JAILKHANI, 2007). O decréscimo na atividade da SOD acontece no diabetes crônico, mas no princípio da doença ocorre uma elevação dos níveis da SOD como resposta ao insulto oxidativo e conforme a progressão do DM, a atividade desta enzima decresce por causa da glicação não enzimática nos eritrócitos (ARAI et al., 1987).

Os níveis de SOD eritrocitária apresentaram-se aumentados em ratos diabéticos que receberam suplementação com NAC, quando comparado ao grupo diabético/ salina. Sugere-se que este aumento tenha sido devido à capacidade do NAC em evitar a glicação não enzimática sobre a SOD eritrocitária. Conseqüentemente, a NAC promoveu uma ação pró-antioxidante mais rapidamente nesta enzima do que na catalase e glutathione peroxidase analisadas neste trabalho. Neste caso, a concentração elevada de SOD nestes ratos atuaram diretamente contra os ânions superóxidos produzidos na DM, aumentando as concentrações de  $H_2O_2$  devido a conversão de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Porém, os níveis de GSH e catalase não aumentaram após o tratamento e por isso não foram capazes de acompanhar a velocidade de formação de  $H_2O_2$  que é oriundo do processo de desintoxicação da SOD.

Outra enzima antioxidante responsável pela desintoxicação de EROs é a catalase, responsável pela degradação de  $H_2O_2$  para  $O_2$  e  $H_2O$ . No DM, os níveis eritrocitários de catalase podem estar diminuídos (SELVAM & ANURADHA, 1988), inalterados (POONAM et al., 1997) e aumentados (RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007). Em nosso estudo, os níveis de catalase não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Entretanto, esta enzima apresentou menor atividade em animais controle tratados com NAC se comparada ao grupo controle salina. Estes dados indicam que a NAC agiu como um agente pró-oxidante, possivelmente através da reação dependente de  $Fe^{2+} / H_2O_2$  e conseqüentemente o decréscimo dos níveis de catalase afetaram negativamente a decomposição de  $H_2O_2$  (SAGRISTÁ et al., 2002).

Os níveis eritrocitários de catalase não aumentaram nos ratos tratados com NAC, provavelmente devido a uma elevação da formação de  $H_2O_2$  e radicais  $OH\cdot$  decorrente da elevada concentração de SOD nestes animais. Este processo pode ter inibido a restauração dos níveis de catalase nestes grupos e conseqüentemente impediu o efetivo processo de desintoxicação das outras EROs, indicando que a

suplementação com NAC no DM não apresentou efeitos benéficos sobre esta enzima.

Além da catalase, a glutathione peroxidase (GPx) também está envolvida no processo de degradação de  $H_2O_2$  para  $O_2$  e  $H_2O$  e também glutathione oxidada (GSSG). Os níveis eritrocitários de GPx no diabetes mellitus pode estar aumentada (NDAHIMANA et al., 1996), diminuída (RAMAKRISHNA & JAILKHANI, 2007; KAMBOJ et al., 2008) ou inalterada (FAURE et al., 1995).

A concentração de GPx apresentou um pequeno aumento nos ratos diabéticos tratados com NAC que pode ser uma resposta causada por uma elevação das concentrações de  $H_2O_2$ , apesar de não ter ocorrido diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Isto demonstra que os níveis de GPx destes animais sofreram uma influência benéfica da NAC em uma tentativa de conter o excesso de  $H_2O_2$  enquanto a catalase permanece com baixos níveis. Porém, não ocorreu elevação da concentração de GSH destes ratos. Provavelmente a atividade da GPx favoreceu o aumento da glutathione oxidada (GSSG) durante o processo de desintoxicação das EROs.

A glutathione reduzida (GSH) é um antioxidante endógeno com o principal grupamento sulfidrílico participante da reação redox celular (DOMINGUEZ et al., 1998). De acordo com estudos anteriores, o diabetes mellitus promove a depleção da GSH (DOMINGUEZ et al 1998; TELCI et al., 2000; MARITIM et al., 2003; KAMBOJ et al., 2008). Surpreendentemente, o tratamento com NAC nos grupos diabéticos falhou em restaurar os níveis de GSH eritrocitária. Isto foi um resultado inesperado, pois a literatura descreve a NAC como um precursor metabólico da GSH que tem sido usado para reestabelecer os níveis de GSH (ARUOMA et al., 1989).

Possivelmente os ratos diabéticos apresentam dificuldades na síntese da GSH, conforme já foi relatado por URATA et al (1996). Entretanto, a pequena elevação dos níveis de GPx nestes animais permitiu um aumento da razão GSSG/GSH e provavelmente a NAC não foi uma efetiva pró-droga precursora da GSH. PATRIARCA et al (2005) demonstraram que a NAC também falhou em reestabelecer os níveis de GSH, e isto poderia ser atribuído a um desequilíbrio entre a síntese de GSH e consumo da mesma, onde o alto consumo de GSH diminuiria sua concentração mesmo na presença de um substrato como NAC para a síntese. Todos estes aspectos poderiam estar envolvidos na diminuição dos níveis de GSH eritrocitária e conseqüentemente nas altas concentrações de MDA.

A acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) são enzimas que catalizam a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, uma peça importante na regulação da neurotransmissão colinérgica (DARVESH et al., 2003). Alguns autores têm estudado a relação das atividades de AChE e BuChE com a diabetes mellitus em humanos (ABBOT et al., 1993; IWASAKI et al., 2007) e animais (DAVE & KATYARE, 2002; MAZZANTI et al., 2004; KAMBOJ et al., 2008; SCHMATZ et al., 2009). DAVE & KATYARE (2002) demonstraram que ratos diabéticos tratados com insulina exógena não apresentaram diminuição dos níveis de BuChE, o que indica que este hormônio não afeta diretamente os níveis desta enzima colinérgica.

Em nosso estudo altas concentrações de BuChE sérica foram encontradas em ratos diabéticos, se comparado aos animais com glicemia normal, o que está de acordo com a literatura (DAVE & KATYARE, 2002). Entretanto, uma significativa diminuição dos níveis de BuChE sérica foi observada em ratos diabéticos tratados com NAC. Por outro lado, este tratamento foi capaz de aumentar os níveis desta enzima no grupo controle na dose de 75 mg/kg. Isto sugere que a suplementação com NAC em ratos de glicemia normal poderia estar alterando a neurotransmissão colinérgica.

Apesar do desconhecimento sobre a causa fisiológica para o aumento dos níveis séricos de BuChE, evidências indicam que a elevação da concentração desta enzima pode ser uma resposta ao perfil lipídico sérico e/ou formas cardíacas solúveis de BuChE (DAVE & KATYARE, 2002; IWASAKI et al., 2007). Entretanto, a hiperglicemia persistente leva a um estresse oxidativo com o aumento da produção de EROs (ROLO & PALMEIRA, 2006), e esta situação promove aumento dos fatores inflamatórios (GUO et al., 2007). De acordo com DAS (2007), tanto AChE quanto BuChE são possíveis marcadores do sistema inflamatório porque a acetilcolina apresenta ação antiinflamatória além de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (BOROVIKOVA et al., 2000).

Isso indica que a altas concentrações de AChE e BuChE observada no diabetes mellitus pode estar relacionada a uma redução da ação antiinflamatória exercida pelo decréscimo do níveis de acetilcolina. GUO et al (2007) demonstraram que a NAC diminuiu fatores inflamatórios através da diminuição da produção de EROs. Em nosso estudo, a NAC pode ter diminuído a concentração sérica de BuChE em ratos diabéticos através da redução de fatores inflamatórios, pois a NAC já apresentou ação antiinflamatória específica *in vitro* na concentração de 1 mM

(KIM et al., 2000) e *in vivo* com administração oral em concentrações variando de 1,4 a 4 g/kg peso corporal (HO et al., 1999; CHEN et al., 2007). Além disso, os ratos diabéticos que foram tratados com a NAC não apresentaram diminuição dos níveis plasmáticos de MDA tampouco aumento da concentração eritrocitária de GSH, mas demonstraram uma elevação na concentração da SOD. Provavelmente a SOD poderia estar indiretamente relacionada com a diminuição dos níveis de BuChE em ratos diabéticos após administração de NAC.

Em nosso estudo sugerimos que o tratamento com NAC causou aumento dos níveis de SOD eritrocitária em ratos diabéticos o que poderia estar associado com a inibição dos fatores inflamatórios e produção de citocinas, e conseqüentemente com a diminuição sérica da concentração de BuChE nestes animais. Entretanto, não houve mudanças no sistema antioxidante, o que nos leva a inferir que a NAC tenha diminuído os níveis de BuChE nos ratos diabéticos possivelmente atuando de forma direta nos fatores inflamatórios e na produção de citocinas independente da geração de EROs.

## **6. CONCLUSÕES**

Demonstrou-se que a aplicação intraperitoneal de NAC nas doses de 25 e 75 mg/kg em ratos diabéticos induzidos por aloxano e normais não afetou significativamente os níveis sanguíneos de glicose e hemoglobina glicada.

O tratamento com NAC não alterou as concentrações séricas dos biomarcadores de função renal (uréia e creatinina) e hepática (gama-glutamil transferase e alanina e aspartato transaminase) em nenhum grupo de ratos do experimento.

A administração de NAC em ratos diabéticos induzidos com aloxano não foi capaz de restabelecer o sistema antioxidante e tampouco protegeu contra as espécies reativas de oxigênio nas concentrações e forma de aplicação estudada. Este fato foi verificado pelas altas concentrações de malondialdeído plasmática e pelos baixos níveis sanguíneos de catalase, glutathione peroxidase e glutathione reduzida.

A elevação dos níveis de SOD eritrocitária e diminuição dos níveis séricos de BuChE dos grupos diabéticos que receberam NAC demonstrou que estas enzimas têm uma associação indireta neste modelo experimental de diabetes quando sofrem a influência de uma terapia com um composto sulfidrílico. Assim, mais estudos são necessários para investigar a ação da NAC sobre os níveis de SOD e BuChE e seu relacionamento com o estado diabético, pois verificou-se que estas enzimas têm um papel importante nesta doença, principalmente no que se refere a ações antiinflamatórias e supressão de citocinas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S.; OLUKOGA, A.O.; GORDON, C.; ARROL, S.; BHATNAGAR, D.; BOULTON, A.J.; DURRINGTON, P.N. Relationship between butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. **Clinical Science**, v. 85 (1), p. 77-81, 1993.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKERLUND, B.; JARSTRAND, C.; LINDEKE, B.; SONNEBORG, A.; AKERBLAD, A.-C.; RASOOL, O. Effect of N-acetylcysteine (NAC) treatment on HIV-1 infection: a double-blind placebo-controlled trial. **European Journal of Clinical Pharmacology**, 50 (6), p. 457-461, 1996.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care for diabetes. **Diabetes Care**, v. 17, p. 1514-1522, 2007.

ANANTHAN, R.; BASKAR, C.; NARMATHABAI, V.; PARI, L.; LATHA, M.; RAMKUMAR, K.M. Antidiabetic effect of *Gymnema montanum* leaves: effect on lipid peroxidation induced oxidative stress in experimental diabetes. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 551-556, 2003.

ALESSIO, H.M.; HANNINEN, O.; PACKER, L.; et al. **Handbook of oxidants and antioxidants in exercise**. Elsevier, p. 115-128, 2000.

ALMADA FILHO, C. M. Antioxidantes e radicais livres. In: FREITAS, E. V.; PY, L.; NERI, A. L.; CANÇADO, F. A. X.; GORZONI, M. L.; ROCHA, S. M. **Tratado de geriatria e gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2002. Cap. 89, p. 744-748.

AL-SHAMSI, M.; AMIN, A.; ADEGHATE, E. Vitamin E ameliorates some biochemical parameters in normal and diabetic rats. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1084, p. 411-431, 2006.

ARAI, K.; MAGUCHI, S.; FUJII, S.; ISHIBASHI, H.; OIKAWA, K.; TANIGUCHI, N. Glycation and inactivation of human Cu-Zn superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, p. 16969-16972, 1987.

ARNER, P.; LITHELL, H.H.; WAHRENBERG, H.; BRONNEGARD, M. Body composition and obesity. **Journal of Lipid Research**, v. 32, p. 423-429, 1991.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 6, p. 593-597, 1989.

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

ATKURI, K.R.; MANTOVANI, J.J.; HERZENBERG, L.A. N-Acetylcysteine — a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 355-359, 2007.

BANNER, W.Jr.; KOCH, M.; CAPIN, D.M. Experimental chelation therapy in chromium, lead, and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 83, p. 142-147, 1986.

BARBOSA, N.B.; ROCHA, J.B.; WONDRACEK, D.C.; PEROTTONI, J.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163 (3), p. 230-238, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29 (1), p. 113-126, 2006.

BEST, B. **N-Acetylcysteine**. Disponível em <<http://www.benbest.com/nutrceut/NAC.jpg>> Acesso em: 28 de setembro de 2009.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; BARREIRO, E.J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**, v. 30 (8), p. 2062-2067, 2007.

BELLÓ, A. **Dano oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres**. Porto Alegre: Editora Ulbra, p. 15-19, 2002.

BERR, C.; RICHARD, M.J.; ROUSSEL, A.M.; KOPP-BONITHON, C. Systemic oxidative stress and cognitive performance in the population-based EVA study. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 1202-1208, 1998.

BIESALSKI, H.K. Free radical theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5 (1), p. 5-10, 2002.

BIESSELS, G.J.; GISPEN, W.H. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? **Neurobiology Aging**, v. 26, p. 36-41, 2005.

BONANOMI, L.; GAZZANIGA, A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **European Journal of Respiratory Diseases**, v. 61, p. 45-51, 1980.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, v. 44 (5), p. 985-988, 1992.

BORGSTROM, L.; KAGEDAL, B.; PAULSEN, O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 217-222, 1986.

BROWNLEE, M. Glycation and diabetic complications. **Diabetes**, v. 43, p. 836-841, 1994.

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

CALDERON-MARGALIT, R.; ADLER, B.; ABRAMSON, J.H.; GOFIN, J.; KARK, J. Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. **Clinical Chemistry**, v. 52 (5), p. 845-852, (2006).

CHEN, C.M.; YIN, M.C.; HSU, C.C.; LIU, T.C. Antioxidant and anti-inflammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP treated mice. **Nutrition**, v. 23, p. 589-597, 2007.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.C.; JORNS, A.; LENZEN, S. Mechanism of: Pancreatic  $\beta$ -Cell Death in Type 1 and Type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. 97-107, 2005.

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



COYLE, L.C.; RODRIGUEZ, A.; JESCHKE, R. E.; SIMON-LEE, A.; ABBOTT, K. C.; TAYLOR, A.J. Acetylcysteine In Diabetes (AID): A randomized study of acetylcysteine for the prevention of contrast nephropathy in diabetics. **American Heart Journal**, v. 151 (5), p. 1032.e9 - 1032.e12, 2006.

CUBAS, E.; VIEIRA, G.; DONIZETTE, J.; GODINHO N.; BORGES R. **Radicais Livres e Antioxidantes**. Disponível em <<http://biobioradicaais.blogspot.com/2008/11/produo-de-radicaais-livres.html>> Acesso em: 28 de setembro de 2009.

CUBAS, E.; FERNANDES, J.; BRANDÃO, N.; SANTOS, P.; PAULA, R.; ELCANA, T. **Radicais Livres, Antioxidantes e Ferro**. Disponível em <[http://3.bp.blogspot.com/\\_XHLtDw9I4gA/Sk9Tpt\\_BVI/AAAAAAAAAXc/3wkKHYxRz8g/s400.gif](http://3.bp.blogspot.com/_XHLtDw9I4gA/Sk9Tpt_BVI/AAAAAAAAAXc/3wkKHYxRz8g/s400.gif)> Acesso em: 28 de setembro de 2009.

ÇAKATAY, U.; TELCI, A.; KAYALI, R.; ERDOGAN, C.; ORHAN, Y.; SIVAS, A.; AKÇAY, T. Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications. **Endocrine Research**, v. 26, p. 365–379, 2000.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, p. 131-138, 2003.

DAS, U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 13 (2), p. RA214-221, 2007.

DAVE, K.R.; KATYARE, S.S. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterase in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 175, p. 241-250, 2002.

De CARO, L.; GHIZZI, A.; COSTA, R.; LONGO, A.; VENTRESCA, G.P.; LODOLA, E. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. **Arzneimittel-Forschung**, v. 39, p. 382-385, 1989.

DELFINO, R.T.; RIBEIRO, T.S.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20 (3), p. 407-428, 2009.

De FLORA, S.; ROSSI, G.A.; De FLORA, A. Metabolic, desmutagenic and anticarcinogenic effects of N-acetylcysteine. **Respiration**, v. 50, p. S43-S49, 1986.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15 (4), p. 316-328, 2005.

DERESZ, L.F.; LAZZAROTTO, A.R.; MANFROI, W.C.; GAYA, A.; SPRINZ, E.; OLIVEIRA, A.R.; DALL'AGO, P. Estresse oxidativo e o exercício físico em indivíduos HIV positivo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13 (4), p. 249e-252e, 2007.

DEVLIN, J.; ELLIS, A.E.; MCPEAKE, J.; HEATON, N.F.; WENDON, J.A.; WILLIAMS, R. N-acetylcysteine improves indocyanine green extraction and oxygen transport during hepatic dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 25, p. 236-242, 1997.

De VRIES, N.; De FLORA, S. N-acetyl-L-cysteine. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. F17, p. S270-S277, 1993.

DOMINGUEZ, C.; RUIZ, E.; GUSSINYE, M.; CARRASCOSA, A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. **Diabetes Care**, v. 21, p. 1736-1742, 1998.

DURSUN, E.; TIMUR, M.; DURSUN, B.; SÜLEYMANLAR, G.; OZBEN, T. Protein oxidation in Type 2 diabetic patients on haemodialysis. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 19, p. 142-146, 2005.

FAURE, P.; BENHAMOU, P.Y.; PERARD, A.; HALIMI, S.; ROUSSEL, A.M. Lipid peroxidation in insulin dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: Effects of an oral zinc supplementation. **European journal of clinical nutrition**, v. 49, p. 282-288, 1995.

FEDERICO, A.; TRAPPOLIERE, M.; LOGUERCIO, C. Treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: Current views and perspectives. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. 789-801, 2006.

FERNÁNDEZ-C.B.; REBOLAR, J.L.; BATLLE, A.; ENRIQUE, S.R. Delta aminolevulinatase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31 (3-4), p. 479-488, 1999.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FIORDALISO, F.; BIANCHI, R.; STASZEWSKY, L.; CUCCOVILLO I.; DONI M.; LARAGIONE, T.; SALIO, M.; SAVINO, C.; MELUCCI, S.; SANTANGELO, F.; SCANZIANI, E.; MASSON, S.; GHEZZI, P.; LATINI, R. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 37, p. 959–968, 2004.

FRANCO L.J.; MILECH, A.; BRAGA, C.D.C.; MALERBI, D.; CAMPOS, G.P.; ALMEIDA, L.; SCHMIDT, M.I.; ALBUQUERQUE, R.H. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do Diabetes Mellitus no Brasil. **Ministério da Saúde**. Censo de Diabetes; p. 1-32, 1998.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1-15, 1998.

GANNON, M. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. **Trends in Genetics**, v. 17 (10), p. 23-28, 2001.

GARCIA, S.C.; SCHOTT, K. L.; CHARÃO, M. F. ; MORO, A. M. ; BULCÃO, R.; GROTO, D.; VALENTINI, J.; BOHRER, D.; CARDOSO, S.; POMBLUM, V.J. Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes haemodialysis patients. **Biomedical Chromatography**, v. 22 (5), p. 460-468, 2008.

GARG, M.C.; BANSAL, D.D. Protective antioxidant effect of vitamin C and E in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, p. 101-104, 2000.

GERICH J. E. Determinación del índice de resistencia insulínica mediante HOMA en una población de la Region Metropolitana de Chile. **Endocrinology**, v. 19, p. 477-490, 1998.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills' biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltda, p. 196-202, 1997.

GIORNO, C.; PINHEIRO, H.S.; HEINKE, T.; FRANCO, M.F.; GALANTE, N.Z.; PACHECO-SILVA, A.; CAMARA, N.O.S. Beneficial Effect of N-Acetyl-Cysteine on Renal Injury Triggered by Ischemia and Reperfusion. **Transplantation Proceedings**, v. 38, p. 2774-2776, 2006.

GOLDBERG, H.J.; WHITESIDE, C.I.; FANTUS, I.G. The hexosamine pathway regulates the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and Sp1 transcriptional activation through protein kinase C $\beta$ 1 and  $\gamma$ . **Journal of Biology Chemistry**, v. 277, p. 33833-33841, 2002.

GONZÁLES, R.M.; PUCHADES, M.J.; GARCIA RAMON, R.; SAEZ, G.; TORMOS, M.C.; MIGUEL, A. Effect of hemodiálisis therapy on oxidative stress in patients with chronic renal failure. **Nefrología**, v. 26, p. 218-224, 2006.

GREGORY, S.; KELLY, N.D. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative Medicine Review**, v. 3 (2), p. 114-127, 1998.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; NASCIMENTO, P.C.; POMBLUM, V.J.; GARCIA, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography- visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43 (2), p. 619-624, 2006.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; BOEIRA, S.; PANIZ, C.; SANTA MARIA, L.; VICENTINI, J.; MORO, A.; CHARÃO, M.; GARCIA, S.C. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo-Malondialdeído. **Química Nova**, v. 31 (2), p. 275-279, 2008.

GUILLERMO, Z.; FORUTNO, A.; DIEZ, J. Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 2686-90, 2006.

GUO, Z.; XIA, Z.; JIANG, J.; MCNEILL, J. Downregulation of NADPH oxidase, antioxidant enzymes and inflammatory markers in the heart of streptozotocin-induced diabetics rats by N-acetyl-L-cysteine. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 292, p. H1728-H1736, 2007.

HABER, C.A.; LAM, T.K.T.; YU, Z.; GUPTA, N.; GOH, T.; BOGDANOVIC, E.; GIACCA, A.; FANTUS, I.G. N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 285, p. E744-E752, 2003.

Haidara, M.A.; Mikhailidis, D.P.; Rateb, M.A.; Ahmed, Z.A.; Yassin, H.Z.; Ibrahim, I.M.; Rashed, L.A. Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced Type 1 diabetes. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 23, p. 130-136, 2008.

Halliwel, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

Halliwel, B.; Gutteridge, J.C. Free radicals and antioxidants in the year 2000. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-147, 2000.

Heikkilä, R.E.; Winston, B.; Cohen, G.; Barden, H. Alloxan induced diabetes, evidence for hydroxyl radicals as a cytotoxic intermediate. **Biochemical Pharmacology**, v. 31, p. 3731-3736, 1982.

Hershko, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

Ho, E.; Chen, G.; Bray, T.M. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFκB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. **The Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, p. 1845-1854, 1999.

Inoue, M. Protective mechanism against reactive oxygen species. En: *The Liver. Biology and Pathology*. **Raven Press**, p. 443-60, 1994.

Issels, R.D.; Nagele, A.; Eckert, K.G.; Wilmanns, W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 881-888, 1988.

Iwasaki, T.; Yoneda, M.; Nakajima, A.; Terauchi, Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. **Internal Medicine**, v. 46 (19), p. 1633-1639, 2007.

Jain, A.K.; Lim, G.; Langford, M.; Jain, S.K. Effect of high-glucose levels on protein oxidation in cultured lens cells and in crystalline and albumin solution and its inhibition by vitamin B6 and N-acetylcysteine: Its possible relevance to cataract formation in diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33 (12), p. 1615-1621, 2002.

JAMES, L.R.; TANG, D.; INGRAM, A.; LY, H.; THAI, K.; CAI, L.; SCHOLEY, J.W. Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kB-dependent promoter activation. **Diabetes**, v. 51, p. 1146-1156, 2002.

JORDÃO Jr, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JUNQUEIRA, V.B.C.; RAMOS, L.R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. **Geriatrics e gerontologia**. Barueri : Manole Ltda, 2005. Cap. 24, p. 315-324.

KAMBOJ, S.S.; CHOPRA, K.; SANDHIR, R. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease**, v. 23, p. 427-443, 2008.

KANNEL, W.B. & MCGEE, D.L. Diabetes and cardiovascular disease: The Framingham study. **The Journal of American Medical Association**, v. 241, p. 2035-2038, 1979.

KANETO, H.; KAJIMOTO, Y.; MIYAGAWA, J.-I., MATSUOKA, T.-A.; FUJITANI Y.; YUTAKA, U.; HANAFUSA, T.; MATSUZAWA Y.; YAMASAKI Y.; HORI, M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: Possible protection of pancreatic b-cells against glucose toxicity. **Diabetes**, v. 48, p. 2398-2406, 1999.

KATSUMATA, K.; KATSUMATA, K.Jr.; KATSUMATA, Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan or streptozotocin-induced diabetes in rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 24, p. 508-510, 1992.

KELLY, G.S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative Medicine Review**, v. 3 (2), p. 114-127, 1998.

KELLY, AM.; DWAMENA, B.; CRONIN, P.; BERNSTEIN, SJ; CARLOS, RC. Meta-analysis: Effectiveness of drugs for preventing contrast-induced nephropathy. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, p. 284-294, 2008.

KESAVULU, M.M.; GIRI, R.; KAMESWARA, R.; APPARAO, C.H. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. **Diabetes & Metabolism**, v. 26, p. 387-392, 2000.

KIM, H.; SEO, J.Y.; ROH, K.H.; LIM, J.W.; KIM, K.H. Suppression of NF- $\kappa$ B activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. **Free Radical & Medicine**, v. 29 (7), p. 674-683, 2000.

KLIBER, A.; SZKUDELSKI, T.; CHICHOŁOWSKA, J. Alloxan stimulation and subsequent inhibition of insulin release from in situ perfused rat pancreas. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 47, p. 321-328, 1996.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 68, p. 207-216, 2005.

KOLPEMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 6778, p. 635-643, 2000.

LAURENT, T.; MARKERT, M.; FEIHL, F. Oxidant-antioxidant balance in granulocytes during ARDS. Effects of N-acetylcysteine. **Chest**, v. 109, p. 163-166, 1996.

LAZÁROVÁ, M.; STEJSKAL, D.; LACNAC, B.; VÁCLAVIK, J.; ADAMOVSKÁ, S.; OCHMANOVÁ, R.; HANÁK, V.; SKÁCELOVÁ, M. The antioxidant acetylcysteine reduces oxidative stress by decreasing level of AOPPs. **Biomedical Papers**, v. 148 (2), p. 131-133, 2004.

LENARDÃO, E.J.; BARCELLOS, T.; FREITAG, R.A.; SIQUEIRA, G.M.; PERIN, G.; MOREIRA, D.N.; OSTOSI, N.T.; MIGLIORINI, M.V. **Um módulo de Química Verde**. Disponível em <<http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/biochemistry/biochemistrymoduleport.html>> Acesso em: 28 de setembro de 2009.

LEVIN, A.; PATE, G.E.; SHALANSKY, S.; AL-SHAMARI, A.; WEBB, J.G.; BULLER, C.E.; HUMPHRIES, K.H. N-acetylcysteine reduces urinary albumin excretion following contrast administration: evidence of biological effect. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, p. 2520-2224, 2006.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. 1385-1391, 1991.

LENZEN, S.; MIRZAIE-PETRI, M. Inhibition of glucokinase and hexokinase from pancreatic  $\beta$ -cells and liver by alloxan, alloxantin, dialuric acid and t-butylhydroperoxide. **Biomedical Research**, v. 12, p. 297-307, 1991.

LENZEN, S. The mechanism of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216-226, 2008.

LIN, Y.; BERG, A.H.; IYENGART, P.; LAM, T.K.T.; GIACCA, A.; COMBS, T.P.; RAJALA, M.W.; DU, X.; ROLLMAN, B.; LI, W.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; RHODES, C.J.; FANTUS, I.G.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P.E. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280 (6), p. 4617-4626, 2005.

LOGNARD, M.; CAVALIER, E.; CHAPELLE, J.-P.; LAMBERMONT, B.; KRZESINSKI, J.-M.; DELANAYE, P. Acetylcysteine and enzymatic creatinine: beware of laboratory artefact! **Intensive Care Medicine**, v. 34, p. 973-974, 2008.

MAINRA, R.; GALLO K.; MOIST, L. Effect of N-acetylcysteine on renal function in patients with chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 12, p. 510-513, 2007.

MARITIM, A., C.; SANDRES, R., A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and Antioxidants: A Review. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.

MARTÍN-GALLÁN, P.; CARRASCOSA, A.; GUSSINYÉ, M.; DOMÍNGUEZ, C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34 (12), p. 1563-1574, 2003.

MAXWELL, S.R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v. 39, p. 345-361, 1995.

MAZZANTI, C.M.; SCHOSSLER, D.R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVA, A.C.; CORREA, M.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; LUNKES, G.; GONZAGA, W.A.; CECIM, M. *Syzygium cumini* bark extract effect on acetylcholinesterase activity in normal and diabetic rats. **Ciência Rural**, v. 34 (3), p. 803-807, 2004.

MASSY, Z.A.; NGUYEN – KHOA, T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. **Journal of Nephrology**, v. 15 (4), p.336-41, 2002.



McGRATH, L.T.; DOUGLAS, A.F.; McCLEAN, E.; BROWN, J.H.; DOHERTY, C.C.; JOHNSTON, G.H.; ARCHBOLD, G.P. Oxidative stress in erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, p. 179-188, 1995.

MENDES, J.D.; RAMOS, H.G. Animal models in diabetes research. **Archives of Medical Research**, v. 25 (4), p. 367-375, 1994.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-639, 2002.

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

MORAES, N.V.; MELLO, M.H.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V.; QUEIROZ, R.H.C. Potencialização do efeito metemoglobinizante da dapsona em ratos pela N-acetilcisteína. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44 (1), p. 99-104, 2008.

MORDES, J.P.; ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. **The American Journal of Medicine**, v. 70, p. 353-360, 1981.

MORENA, M.; CRISTOL, J.P.; BOSC, J.Y.; TETTA, C.; FORRET, G.; LEGER, C.L.; DELCOURT, C.; PAPOZ, L.; DESCOMPS, B.; CANAUD, B. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 17, p. 422-427, 2002.

MUNDAY, R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free radical species. **Free Radical Biology Medicine**, v. 7, p. 659-673, 1989.

NDAHIMANA, J.; DORCHY, H.; VERTONGEN, E.C. Erythrocyte and plasma antioxidant activity in type I diabetes mellitus. **Presse Médicale**, v. 25, p. 188-192, 1996.

NORTHAM, E.; RANKINS, D.; CAMERON, F.J. Therapy Insight: The impact of type 1 diabetes on brain development and function. **Nature Clinical Practice. Neurology**, v. 2, p. 78-86, 2006.

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; TORIBIO, L.; MARINERO, P.; MORAL, O.; MANZANAS, L.; RODRIGUEZ, E. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1-2, p. 347-353, 1997.

ODETTI, P.; PESCE, C.; TRAVERSO, N.; MENINI, S.; MAINERI, E.P.; COSSO, L.; VALENTINI, S.; PATRIARCA, S.; COTTALASSO, D.; MARINARI, U.M.; PRONZATO, M.A. Comparative trial of N-acetyl-cysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. **Diabetes**, v. 2, p. 499-505, 2003.

O'DONNELL, V.B.; FREEMAN, B.A. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways. **Circulation Research**, v. 88, p. 12-21, 2001.

OGA, Z. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo, Editora Atheneu, p. 39-44, 2003.

OLIVEIRA, J. Disponível em <<http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Radicaislivres.htm>> Acesso em : 28 de setembro de 2009.

OLIVEIRA, R.H.R.; RIBEIRO, A.O.; AMARANTE, G.A.J.; TEDDE, M.L. Uso de terapias não convencionais no manejo da crise aguda de asma refratária. **Jornal de Pneumologia**, v. 28 (5), p. 277-280, 2002.

O'RAHILLY, S.; BARROSO, I.; WAREHAM, N. J. Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? **Science**, v. 5708, p. 370-373, 2005.

PACHER, P.; SZABO, C. Role of poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p. 1568–1580, 2005.

PARK, B.H.; RHO, H.W.; PARK, J.W.; CHO, C.G.; KIM, J.S.; CHUNG, H.T.; KIM, H.R. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 210, p. 1-6, 1995.

PATRIARCA, S.; FURFARO, A. L.; DOMENICOTTI, C.; ODETTI P.; COTTALASSO D.; MARINARI, U. M.; PRONZATO, M. A.; TRAVERSO, N. Supplementation with N-acetylcysteine and taurine failed to restore glutathione content in liver of streptozotocin-induced diabetics rats but protected from oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1741, p. 48 – 54, 2005.

PEREIRA, M.A.; KARTASHOV, A.I.; EBBELING, C.B.; VAN HORN, L.; SLATTERY, M.L.; JACOBS, D.R.JR. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. **Lancet**, v. 9453, p. 36-42, 2005.

PEREIRA FILHO, G.A. Efeito da N-Acetilcisteína (NAC) sobre o Estresse Oxidativo no Modelo Experimental de Cirrose. **Revista de Iniciação Científica da Ulbra**, Porto Alegre, v. 1, p. 155-166, 2002.

PIEPER, G.M.; SIEBENEICH, W. Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 32 (1), p. 101-105, 1998.

POONAM, Y.; SARKAR, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes and tissues in aged diabetics rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 35, p. 389-392, 1997.

RAO, B.K.; KESAVULU, M.M.; APPARAO, C.H. Antihyperglycemic activity of *Momordica cymbalaria* in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 67-71, 2001.

RAMAKRISHNA, V.; JAILKHANI, R. Evaluation of oxidative stress in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. **Diagnostic Pathology**, v. 2 (22), p. 1-6, 2007.

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

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. (Ed). **Farmacologia**. Elsevier, São Paulo, Brasil, p. 674-695, 2004.

RIBEIRO, J.P.N.; TEIXEIRA, L.S. **Glutathione**. Universidade do Porto, faculdade de Farmácia. Disponível em <<http://quiprona.files.wordpress.com/2009/07/antioxidantes.png>> Acesso em: 28 de setembro de 2009.

ROBERTSON, R.P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 42351-42354, 2004.

ROCHA, K.K.R.R.; SOUZA, G.A.; FUKUJU, M.; GALHARDI, C.M.; FAINE, L.A.; RODRIGUES, H.G.; EBAID, G.M.X.; DINIZ, Y.S.; NOVELLI FILHO, J.L.V.B.; NOVELLI, E.L.B. Effects of N-acetylcysteine (NAC) on hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress induced by carbohydrate-rich diet. **Diabetes Clínica**, v. 3, p. 72-76, 2005.

ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, p. 167-178, 2006

ROONEY, P. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, v. 234 (3), p. 145-156, 2007.

SAGRISTÁ, M.L., GARCÍA, A.F., MADARIAGA, A., MORA, M. Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. **Free Radical Research**, v. 36 (3), p. 329-340, 2002.

SAKURAI, K.; MIURA, T. Generation of free radicals by alloxan in the presence of bovine serum albumin: a role of protein sulfhydryl groups in alloxan cytotoxicity. **Biochemistry International**, v. 19, p. 405–412, 1989.

SAKURAI, K.; OGISO, T. Effect of ferritin on  $\lambda$ DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPHcytochrome P450 reductase: ferritin's role in diabetogenic action of alloxan. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 262-266, 1995.

SCHMATZ, R.; MAZZANTI, C.M.; SPANEVELLO, R.; STEFANELLO, N.; GUTIERRES, J.; CORRÊA, M.; ROSA, M.M.; RUBIN, M.A.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610 (1-3), p. 42-48, 2009.

SCHWARTZ, M.W.; PORTE, D.JR. Diabetes, obesity and the brain. **Science**, v. 5708, p. 375-9, 2005.

SELVAM, R.; ANURADHA, C.V. Lipid peroxidation and anti peroxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 25, p. 268-272, 1988.

SEN, P.B.; BHATTACHARYA, G. Reversal of the diabetogenic action of alloxan by sulfhydryl compounds. **Science**, v. 115, p. 41–43, 1952.

SEVEN, A.; GÜZEL, S.; SEYMEN, O.; CIVELEK, S.; BOLAYIRLI, M.; UNCU, M.; BURÇAK, G.; Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. **Yonsei Medical Journal**, v. 45, p. 703-710, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82 (2), p. 291-295, 1997.

SJODIN, K.; NILSSON, F.; HALLBERG, A.; TUNEK, A. Metabolism of N-acetyl-L-cysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for oral bioavailability. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 3981-3985, 1989.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SPADA, C.; TREITINGER, A.; REIS, M.; MASOKAWA, I.Y.; VERDI, J.C.; LUIZ, M.C.; SILVEIRA, M.V.; MICHELON, C.M.; ÁVILA-JÚNIOR, S.; GIL, D.O. The effect of N-acetylcysteine supplementation upon viral load, CD4, CD8, total lymphocyte count and haematocrit in individuals undergoing antiretroviral treatment. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 452-455, 2002.

SPRONG, R.C.; WINKELHUYZEN-JANSSEN, A.M.L.; AARSMAN, C.J.M.; OIRSCHOTT, J.F.L.M.; BRUGGEN, T.; ASBECK, B.S. Low dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, p. 1283-1293, 1998.

STEDMAN, E.; EASSON, L.H. Cholinesterase. An enzyme present in the blood-serum of horse. **Biochemical Journal**, v. 26, p. 2056-2066, 1932.

STEFANELO, F.M.; FRANZON, R.; TAGLIARI, B. Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 20, p. 97-103, 2005.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536-546, 2001.

TELCI, A.; ÇAKATAY, U.; SALMAN, S.; SATMAN, I.; SIVAS, A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**; v. 50, p. 213-223, 2000.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 977–986, 1993.

TRIMARCHI, H.; MONGITORE, M.R.; BAGLIONI, P.; FORRESTER, B.; FREIXAS, M.; SCHROPP, M.; PEREIRA, H.; ALONSO, M. N-Acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients – a pilot study. **Clinical Nephrology**, v. 59, p. 441-446, 2003.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1685-96, 2000.

URATA, Y.; YAMAMOTO, H.; GOTO, S.; TSUSHIMA, H.; AKAZAWA, S.; YAMASHITA, S.; NAGATAKI, S.; KONDO, T. Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 15146-15152, 1996.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSNER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39 (44), p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. 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 (5), p. 1323-1338, 2007.

VAZIRI, N.D. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. **Hypertension**, v. 39, p. 135-41, 2002.

VERICEL, E.; JANUEL, C.; CARRERAS, M.; MOULIN, P. Diabetes Patients without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status. **Diabetes**, v. 53, p. 1046-1051, 2004

VOSS, P.; SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. **Free Radical Research**, v. 40, p. 1339–1349, 2006.

WARDLE, E.N. Cellular oxidative process in relation to renal disease. **American Journal of Nephrology**, v. 25, p. 13-22, 2005.

WEAVER, D.C.; McDANIEL, M.L.; NABER, S.P.; BARRAY, C.D.; LACY, P.E. Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans. **Diabetes**, v. 27, p. 1205-1214, 1978b.

WEST, J.; BROUSIL, J.; GAZIS, A.; JACKSON, L.; MANSELL, P.; BENNETT, A.; AITHAL, G.P. Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 99, p. 871-876, 2006.

WILD, S.; BCHIR, M.B.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; PHD, SICREE, R.; KING, M. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

XIA, Z.; GUO, Z.; NAGAREDDY, P. R.; YUEN, V.; YEUNG, E.; MCNEILL, J.H. Antioxidant N-acetylcysteine restores myocardial Mn-SOD activity and attenuates myocardial dysfunction in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 544, p. 118–125, 2006.

ZAFARULLAH, M.; LI, W.Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 6-20, 2003.