

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

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O  
DANO OXIDATIVO RENAL E HEPÁTICO DE  
RATOS DIABÉTICOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Gianine Lima Ribeiro**

**Santa Maria, RS, Brasil, 2010.**

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O DANO  
OXIDATIVO RENAL E HEPÁTICO DE RATOS  
DIABÉTICOS**

**por**

**Gianine Lima Ribeiro**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de  
Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da  
Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Solange Cristina Garcia  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Mirna Leal

Santa Maria, RS, Brasil  
2010

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

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

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O DANO  
OXIDATIVO RENAL E HEPÁTICO DE RATOS DIABÉTICOS**

elaborada por  
**Gianine Lima Ribeiro**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Comissão Examinadora:**

-----  
**Solange Cristina Garcia, Dra.**  
**(Presidente/ Orientador)**

-----  
**Ruy Carlos Ruver Beck, Dr.**  
**(UFRGS)**

-----  
**Maria Beatriz Moretto, Dra**  
**(UFSM)**

Santa Maria, 22 de outubro de 2010.

## **Dedicatória**

Aos meus amados pais

Dentro de mim há um lugar  
onde meus sonhos mais ternos residem,  
onde minhas esperanças mais caras permanecem vivas,  
onde meus sentimentos mais profundos são sentidos,  
e onde minhas lembranças favoritas são acalantada com  
aconchego.

No meu coração apenas as coisas mais especiais em meu mundo  
conseguem penetrar e lá permanecem para sempre.  
E sempre que entro em contato com as esperanças,  
sentimentos e lembranças em meu coração,  
percebo a profundidade  
com que minha vida foi tocada por **vocês**.

### **Agradecimento especial**

A Prof. Dr (a) Solange Cristina Garcia, que admiro pela determinação, humildade, honestidade e dedicação a pesquisa. Agradeço pela oportunidade para realizar este trabalho. A ela, meu reconhecimento e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar vida e saúde para alcançar meus objetivos.

À prof.<sup>a</sup> Solange por me dar a oportunidade de compor o seu grupo de pesquisa e me orientar na realização deste trabalho.

Aos meus pais Davi e Dione, ao meu irmão Giancarlo e meu namorado Jackson pelas palavras de amor, perseverança e apoio dado durante esta jornada. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Aos meus avós Januário (Balau), Martim, Joanita, e, em especial, a minha avó Balbina, que, infelizmente, não está mais entre nós, pelas orações e palavras de fé, que, com certeza, foram fundamentais para que eu alcançasse mais este objetivo.

Ao grupo de pesquisa das professoras Vera Morsch e Maria Rosa Schetingger pelo auxílio no desenvolvimento da parte prática desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia pela ajuda, companheirismo, pelas risadas, enfim, pelos momentos vividos em meus dois anos e meio de LATOX..

Ao colega André, com quem realizamos esta pesquisa, pois sem a sua participação tudo teria sido muito mais difícil.

Às minhas amigas de uma vida inteira, Bárbara e Christiane pela amizade e pelos pensamentos positivos.

Às amigas que eu encontrei ao chegar a Santa Maria, Juliana Vicentini e Juliana Valentini, muito obrigada pelo apoio profissional e emocional.

Aos amigos e aos colegas de graduação Carine (Cacá) e Victor, que me incentivaram a dar este passo e iniciaram comigo esta jornada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para a construção de meu conhecimento científico.

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realizar este curso.

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

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE O DANO OXIDATIVO RENAL E HEPÁTICO DE RATOS DIABÉTICOS**

Autora: Gianine Lima Ribeiro

Orientadora: Solange Cristina Garcia

Co-orientadora: Mirna Leal

Data e local da defesa: Santa Maria, 22 de outubro de 2010.

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença crônica caracterizada pela hiperglicemia, que está relacionada Com o estresse oxidativo, o qual possui papel importante no desenvolvimento de outras patologias e danos teciduais, tais como dano hepático e renal. Dessa forma, faz-se importante à realização de estudos com possíveis antioxidantes, que possam diminuir os efeitos deletérios do estresse oxidativo decorrentes do diabetes. Neste sentido, a N-acetilcisteína (NAC) é um medicamento utilizado como hepatoprotetor por estimular a síntese de Glutationa Reduzida, diminuindo o dano oxidativo. Nesta linha, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante da NAC nos tecidos renal e hepático de ratos diabéticos através dos biomarcadores do estresse oxidativo como: glutathione reduzida (GSH), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), malondialdeído (MDA) e ácido delta aminolevulinato desidratase (ALA-D) no fígado e rins de animais controles e com diabetes induzida, tratados e não tratados com NAC. Os tratamentos consistiram em administrações intraperitoneais de 25 mg/Kg e 75 mg/Kg de N-acetilcisteína. No fígado, os níveis de MDA foram significativamente aumentados no grupo diabético comparados ao grupo controle. O tratamento com 75 mg/Kg foi capaz de reduzir os níveis de MDA, ficando semelhantes ao grupo controle. Os níveis da GSH mostrou-se mais elevada no rim e no fígado dos animais diabéticos do que dos controles, e o tratamento com a NAC fez com que esses níveis fossem reduzidos no fígado dos animais diabéticos, entretanto no rim, não houve alterações. Os níveis de SOD e GPx diminuíram no fígado dos animais diabéticos quando comparados ao controle, e a administração de NAC não alterou esses índices. O diabetes também diminuiu a atividade da ALA-D no fígado, e o tratamento com a 25 mg/Kg NAC fez com essa atividade aumentasse significativamente. No tecido renal, ambas as doses de NAC elevaram os níveis de ALA-D nos animais diabéticos. Diante dos resultados encontrados, comparando-se os tecidos renal e hepático dos ratos controles com os diabéticos tratados com NAC, sugere-se que a NAC demonstrou diminuir o dano oxidativo mais no fígado do que no rim.

Palavras- chave: Diabetes Mellitus; biomarcadores enzimáticos, biomarcadores não enzimáticos, estresse oxidativo; N-acetilcisteína.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Post Graduate Course of Pharmacology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **TISSUE OXIDATIVE STRESS OF DIABETIC RATS TREATED WITH N-ACETYLCYSTEINE**

Author: Gianine Lima Ribeiro

Adviser: Solange Cristina Garcia

Co-Adviser: Dra Mirna Bairy Leal

Date and place of the defense: Santa Maria, October 22 , 2010.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease characterized by hyperglycemia, which is related to oxidative stress and plays an important role in the development of other diseases and tissue damage, such as liver and kidney damage. Thus, it is important for studies with potential antioxidant that may reduce the deleterious effects of oxidative stress due to diabetes. In this sense, N-acetylcysteine (NAC) is used as a hepatoprotective drug in the treatment of acute poisoning by paracetamol to reduce oxidative damage. Along these lines, the aims of this study were to evaluate biomarkers of oxidative stress such as reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and delta aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in liver and kidneys of controls and animals with diabetes induced after treatment with NAC. Treatments consisted of intraperitoneal administration of 25 mg / kg and 75 mg / kg N-acetylcysteine. In the liver, MDA levels were significantly increased in the diabetic group compared to controls, treatment with 75 mg / kg reduced the levels of MDA, being similar to the control group. GSH levels of the enzyme was found to be highest in kidney and liver of diabetic animals than controls, and treatment with NAC led to these reduced levels in the liver of diabetic animals, but in the kidney, no changes. The levels of SOD and GPx decreased in the liver of diabetic animals compared to control, and administration of NAC did not alter these indices. Diabetes also reduced the activity of ALA-D in the liver, and treatment with 25 mg/ kg NAC did with this activity increased significantly. In the kidney, both doses of NAC increased the levels of ALA-D in diabetic animals. The results suggest that NAC may be more effective in the liver, the organ that suffers most oxidative changes, and especially in groups of diabetic animals.

Keywords: Diabetes mellitus; enzymatic biomarkers, non enzymatic biomarkers, oxidative stress, N-acetylcysteine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formação de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001) .....**23**
- Figura 2:** Enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione. (Fortuño, A. et al, 2005; Ray, R. et al, 2005). .....**27**
- Figura 3:** Estrutura química da N-acetilcisteína (Ventresca, G. P., Cicchetti, V., Ferrati, V., 1989). .....**29**

## LISTA DE ABREVIATURAS

DM: *Diabetes mellitus*

EROs : Espécies Reativas de Oxigênio

ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio

SOD: Superóxido dismutase

CAT: Catalase

GPx: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione reduzida

MDA: Malondialdeído

ALA-D:  $\delta$ -aminolevulinato desidratase

PCO: Proteínas carboniladas

AGEs: Produtos da glicação avançada

ND: Nefropatia diabética

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

RD: Retinopatia diabética

TOTG: Teste oral de tolerância a glicose

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

DNA: Ácido desoxirribonucléico

Fe<sup>++</sup>: Íon ferroso

SH: Grupos sulfidrílicos

4-HNE: (4-hidroxi- 2 – transnonenal)

GSH-Rd: Glutaciona redutase

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

GSSG: Glutaciona dissulfeto

G6PD: glicose- 6-fosfato desidrogenase

NAC: N-acetilcisteína

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMENTO ESPECIAL</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>12</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
<b>2.1 <i>Diabetes mellitus</i> (DM)</b>	<b>16</b>
2.1.1 Prevalência do DM	16
2.1.2 Classificação	17
2.1.3 Complicações diabéticas	19
2.1.4 Diagnóstico e tratamento	20
<b>2.2 Estresse oxidativo</b>	<b>22</b>
2.2.1 Agentes oxidantes	23
2.2.2 Sistema antioxidante	25
2.2.2.1 Sistema antioxidante enzimático	25
2.2.2.2 Sistema antioxidante não enzimático	27
2.2.3 Biomarcadores da peroxidação lipídica	28
<b>2.3 N-acetilcisteína</b>	<b>28</b>
2.3.1 Estrutura química e farmacocinética	28
2.3.2 Mecanismo de ação	29
2.3.3 Usos clínicos	30
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Manuscrito</b>	<b>31</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados ao manuscrito deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

# 1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico, caracterizado por níveis elevados de glicemia e alterações do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Resulta de uma secreção deficiente de insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, resistência periférica à ação da insulina, ou ambas (The expert committee on the diagnosis, 1997). É uma doença crônica de incidência global, que atinge 2,5 a 3% da população mundial, uma proporção que, em alguns países, pode atingir 7% ou mais, como no Brasil, onde a prevalência dessa patologia é de 7,8% (Malerbi, 1992).

O DM é bem conhecido por causar um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes devido à hiperglicemia, que induz glicação e ativação da via poliol, levando a superprodução de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies causam danos estruturais ao fígado e ao pâncreas e levam a complicações, tais como a nefropatia, que pode resultar do estresse oxidativo (Inukai, 2002). Os radicais livres são moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos, cuja estrutura química possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupa um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso o torna muito instável, extraordinariamente reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (Halliwell e Gutteridge, 2000), usualmente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Os radicais livres em geral são formados por absorção de radiação (ultravioleta ou visível), por reação redox ou por processos de catálise enzimática (Slater, 1984).

Os principais antioxidantes endógenos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reduzida (GSH). Segundo alguns autores, no diabetes tipo 1, os níveis de antioxidantes, como a GPx, SOD e catalase encontram-se reduzidos significativamente quando comparados aos das pessoas saudáveis (Ramakrishna e Jailkhani, 2007). Entretanto, há estudos que mostram o aumento dos níveis dessas enzimas como uma resposta do organismo ao estresse oxidativo causado pelo estado diabético (Kakkar, 1995).

O reconhecimento do envolvimento de espécies reativas de oxigênio, radicalares ou não radicalares, em diversas patologias tem levado à implementação do uso de substâncias antioxidantes, que funcionam como supressores dos processos de óxido-redução. Alguns desses compostos contêm um grupo funcional quimicamente análogo ao de antioxidantes naturais e introduzem novos grupos químicos que aumentam sua amplitude de ação celular ou melhoram sua biodisponibilidade. Por outro lado, outros antioxidantes sintéticos não apresentam analogia estrutural aos naturais, mas exercem alta reatividade para com as espécies reativas de oxigênio e/ou protegem seletivamente alguns tecidos (Packer, 1997).

A N-acetilcisteína é um composto tiólico que vem sendo utilizada na clínica há mais de quarenta anos. Atualmente, é utilizada como principal antídoto em intoxicações agudas por paracetamol com risco de dano hepático, provavelmente por restaurar as reservas hepáticas de glutathione. (Hardmann, 2001). É uma fonte de grupos sulfidrila e removedores de substâncias reativas com o oxigênio ( $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), geradas pela reação dos peroxinitritos como o NO e superóxido (Zafarullah, 2003; Aruoma, 1989). Ela tem demonstrado reduzir a disfunção endotelial, inflamação, fibrose, diminuir a lesão provocada pelo tempo de isquemia do enxerto e os níveis de malondialdeído (MDA) em pacientes renais crônicos (Massy e N-Guyen, 2002; Vaziri, 2002).

Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os biomarcadores do estresse oxidativo enzimáticos, tais como o superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase (GPx) e o  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) e os biomarcadores não enzimáticos como o malondialdeído (MDA) e a glutathione reduzida (GSH), no tecido hepático e renal de animais saudáveis e com diabetes induzido, tratados e não tratados via intraperitoneal com N-acetilcisteína, a fim de verificar se esse antioxidante é capaz de reverter ou diminuir os danos do estresse oxidativo nesses órgãos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Diabetes mellitus* (DM)

O *Diabetes mellitus* é uma síndrome caracterizada pela secreção anormal de insulina, desordem no metabolismo de carboidratos e lipídeos e é diagnosticado pela presença de hiperglicemia (Zimmet, 1997), que se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida: a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica.

A hiperglicemia crônica está associada a dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente, olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Estudos de intervenção demonstraram que a obtenção do melhor controle glicêmico possível retardou o aparecimento de complicações crônicas microvasculares, embora não tenha tido um efeito significativo na redução de mortalidade por doença cardiovascular (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998).

#### 2.1.1 Prevalência do DM

O *Diabetes mellitus* é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que existam mais de 150 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que projeções da Organização Mundial da Saúde para 2025 sugerem que esse número possa chegar a 300 milhões.(LERCO, 2003).

Nas Américas, o número de indivíduos com diabetes foi estimado em 35 milhões para o ano 2000 e projetado para 64 milhões em 2025. Nos países desenvolvidos, o aumento ocorrerá principalmente, nas faixas etárias mais avançadas, decorrente do aumento da esperança de vida e do crescimento populacional; nos países em desenvolvimento, o aumento será observado em todas as faixas etárias, principalmente, no grupo de 45-64 anos onde sua prevalência deve triplicar, duplicando nas faixas etárias de 20-44 e 65 e mais anos (King, 1998).

Um estudo multicêntrico de base populacional, conduzido em 1988, em nove capitais de estados brasileiros, demonstrou que a prevalência do diabetes e a tolerância à glicose diminuída em população urbana, entre 30 e 69 anos de idade, é de 7,6 e 7,8%, respectivamente. Os casos de diabetes previamente diagnosticados corresponderam a 54% dos casos identificados, ou seja, 46% dos casos existentes desconheciam o diagnóstico, que provavelmente seria feito por ocasião de manifestação de alguma complicação crônica do diabetes (Malerbi & Franco, 1992).

No Brasil, as cidades das regiões Sul e Sudeste, consideradas de maior desenvolvimento econômico do país, apresentam maiores prevalências de *Diabetes mellitus* e de tolerância à glicose diminuída. Os principais fatores associados à maior prevalência do diabetes no Brasil foram a obesidade, o envelhecimento populacional e a história familiar de diabetes (Malerbi & Franco, 1992).

### 2.1.2 Classificação

Segundo a Sociedade Brasileira (2000), a classificação atualmente recomendada incorpora o conceito de estágios clínicos do diabetes, desde a normalidade, passando pela tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia de jejum alterada, até o diabetes propriamente dito. A nova classificação baseia-se na etiologia do diabetes: Tipo 1 - destruição da célula beta com deficiência absoluta de insulina; Tipo 2: varia entre a resistência insulínica e um defeito secretório; outros tipos específicos: decorrentes de defeitos genéticos e de doenças ou induzidos por fármacos e agentes químicos e diabetes gestacional: casos detectados na gravidez. (Guimarães, 2002).

No diabetes tipo 1, ocorre destruição das células beta do pâncreas, usualmente por processo auto-imune (forma auto-imune; tipo 1A) ou, menos comumente, por causa desconhecida (forma idiopática; tipo 1B) (Atkinson, 1994; Imagawa, 2000). Na forma auto-imune, há um processo de insulite e estão presentes autoanticorpos circulantes (anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina). De uma forma geral, a instalação

do quadro de diabetes tipo 1 auto-imune é relativamente abrupta e muitas vezes o indivíduo pode identificar a data de início dos sintomas.

A consequência da perda das células beta é a deficiência absoluta da secreção de insulina, o que, por sua vez, deixa os pacientes suscetíveis à ocorrência de cetoacidose, muitas vezes, a primeira manifestação da doença. O quadro de cetoacidose é a expressão máxima da deficiência de insulina e pode também ocorrer na presença de estresse infeccioso, ou de qualquer etiologia ou ser decorrente do uso inadequado da insulina (The expert committee on the diagnosis, 1997, World health organization, 1999).

O pico de incidência do diabetes tipo 1 ocorre dos 10 aos 14 anos de idade, havendo a seguir uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos, de tal maneira que casos de diabetes tipo 1 após essa idade são pouco frequentes. No entanto, indivíduos de qualquer idade podem desenvolver diabetes tipo 1 (Gross, 2002).

O diabetes tipo 2 é mais comum do que o tipo 1, perfazendo cerca de 90% dos casos de diabetes. É uma entidade heterogênea, caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina, com predomínio de um ou outro componente (World health organization, 1999). A etiologia específica deste tipo de diabetes ainda não está claramente estabelecida como no diabetes tipo 1. A destruição autoimune do pâncreas não está envolvida. Também, ao contrário do diabetes tipo 1, a maioria dos pacientes apresenta obesidade.

A idade de início do diabetes tipo 2 é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência ao redor dos 60 anos. Estudos que aliam a obesidade à idade superior a 40 anos indicam este ponto de corte da idade como discriminatório entre os dois tipos de diabetes (Hother-Nielsen, 1988). Por outro lado, outros autores associam a ausência de episódio agudo de cetoacidose e idade superior a 20 anos como indicadores da presença de diabetes do tipo 2 (Service, 1997). Deve ser levado em conta que, embora a ocorrência de cetoacidose seja característica do estado de deficiência insulínica do tipo 1, o paciente tipo 2 pode apresentar esse quadro na vigência de intercorrências graves como infecções ou episódios agudos de doença cerebrovascular (Kitabchi, 2001).

A diferenciação entre os dois tipos mais comuns de diabetes é em geral relativamente simples e baseia-se fundamentalmente em dados clínicos.

O diabetes gestacional é definido como a tolerância diminuída aos carboidratos, de graus variados de intensidade, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (World health organization, 1999).

Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes aos descritos para o diabetes tipo 2, incluindo ainda idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez atual, deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal (Gross, 2002).

O rastreamento do diabetes é realizado a partir da primeira consulta pré-natal, utilizando-se a medida da glicose em jejum e com o objetivo de detectar a presença de diabetes pré-existente. A partir da 20ª semana da gravidez, realiza-se outra medida da glicose plasmática de jejum, com ponto de corte de 85mg/dl (Reichelt, 1998), visando à detecção do diabetes gestacional.

À medida que têm sido elucidados os processos de patogênese do diabetes, tanto em relação a marcadores genéticos como aos mecanismos de doença, tem crescido o número de tipos distintos de diabetes, permitindo uma classificação mais específica e definitiva (Gross, 2002). Portanto, novas categorias têm sido acrescentadas à lista de tipos específicos de diabetes, incluindo defeitos genéticos da célula beta e da ação da insulina, processos de doenças que danificam o pâncreas, diabetes relacionados a outras endocrinopatias e os casos decorrentes do uso de medicamentos (Oliveira, 1999).

### 2.1.3 Complicações diabéticas

As complicações vasculares do *Diabetes mellitus* são a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e constituem preocupação crescente para as autoridades de saúde em todo o mundo (Zimmet., 2001). Entre as teorias que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais observados nessa doença, a formação dos produtos de glicação avançada, também chamados AGEs (do inglês, Advanced Glycated

End-Products), é considerada uma das mais importantes (Brownlee, 2001, Peppas, 2003).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade desses compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios. A contribuição dos AGEs para o desenvolvimento e a progressão das complicações diabéticas encontra-se bem evidenciada na literatura (Jakus, 1998).

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte (52%) em pacientes diabéticos do tipo 2 (Nathan, 1997). Diversos fatores de risco, passíveis de intervenção, estão associados ao maior comprometimento cardiovascular observado nos pacientes diabéticos. Entre eles, estão a presença da Nefropatia Diabética (ND) e da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).

A Nefropatia Diabética acomete cerca de 40% dos pacientes diabéticos e é a principal causa de insuficiência renal em pacientes que ingressam em programas de diálise. Cerca de 40% desses morrem no primeiro ano de tratamento, principalmente, por doença cardiovascular (Gall, 1991).

A Retinopatia Diabética (RD) acomete cerca de 40% dos pacientes diabéticos e é a principal causa de cegueira em pacientes entre 25 e 74 anos. A maioria dos casos de cegueira (90%) é relacionada à Retinopatia Diabética e pode ser evitada através de medidas adequadas, que incluem, além do controle da glicemia e da pressão arterial, a realização do diagnóstico em uma fase inicial e passível de intervenção (Aiello, 1998).

Outra complicação são as úlceras em pés de diabéticos, que têm como fatores de risco para o seu surgimento, além da neuropatia diabética periférica, a desinformação sobre os cuidados com os pés, pois a presença de calosidades e deformidades, a doença vascular periférica e as dermatoses comuns (contudo entre os dedos) favorecem o desenvolvimento dessa complicação crônica. Os pacientes com história prévia de úlcera ou amputação são particularmente considerados como de elevado risco para o

desenvolvimento de novas úlceras (Gross, 1999). A detecção precoce do “pé em risco” pode ser feita facilmente pela inspeção e avaliação da sensibilidade através de testes simples e de baixo custo (Armstrong, 1998; Boulton, 1998).

#### 2.1.4 Diagnóstico

O diabetes mellitus é uma doença com critérios diagnósticos bem definidos, porém de manejo complexo, uma vez que sua abordagem além da terapêutica medicamentosa envolve uma série de mudanças nos hábitos de vida dos pacientes (Assunção, 2002).

O diagnóstico baseia-se fundamentalmente nas alterações dos níveis de glicose plasmática de jejum ou após uma sobrecarga de glicose por via oral. Os critérios diagnósticos baseiam-se na glicose plasmática de jejum (8 horas), nos pontos de jejum e de 2h após sobrecarga oral de 75 g de glicose (teste oral de tolerância à glicose – TOTG) e na medida da glicose plasmática casual (Engelgau, 1997).

Para que o diagnóstico seja estabelecido em adultos fora da gravidez, os valores devem ser confirmados em um dia subsequente, por qualquer um dos critérios descritos. Pacientes com glicemia > 200 mg/dl, após 2 horas de sobrecarga com 75g de glicose, apresentam riscos elevados. Em relação à glicemia de jejum, valores acima de 126 mg/dl se correlacionam relativamente bem com os valores de 2 horas após sobrecarga acima de 200 mg/dl, de modo que glicemias de jejum maior que 126 mg/dl em duas ocasiões confirmam o diagnóstico. Apesar de boa especificidade, a glicemia de jejum tem baixa sensibilidade para afastar diabetes, ou seja, uma glicemia de jejum normal não é suficiente para afastar o diagnóstico de diabetes, sendo, muitas vezes, necessário realizar o teste de sobrecarga (Genuth, 2003).

Para a detecção do diabetes em crianças que não apresentam um quadro característico de descompensação metabólica com poliúria, polidipsia e emagrecimento ou de cetoacidose diabética, são adotados os mesmos critérios diagnósticos empregados para os adultos. Quando houver a indicação de um TOTG, utiliza-se 1,75 g/kg de glicose (máximo 75 g) (Gross, 2002).

Em algumas circunstâncias (diabetes com início entre 25 a 30 anos, durante a gravidez e em pacientes em hemodiálise), o diagnóstico do tipo de diabetes é mais difícil, pode então ser necessária a utilização de alguns exames laboratoriais para estabelecer a possível causa do diabetes. Entre estes, encontram-se marcadores de autoimunidade, como a medida de autoanticorpos relacionados à insulite pancreática e à avaliação da reserva pancreática de insulina através da medida do peptídeo C e da fase rápida de secreção de insulina. (Gross, 2002).

O tratamento do diabetes visa, predominantemente, ao controle glicêmico. A Sociedade Brasileira de Diabetes (Programa Harvard Joslin – SBD, 1996) preconiza também como objetivos: aliviar os sintomas, melhorar a qualidade de vida, prevenir complicações agudas e crônicas, reduzir a mortalidade e tratar as doenças associadas.

O tratamento básico e o controle da doença dos tipos de diabetes 1 e 2 consistem, primordialmente, em uma dieta específica, em atividade física e no uso adequado da medicação (antidiabéticos orais e/ou insulina). O resultado é obtido através de uma educação específica, que requer a adoção de determinadas medidas e práticas comportamentais pelos portadores de diabetes.

## **2.2 Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que há uma diminuição dos níveis dos antioxidantes, uma elevada velocidade de produção de oxidantes/pró-oxidantes ou uma combinação de ambas as condições (Slater, 1984; Pawlak, 1998). Os radicais livres são moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos, cuja estrutura química possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso o torna muito instável, extraordinariamente reativo e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (Halliwell e Gutteridge, 2000), usualmente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Os radicais livres em geral são formados por

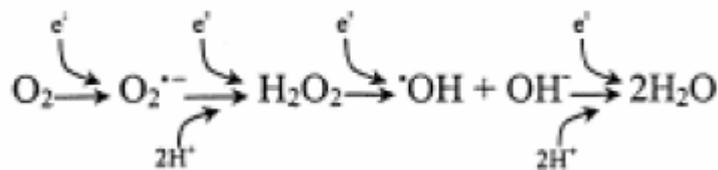
absorção de radiação (ultravioleta ou visível), por reações redox ou por processos de catálise enzimática (Slater, 1984).

No organismo, essas espécies encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Husain, 1987). Dessa forma, encontram-se relacionadas com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (Halliwell, 1992)

O excesso de espécies reativas no organismo é controlado por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos através da dieta (Fauré, 1984).

### 2.2.1 Agentes oxidantes

As EROs são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2\cdot$ ) e hidroxila ( $\cdot OH$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (Cohen, 1989).



**Figura 1:** Formação de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001).

O radical HO• é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado in vivo. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical HO•: reparar os danos causados por ele ou inibir sua formação. O ataque intensivo e frequente desse radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos (Barreiros, 2006).

O radical superóxido é o mais comum e abundante na célula (Boveries, 1998). É formado no organismo, principalmente, através da cadeia de transporte de elétrons ou por ação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos) para defesa bactericida (Diaz, 1998). Apesar de o nome sugerir que esse radical tem alto poder oxidante, o superóxido atua na maioria das reações como um agente redutor (Oga, 2003).

O peróxido de hidrogênio apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o HO•. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe<sup>++</sup>. Assim, é altamente tóxico para as células; essa toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro, como ocorre, por exemplo, na hemocromatose transfusional (Halliwell, 1990). O oxigênio singlet é forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O oxigênio singlet tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (Halliwell, 1990).

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta, ou mesmo sintéticos, é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que, muitas vezes, os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (Doroshov, 1983; Halliwell, 1995; Weijl, 1997).

Outros oxidantes são as espécies reativas do nitrogênio, o óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), também chamado de monóxido de nitrogênio, é um radical livre, pois possui um elétron não pareado na sua camada de valência. O radical  $\text{NO}^\cdot$  reage muito rápido com outras espécies radicalares para produzir as espécies reativas do nitrogênio (ERN), que podem modificar muitas macromoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Davies, 2001). Os radicais do enxofre são formados quando um grupo tiol ( $-\text{SH}$ ) reage com vários radicais do oxigênio, como o radical hidroxila ou com um carbono central de algum radical. Outro mecanismo de formação de radicais do enxofre é a reação do grupo tiol com íons de metais de transição (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Em relação aos radicais lipídicos, os ácidos graxos polinsaturados, presentes nas membranas celulares, são facilmente oxidados pelos radicais livres, levando à peroxidação lipídica. Entre os produtos finais da peroxidação lipídica, estão compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos e aldeídos, por exemplo, o Malondialdeído (MDA) (Esterbauer e Cheeseman, 1990). Além disso, também pode ser produzido o 4-HNE (4-hidroxi nonenal) que é citotóxico, hepatotóxico, mutagênico e genotóxico (Esterbauer e Cheeseman, 1990; Maxwell, 1995).

### 2.2.2 Sistema antioxidante

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as EROs) e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do  $\text{O}_2$  e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de  $\text{O}_2$  (Ross, D. 1991; Hebbel, 1986). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) e vitamina E.

A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase e pela GPx, entre

outros. Com exceção da vitamina E (alfa-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Ross, 1991; Hebbel, 1986).

#### 2.2.2.1 Sistema antioxidante enzimático

O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a glutathiona peroxidase (GPx); catalase (CAT); e superóxido dismutase (SOD) (Belló, 2002).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos proteicos em sua composição. Nos sistemas eucariontes, existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente, principalmente, no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. Essa enzima tem papel antioxidante por catalisar a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , na presença do próton  $H^+$  (Ross, 1991; Hebbel, 1986; Acharya, 1991).

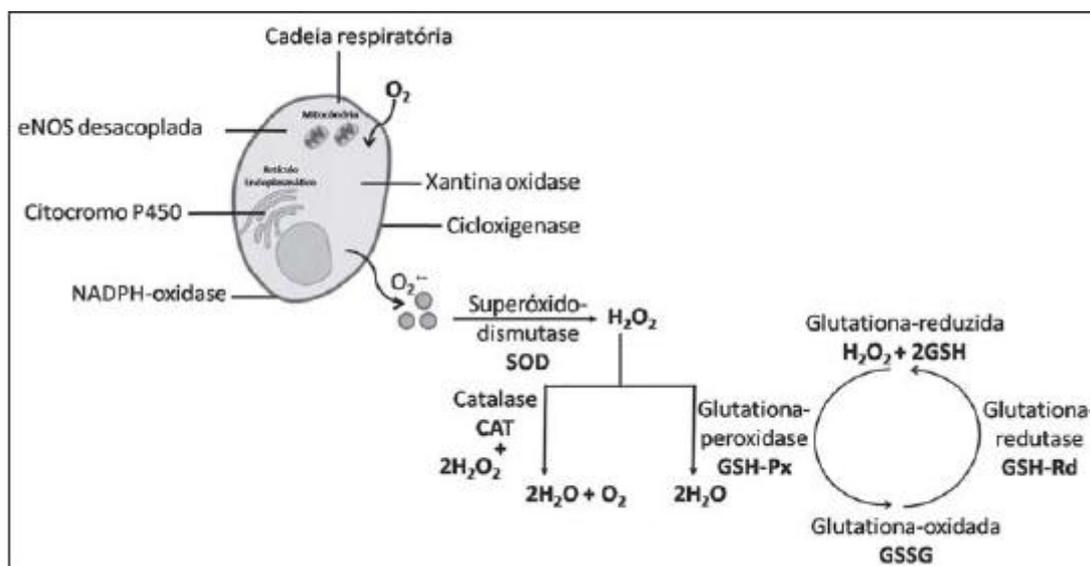
A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ . É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (Mayes, 1990). Sua atividade é dependente de NADPH.

A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (Shan, 1990) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da GSH a GSSG. Embora a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (Hebbel, 1986).

A enzima glutathiona redutase é responsável pela recuperação da GSH, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (Gilbert, 1990). Habitualmente, a reserva intracelular de glutathiona redutase é alta e somente uma grave deficiência dessa enzima resultará em sinais clínicos (Frischer, 1987). A glutathiona redutase é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (Ross, 1991; Hebbel, 1986). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no

jejum e na deficiência de glicose- 6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da glutathiona redutase (Shan, 1990).

Ainda existem as enzimas chamadas glutathiona S-transferases, as quais agem detoxificando agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e xenobióticos, através da catálise das reações desses agentes com o grupo SH da glutathiona, neutralizando-os e tornando-os mais facilmente metabolizáveis.



**Figura 2:** Enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona. (Fortuño, 2005; Ray, 2005).

### 2.2.2.2 Sistema antioxidante não enzimático

Esse sistema é formado por antioxidantes hidrofílicos, como a GSH, a vitamina C, os indóis e os catecóis, e por lipofílicos, as bioflavonas, vitamina E e carotenoides.

A Glutathiona é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Está presente na

maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (Meister, 1983).

Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento-SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (Galleano, 1995), oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta (Deneke, 1989). Além disso, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão (Shan, 1990), atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (Deneke, 1989).

### 2.2.3 Biomarcadores da Peroxidação Lipídica

Os radicais lipídicos, como os ácidos graxos polinsaturados, presentes nas membranas celulares, são facilmente oxidados pelos radicais livres, levando à peroxidação lipídica. Esse fenômeno ocorre devido à existência de várias insaturações em sua molécula, pois é na dupla ligação que o radical peróxido se insere, formando então um lipoperóxido. Entre os produtos finais da peroxidação lipídica, estão compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos e aldeídos, por exemplo, o Malondialdeído (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

O MDA pode ser utilizado como indicador da ação dos radicais livres no organismo (Ferreira, 1997; Del Rio, 2005; Ozguner, 1999), ele possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (Andrade, 2005; Steghens, 2001; Bagis, 2005).

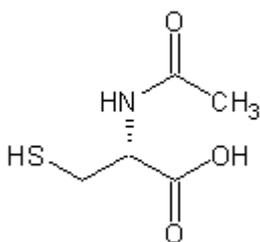
## 2.3 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é um tiol, um agente mucolítico e um precursor do aminoácido L-cisteína e de GSH. A NAC é uma doadora de grupamentos

sulfidrílicos nas células e sequestradora de radicais livres. Usa-se em diferentes doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, AIDS e também na intoxicação por acetaminofeno (Kelly, 1998).

### 2.3.1 Estrutura química e farmacocinética

A NAC é um composto tiólico, cuja fórmula química é  $C_5H_9NO_3S$  (Ziment, 1988). É rapidamente absorvido quando ingerido por via oral, entretanto sofre metabolismo de primeira passagem pelas células do intestino delgado e fígado, devido à incorporação da NAC pelas cadeias de proteínas e à formação de uma variedade de metabólitos. Apenas uma pequena porcentagem de NAC chega intacta ao plasma e no tecido (De Caro, 1986).



**Figura 3:** Estrutura química da N-acetilcisteína (Ventresca, 1989).

O pico de concentração plasmática ocorre menos de uma hora após a administração oral, o tempo de meia-vida plasmática é em torno de 2 horas e 15 minutos e é eliminada pela urina (Borgstrom, 1986).

### 2.3.2 Mecanismo de ação

Pelo fato de a NAC ser doadora de grupamentos sulfidrílicos, ela pode estimular a síntese de GSH, devido a isso, aumenta a atividade da glutathione-S-transferase, promove detoxicação e age diretamente nos radicais oxidantes (De Vries, N., De Flora, S, 1993). Estudos mostram que, *in vivo*, a NAC pode

aumentar os níveis intracelular de GSH nos eritrócitos, no fígado e em células pulmonares (De Flora, 1985).

Devido a essa ação precursora de GSH intracelular, a NAC é utilizada como um antídoto de intoxicações por paracetamol, uma vez que este causa a depleção dos níveis de glutathione e inibe a atividade da glutathione transferase citosólica (Pratt, 1985).

O tratamento com esse antioxidante pode aumentar a detoxificação dos tecidos hepático e pulmonar de algumas ações mutagênicas. Ele exerce efeito protetor por promover a síntese de GSH e restringir a biotransformação de substâncias mutagênicas/carcinogênicas em compostos mais tóxicos (De Flora, 1985).

O grupamento tiólico é essencial para a defesa contra as espécies reativas de oxigênio, age como um poderoso sequestrador de ácido hipocloroso e é capaz de reduzir os radicais hidroxila e o peróxido de hidrogênio (Aruoma, 1989). A NAC também tem sido usada como agente radioprotetor e aparentemente exerce esse efeito devido à modulação das concentrações de citocinas. A interleucina-1, o fator de necrose tumoral-alfa e o interferon-gama fornecem proteção endógena ao sistema hematopoiético contra a radiação (Baier, 1996).

### 2.3.3 Usos clínicos

Como explicitado anteriormente, a NAC é utilizada na clínica, principalmente, como antídoto de intoxicações com paracetamol. Também está nas formulações de xaropes com ação mucolítica.

São encontrados, na literatura, trabalhos experimentais que fazem o uso da NAC, dentre várias, em situações de câncer, AIDS, gripe, doenças cardíacas, intoxicações com metais pesados e epilepsia (Kelly, 1998). Entretanto, não foram encontrados estudos sobre uso de NAC em diabetes experimental, como uma alternativa para tentar diminuir a ocorrência das complicações diabéticas. Por esse motivo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o possível efeito protetor de dano renal e hepático da NAC em ratos com diabetes induzida com alloxano.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Manuscrito

#### **Effects of N-acetylcysteine on oxidative damage in diabetic rats.**

Gianine Ribeiro<sup>1,2</sup>, Miguel Roehrs<sup>1,2</sup>, André Bairros<sup>2</sup>, Angela Moro<sup>2,3</sup>, Mariele Charão<sup>1,2</sup>, Fernando Araújo<sup>2,3</sup>, Juliana Valentini<sup>2</sup>, Marcelo Arbo<sup>3</sup>, Rafael Moresco<sup>5</sup>, Natália Brucker<sup>2,3</sup>, Mirna Leal<sup>4</sup>, Vera M. Morsch<sup>6</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Post-graduate Program of Pharmacology, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Toxicology, Department of Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>6</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

\*Direct correspondence to Prof Dr Solange Cristina Garcia.

*E-mail address:* 00184060@ufrgs.br (S. C. Garcia).

## Abstract

N-acetylcysteine (NAC) is a potent mucolytic agent and also a improved antioxidant. Its antioxidant action is due to its ability to stimulate reduced glutathione synthesis, therefore maintaining intracellular levels. The aim of this study was to evaluate the effects of N-acetylcysteine administrated intraperitoneally, in decreasing the oxidative tissue damage in liver and kidney of Alloxan induced diabetic rats. The N-acetylcysteine treatment revealed to be more effective in liver. A significantly decrease in the lipid peroxidation and an increase in  $\delta$ -aminolevulinate dehydrates activity were observed, probably due to an efficient support of reduced glutathione in this tissue. Also, n-acetylcysteine at 75 mg/kg better restored the oxidative stress biomarkers. Our findings suggest that N-acetylcysteine can be considered a good antioxidant agent by exhibiting modulate action on the oxidative stress biomarkers analyzed in this work.

**Keywords:** Alloxan-induced diabetes; Oxidative stress; N-acetylcysteine; Malondialdehyde;  $\delta$ -Aminolevulinate dehydratase; Reduced glutathione levels.

## 1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a common disease affecting over 124 million individuals worldwide (1-2). This disease is characterized by hyperglycemia resulting from defects in both insulin secretion and/or insulin action. The precise cellular and molecular mechanisms which underlie the etiology and progression of diabetes are still not fully understood. However, oxidative stress is thought to play a central role on the development of many diabetic complications (3-4). The framework for diabetes leads to debilitating secondary complications that shorten the patient's life span (5).

In this line, an increase in lipid peroxidation and deficits in the antioxidant defense systems have been observed in a variety of experimental models of hyperglycemia (4-12). In addition, protein glycation and advanced glycation end products (AGES) formation, alteration in properties of physiologically abundant proteins such as hemoglobin (8), albumin (10), and collagen (10) are enhanced under oxidative stress (11-20). However, published data on animal models or clinical studies about the effects of hyperglycemia on less abundant proteins, such as aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D), are rare (17-19).

$\delta$ -Aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D), an enzyme of the heme biosynthesis pathway, is essential for all aerobic organisms. It is a marker for oxidative stress because its active sulfhydryl group renders it highly sensitive to pro-oxidant elements (18-21), which impair its function (22-31)

Other enzymatic oxidative stress biomarkers are superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). The GPx enzyme is presented in all cells, functioning as a protector of membranes (32-33), and possibly DNA, from damage by hydroperoxides (34). Also, by preventing peroxide-mediated inactivation of SOD (35) it indirectly protects the cell from damage by the superoxide radical. Interestingly, SOD protects GPx from inactivation by superoxide radicals (36).

Thus, compounds that present anti-hyperglycemic and/or antioxidant effects are of potential therapeutic interest for the treatment of human and animal diabetes (37-40).

N-acetylcysteine (NAC) plays a crucial role in therapeutics as an integral component of several antioxidant enzymes involved in peroxide decomposition (41-45). This thiol-containing antioxidant has been used to mitigate various conditions of oxidative stress. Its antioxidant action is believed to originate from its ability to stimulate GSH synthesis, therefore maintaining intracellular GSH levels (46-47).

Rumack and Prescott showed that an overdose of paracetamol produces rapid and intense necrosis and fulminant liver failure if glutathione is completely depleted in the process of intoxication. NAC administration became an antidote in paracetamol overdose since the intravenous administration allows restoring the glutathione levels and patient survival. Prescott suggested administering NAC infusion at a dose of 150mg/kg in 4 hours and 100mg/kg over 16 hours making a total dose of 250mg (48-49).

The aim of this study was to investigate the possible effects of N-acetylcysteine (NAC) in the levels of malondialdehyde (MDA) and GPx, GSH, SOD and ALA-D activity were evaluated in liver and kidney of alloxan-induced diabetic rats. Additionally, we evaluated whether kidney or liver, separately, is more susceptible to oxidative damage and/or NAC protection.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Chemicals**

5`-Aminolevulinic acid (ALA), dithiothreitol (DTT), N-acetylcysteine (NAC), thiobarbituric acid (TBA), alloxan, reduced glutathione (GSH), 5,5'-dithiobis(2)-nitrobenzoic acid (DTNB) were obtained from SIGMA (St. Louis, MO, U.S.A.).

### **2.2. Animals**

Adult male Wistar rats were used (200-350g) from Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil). The animals were housed under controlled temperature ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and humidity (56%) on a

12 h light-dark cycle with free access to food and water. Before the beginning of the experiments, the animals were adapted in cages for 20 days. The experimental protocols were according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, and were previously approved by University Ethics Committee (protocol number: 54/2008).

All rats were weighted at the onset and at the end of the experiment.

### 2.3. Diabetes Induction

Diabetes was induced according with Szkudelski et al., 1998, by a single intraperitoneal (i.p.) injection of alloxan monohydrate (150 mg/kg), dissolved in 0.05M sodium-citrate buffer pH 4.5. The control group received a similar volume of the vehicle (citrate buffer, 1 ml/kg). In order to reduce death due to hypoglycemic shock, alloxan-treated rats received by gavage 20% of glucose instead of water for 6 h after diabetes induction. The animals were kept for 15 days under normal food for later evaluation of the glicemia (50). Blood samples were taken 24h after alloxan or vehicle injection in the tail vein. Glucose levels were measured with an automatic analyzer (ADVANTAGE, Boehringer Mannheim, MO, USA). Only animals with fasting glycemia over 200 mg.dL<sup>-1</sup> were considered diabetic.

### 2.4. Treatment

The animals were randomly divided into six groups (n=6): **(1)** non-diabetic animals treated with saline 0.9% (control); **(2)** non-diabetic animals treated with NAC 25mg/kg (NAC 25); **(3)** non-diabetic animals treated with NAC 75mg/kg (NAC 75); **(4)** diabetes induced animals treated with saline 0.9% (Diabetics); **(5)** diabetes induced animals treated with NAC 25mg/kg (D NAC 25); **(6)** diabetes induced animals treated with NAC 75mg/kg (D NAC 75).

NAC solution was freshly prepared in saline solution 0.9% and was administered via i.p., between 14 and 16 p.m. during 30 days. After the treatment period, animals were submitted to euthanasia. The blood was

collected by cardiac puncture for biochemical assay and the kidney and liver tissue were removed for oxidative stress analysis.

## **2.5. Tissue preparation**

Tissues (liver and kidney) were quickly removed, placed on ice and homogenized in cold 0.1M Tris-HCl pH 7.4 to MDA,  $\delta$ -ALA-D, SOD and GPx analysis. The homogenate was centrifuged at 3000g for 10min to yield the low-speed supernatant fraction that was used for oxidative stress biomarkers analysis. For GSH analysis, a cut of tissue was homogenized in 25 volumes (w/v) of 0.5N perchloric acid and centrifuged under the same conditions previously cited.

## **2.6. Blood Samples**

Blood was collected by cardiac puncture from diabetic and control rats and divided in tubes without any anticoagulant, thus serum was obtained by centrifugation at 1500g for 10min at 4°C.

## **2.7. ALA-D activity**

$\delta$ -ALA-D activity was assayed according to Sassa (51) by measuring the rate of product porphobilinogen (PBG) formation. The reaction was started by addition of the substrate (ALA) and incubation was carried out at 37 °C for 1h. The reaction of product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555nm, with a molar absorption coefficient of  $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  for the Ehrlich-PBG salt.

## **2.8. Lipid peroxidation**

Lipid peroxidation was estimated by the measurement of malondialdehyde (MDA) levels. The MDA was determined in supernatant from

kidney and liver by high performance liquid chromatographic with visible detection (HPLC-VIS), according to the method of Grotto et al (52).

### **2.9. Reduced Glutathione (GSH)**

The quantification of GSH in tissue homogenates was realized according to Garcia et al. Derivatization of the samples was carried out with 350  $\mu$ l DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid)) by high performance liquid chromatography UV (53).

### **2.10. Superoxide dismutase**

The superoxide dismutase activity was measured by the spectrophotometric method of McCord and Fridovich, 1969 (54).

### **2.11. Glutathione peroxidase**

Glutathione peroxidase was measurement in spectrophotometer by the method of Paglia and Valentine, 1967 (55).

### **2.12. Biochemical parameters**

Creatinine, urea, aspartate transaminase (AST), and alanine transaminase (ALT) were determined by Doles® commercial kits, using serum samples.

### **2.13. Statistical analysis**

All values obtained are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) Data were analyzed by one-way or two-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test when appropriate. Differences between groups

were considered to be significant when  $p < 0.05$ . Data were analyzed using the Statistica<sup>®</sup> 6.0 software system (Statsoft Inc., 2001).

### 3. RESULTS

Information related to each group studied including weight and glicemia are shown in Table 1. The body weight was reduced in diabetic rats in comparison to control groups (treated or not with NAC) after 30 days of the treatment. Blood glucose levels were higher in diabetic rats ( $> 200\text{mg/dL}$ ) when compared with non diabetic ones.

In Figure 1 the MDA levels found in liver and kidney from the different groups are shown. The MDA levels in groups treated with NAC 25 ( $189.38 \pm 12.59 \mu\text{M}$ ) and 75 mg/kg ( $129.21 \pm 7.46 \mu\text{M}$ ) were significantly ( $p < 0.01$ ) lower in comparison with controls ( $297.63 \pm 26.3 \mu\text{M}$ ). Post hoc comparisons also demonstrated that in diabetes-induced group the MDA levels ( $427.77 \pm 28.95 \mu\text{M}$ ) presented were significantly higher than in controls ( $p < 0.01$ ). In the same manner, the NAC significantly reduced the MDA levels to  $254.96 \pm 13.26 \mu\text{M}$  and  $168.10 \pm 14.02 \mu\text{M}$  in diabetic rats treated with 25 and 75mg/kg NAC, respectively.

In kidneys, the subchronic treatment with the antioxidant NAC significantly ( $p < 0.05$ ) decreased the MDA levels, being  $203.80 \pm 14.16 \mu\text{M}$  in controls and  $117.45 \pm 10.86$  and  $130.95 \pm 12.68 \mu\text{M}$  in rats that received 25 and 75 mg/kg, respectively. Surprisingly, the diabetes induction did not alter the lipid peroxidation, since this group presented MDA values of  $158.11 \pm 17.14 \mu\text{M}$ , which were not significantly different from the control group.

In relation to ALA-D (Figure 2), in liver it was observed that its activity is not NAC dose-dependent, because there was no significant difference among enzymatic activity found in controls animals ( $0.77 \pm 0.05\text{IU}$ ); NAC 25 mg/kg group ( $0.67 \pm 0.01\text{IU}$ ) or NAC 75 mg/kg group ( $0.61 \pm 0.01\text{IU}$ ).

Two-way analysis of variance (in non-diabetic rats and diabetes-induced rats) revealed a significant main effect of glicemia on the decrease in hepatic ALA-D activity ( $0.77 \pm 0.05$  and  $0.45 \pm 0.03 \text{ IU}$ , respectively). Moreover, antioxidant NAC is able to restore the ALA-D activity; however this activation did

not depend of the dose, since NAC 25 mg/kg caused a higher enzyme activity than NAC 75 mg/kg ( $1.84 \pm 0.05$  IU vs  $0.57 \pm 0.06$  IU, respectively).

In the kidneys, there were no significant alterations in ALA-D activity. The same was observed when NAC 25 mg/kg and 75 mg/kg were compared to control. However, diabetic rats treated with NAC 25 mg/kg and NAC 75 mg/kg presented a significantly higher ALA-D activity ( $p < 0.005$ ) than the diabetic group.

GSH levels (Figure 3) in the hepatic tissue were not significantly different in diabetic and non diabetic animals. However, in groups treated with NAC 25 mg/kg ( $5.185 \pm 0.325$  mM) and 75 mg/kg ( $6.875 \pm 0.632$  mM) a significant increase ( $p < 0.05$ ) of GSH levels was observed, comparing to the control ( $3.85 \pm 0.396$  mM). In opposition to this, diabetic rats treated with NAC 25 and 75 mg/kg presented a significant decrease ( $p < 0.001$ ) in GSH levels,  $2.856 \pm 0.293$  mM and  $2.186 \pm 0.186$  mM, respectively, when compared to diabetic animals ( $4.45 \pm 0.315$  mM).

GSH concentration in kidneys was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the diabetic group ( $1.59 \pm 0.12$  mM) than in the control ( $1.00 \pm 0.09$  mM). The GSH levels were significantly increased ( $p < 0.05$ ) in animals treated with NAC 75 mg/kg ( $1.37 \pm 0.09$  mM). Moreover, the NAC administration in diabetic rats ( $1.25 \pm 0.09$  mM and  $2.12 \pm 0.16$  mM respectively for NAC 25 and 75 mg/kg) significantly enhanced ( $p < 0.05$ ) GSH contents when compared to the diabetic group.

In Figure 4 the GPx activity is shown. The results in hepatic tissue were significantly increased ( $p < 0.005$ ) in the diabetic group ( $19.48 \pm 1.41$   $\mu$ mol NADPH/min/g tissue) in comparison to the control group ( $12.84 \pm 1.60$   $\mu$ mol NADPH/min/g tissue). However, no differences were observed between NAC treated groups.

In kidneys, GPx activity was significantly enhanced ( $p < 0.05$ ) in NAC 25 mg/kg ( $10.74 \pm 0.73$   $\mu$ mol NADPH/min/g tissue) and NAC 75 mg/kg ( $10.39 \pm 0.30$   $\mu$ mol NADPH/min/g tissue) groups when compared to the control ( $9.37 \pm 0.59$   $\mu$ mol NADPH/min/g tissue). The same was observed in diabetic animals, those who received NAC 25 mg/kg ( $11.81 \pm 0.38$   $\mu$ mol NADPH/min/g tissue) and NAC 75 mg/kg ( $12.60 \pm 0.62$   $\mu$ mol NADPH/min/g tissue) presented a

significant increase ( $p < 0.01$ ) in GPx activity comparing to the untreated diabetic rats ( $9.49 \pm 0.57 \mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g tissue}$ ).

Figure 5 shows the SOD activity in hepatic and renal tissue. When compared to the control group ( $6.98 \pm 0.62 \text{ U}/\text{mg tissue}$ ), SOD activity in liver of rats treated with NAC 25 mg/kg ( $15.46 \pm 1.60 \text{ U}/\text{mg tissue}$ ) and NAC 75 mg/kg ( $17.84 \pm 1.97 \text{ U}/\text{mg tissue}$ ) was significantly higher ( $p < 0.001$ ). No differences were observed between diabetic animals ( $10.19 \pm 0.59 \text{ U SOD}/\text{mg tissue}$ ) and non diabetic ones ( $p < 0.07$ ).

In kidneys, there were not significant differences in SOD activity between control and diabetic groups. The same occurred when treated healthy animals were compared to the control. However, a significant increase ( $p < 0.001$ ) in the SOD activity was observed in the diabetic group treated with 75 mg/kg of NAC ( $20.33 \pm 1.92 \text{ U}/\text{mg tissue}$ ) when compared to the untreated diabetic animals ( $13.56 \pm 1.02 \text{ U}/\text{mg tissue}$ ).

The results obtained of hepatic and renal function were not significantly different when treated diabetic and untreated diabetic animals were compared, independent of NAC concentration (results not shown).

## 5. DISCUSSION

Elevated glucose level causes oxidative stress due to an increased production of reactive oxygen species (ROS) (56). The increased production of ROS has been attributed to nonenzymatic protein glycation and glucose autoxidation due to a hyperglycemic environment and this can induce lipid and protein oxidation (57). Moreover, diabetic nephropathy is the main diabetic microvascular complication, being the second leading cause of death in diabetics (56). In this way, the present scientific work studied a relationship between oxidative stress biomarkers and NAC administration, such as a possible antioxidant on renal and hepatic tissues damage, in alloxan induced-diabetic rats.

It is known that NAC is widely utilized in patients intoxicated with overdose of acetaminophen because it acts as an antioxidant directly and/or increases the intracellular reduced glutathione (GSH), consequently it possesses capacity of decrease hepatic damage by reduction of oxidative stress (58-59).

Thus, this is the first study evaluating the effect of NAC at 25 and 75 mg/kg, intraperitoneally, on oxidative damage through the enzymes GPx and SOD; ALA-D activity and GSH levels; MDA levels as a lipoperoxidation biomarker on kidney and liver of diabetic and non diabetic rats.

In relation to NAC, it was observed that their protector effects under lipid peroxidation are more efficient in liver of diabetic rats, since this antioxidant significantly decreased the MDA levels to values similar to the control group. Additionally, the dose of 75 mg/kg of NAC is more efficient than the dose of 25 mg/kg in limiting this peroxidative process. This found can be explained by the fact that the liver has one of the highest organ contents of GSH and is unique in two aspects of GSH biosynthesis (60). Due to this GSH production, linked to its compensatory mechanism (61) caused by diabetes, we propose that NAC could be used to restore the MDA levels, which cause a decrease in the GSH concentration in the liver of diabetics.

In relation to ALA-D activity, the dose of 75 mg/kg of NAC was also able to restore it (in kidney and liver) to values higher than the control group in both treated controls and treated diabetics. Additionally, we can suppose that the thiol groups of the NAC antioxidant can protect ALA-D enzyme directly through the donation of thiols from NAC to this enzyme (62), and indirectly by increasing GSH levels (63).

The treatment with different doses of NAC did not affect the levels of SOD and GPx in liver of diabetic animals; maybe because the doses used were not able to change those levels.

In conclusion, the results presented indicate that the doses of NAC tested in this study are efficient only in liver, i.e., it has a mechanism of protection under oxidative stress that is tissue-dependent, since oxidative stress biomarkers have different effects depending on the treatment and the dose of NAC administered. Additionally, the antioxidant capacity of the treatment with NAC seems to be more efficient in diabetic animals than in non diabetic ones. Furthermore, the use of NAC as an antioxidant may be more specific in chronic diseases, such as diabetes.

## **6. ACKNOWLEDGMENTS**

S.C. Garcia has received CNPq the researcher fellowship.

## 7. REFERENCES

1. Valko M, Lakovic M, Mazur M, Rhodes JC, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 2004;266:37-56.
2. Kumaraguruparan R, Kabalimoothy J, Nagini S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Mol. Cell. Biochem.* 2005; 38:154-158.
3. Flechner I, Maruta K, Burkart V, Kawai K, Kolb H, Kiesel U. Effects of radical scavengers on the development of experimental diabetes. *Diab. Res.* 1990;13:67-73.
4. Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and complications: a summary of a congress series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diab Metab. Res. Rev.* 2001;35:189–212.
5. Gabriel D, Pivetta L, Folmer V, Soares JCM, Augusti GR, Nogueira CW, Zen G, Rocha JBT. Human erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups.. *Cell. Biol. Int* 2005;29(8):669-674.
6. Armstrong AM, Chestnutt JE, Gormley MJ, Young IS . The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependent diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;21: 719–726.
7. Wolff SP, Jiang XY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes and aging, *Free Radic. Biol. Med.* 1991;10:339–352.
8. Schwartz JG. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diab. Rev.* 1995;3:269–287.
9. Day JF, Thorpe SR, Baynes JW. Non-enzymatically glycosylated albumin. *J. Biol. Chem.* 1979;254:595–597.
10. Fu MX, Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. Role of oxygen in crosslinking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes.* 1992;41:42–48.

11. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosilation, glucose oxidation as cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging,. *Biochem. J.* 1997;256:205–212.
12. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;5:113–124.
13. Jennings PE, Jones AF, Florkowski CM, Lunec J, Barnett AH. Increased diene conjugates in diabetic subjects with microangiopathy. *Diab. Med.* 1987; 4:452–456.
14. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP. The role of oxidative stress and NF-KB activation in late diabetic complications, *Biofactors.* 1999;10:157–167.
15. Wolff SP, Jiang XY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 1991;10:339–352.
16. Sensi M, Pricci F, Pugliese G, De Rossi MG, Petrucci AF, et al. Role of advanced glycation end-products (AGE) in late diabetes complications, *Diab. Res. Clin. Pract.* 1995;8:9–17.
17. Caballero FA, Gerez E, Polo C, Vazquez E, Batlle A. Reducing sugars trigger aminolevulinate dehydratase inactivation; evidence of in vitro aspirin prevention, *Gen. Pharmacol.* 1998;31:441–445.
18. Folmer V, Soares JC, Rocha JB. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002;34:1279–1285.
19. Folmer V, Soares JC, Gabriel D, Rocha JB. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J Nutr.* 2003;133:2165–2170.
20. Maciel EN, Bolzan RC, Braga AL, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2000;14:310–319.

21. Soares JCM, Folmer V, Rocha JBT. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. *Nutrition*. 2003;19(7-8):627-632.
22. Rodrigues AL, Rocha JB, Pereira ME, Souza DO.. Delta aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1996;57(1):47-53.
23. Rocha JBT, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari RS, Souza DO. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal braingrowth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats, *Toxicology*. 1995;100: 27–37.
24. Rocha JBT, Gabriel D, Zeni G, Posser T, Siqueira L, Nogueira CW, Folmer V. Ebselen and diphenyl diselenide change biochemical hepatic responses to overdose with paracetamol *Environ. Toxicol. Pharm.* 2005;19:255-261.
25. Barbosa NBV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC, Braga AL. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998;149:243–253.
26. Flora SJ, Pande M, Mehta A.. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Interact.* 2003;145:267-280.
27. Farina M, Folmer V, Bolzan RC, Andrade LH, Zeni G, Braga AL, Rocha JBT. Selenoxides inhibit delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol. Lett.* 2001; 119:27–37.
28. Jaques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT,. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 2001;44:119–125.
29. Valentini J, Grotto D, Paniz C, Rohers M, Burg G, Garcia SC. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomed. Pharmacother.* 2008;2(6):378-382.
30. Paniz C, Tessele F, Bairos A, Moro AM et al. The blood vitamins levels present relation with oxidative stress markers and cognitive deficit in healthy elderly women. *Clin. Biochem.* 2007;49(18):1367-1372.

31. Moro AM, Charão M, Brucker N, Bulcão R, Freitas F, Guerreiro G, Baierle M, Nascimento S, Waechter F, Hirakata V, Linden R, Thiesen FV, Garcia SC. . Effects of low exposure levels to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Sci Total Environ.* 2010;408(15):4461-4467.
32. Flohe I. Glutathione peroxidase brought into focus. *Free radicals in biology.* 1982.
33. Chu ML, et al. *Nucleic Acids Res.* 1982, 10:5424–5434.
34. Christophersen BO. Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1969;176(3):463-470.
35. Hodgson EK, Fridovich I. Interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry,* 1975;14(24):5294-5299.
36. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* 1985;240(2):500-508.
37. Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (Vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003;41:995–998.
38. Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R, Chatterjee M. Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed. Pharmacother.* 1998;52:89–95.
39. Berg EA, Wu JY, Campbell L, Kagey M, Stapleton SR. Insulin-like of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochemie.* 1995;77: 919–924.
40. Stapleton SR. Selenium: an insulin-mimetic. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000;57: 1874–1879.
41. Behne D, Scheid S, Kyriakopoulos A, Hilmert A. Subcellular distribution of selenoproteins in the liver of the rat, *Biochim. Biophys. Acta.* 1990;1033:219–225.
42. Flohe L, Gunzier WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenium enzyme. *FEBS Lett.* 1973;32:132–134.

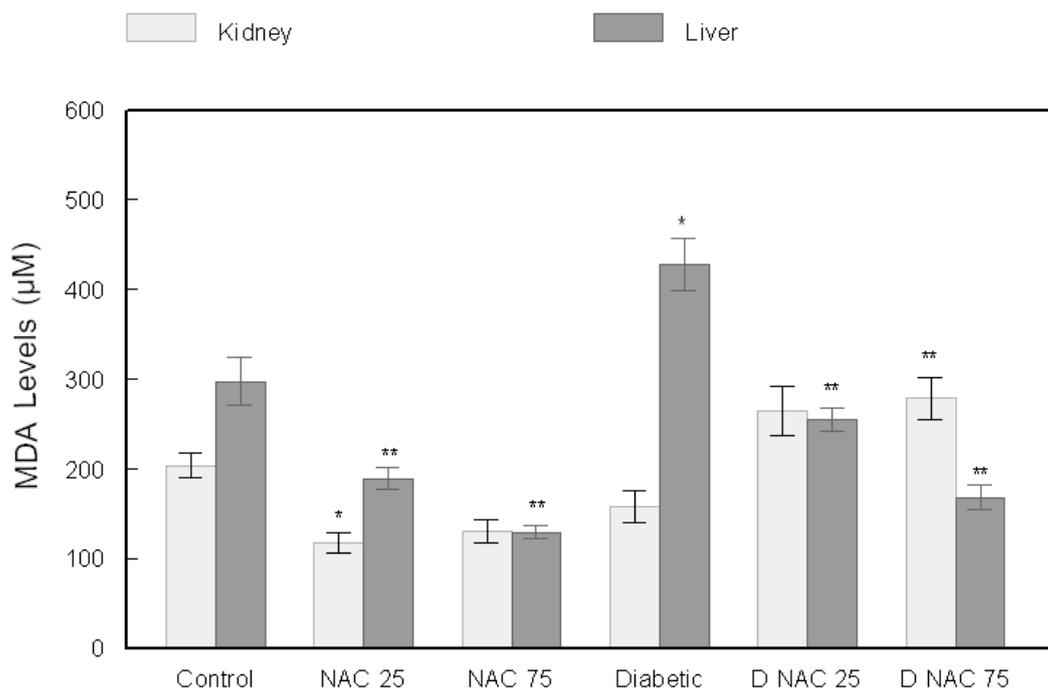
43. Linder MC. Nutrition and metabolism of the trace elements, *Nutr. Biochem. Metab.* 1990;7:216–277.
44. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 1973;179:175–179.
45. Ursini F, Bindoli A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids.* 1982;44:255–276.
46. Dincer Y, Telci A, Kayali R. Effect of lipoic acid lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002;29:281–284.
47. Ezaki O. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1990;265:1124–1130.
48. Prescott LF. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs.* 1983;25:290-314.
49. Rumack BH. Management of acetaminophen overdose. *Arch. Intern. Med.* 1981;141:401-3.
50. Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. Alloxan *in vivo* does not only exert deleterious effects on pancreatic beta cells. *Physiol. Res.* 1998;47:343-346.
51. Sassa S. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 1982;28:133–145.
52. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007;43:619-624.
53. Garcia SC, Schott K, Charão M, Moro A, Bulcão R, Grotto D, Valentini J, Bohrer D, Cardoso S, Pomblum V.. Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients. *Biomed Chromatogr.* 2008, 22(5):460-468.

54. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-6055.
55. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70(1):158-169.
56. Cvetković T, Mitić B, Lazarević G, Vlahović P, Antić S, Stefanović V.. Oxidative stress parameters as possible urine markers in patients with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.*, 2009;23:337-342.
57. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidative modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-478.
58. Tepel M, Giet van der M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N. Engl. J. Med.* 2000;343:180-184.
59. Tepel M, Giet van der M, Statz M, Zidek W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure. *Circulation.* 2003;107:992-995.
60. Lu SC.. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 1999;13:1169-1183.
61. Lucchi L, Bergamini S, Iannone A, Perrone S, Stipo L, Olmeda F, Caruso F, Tomasi A, Albertazzi A. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. *Artif Organs.* 2005;29(1):67-72.
62. Winniford MD, Kennedy PL, Wells PJ, Hillis LD. Potentiation of nitroglycerin-induced coronary dilatation by N-acetylcysteine. *Circulation* 1986;73:138–142.
63. Grierson L, Hildenbrand K, Bothe E. Intramolecular transformation reaction of the glutathione thiyl radical into a non-sulphur-centred radical: a pulse-radiolysis and EPR study. *Int J Radiat Biol.* 1992; 62(3):265-277.

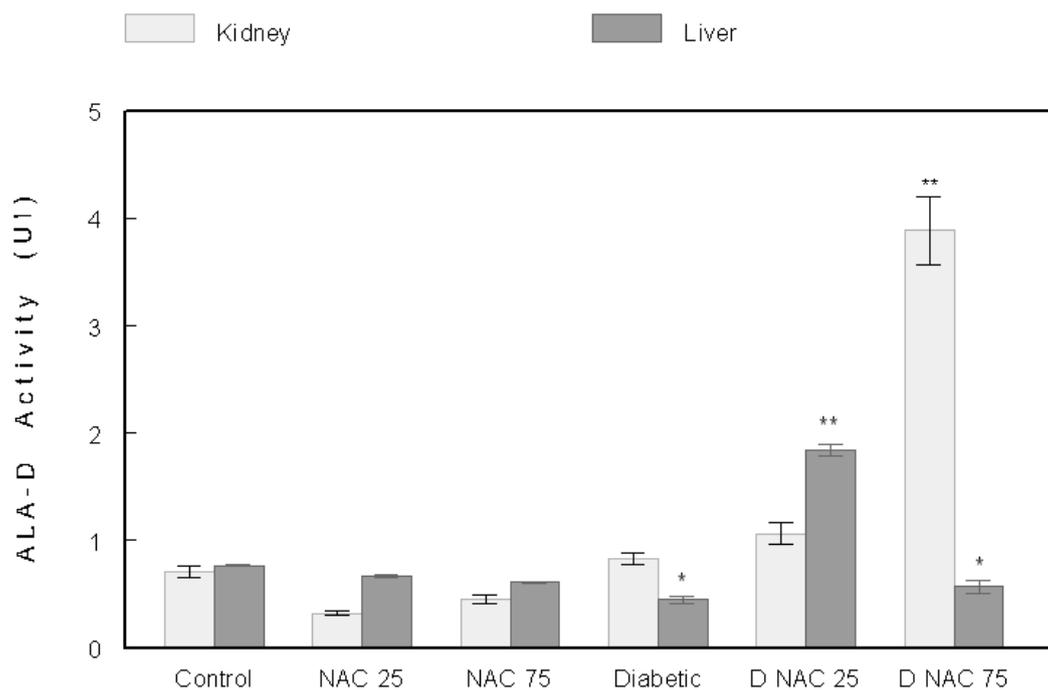
**Table 1. Body weight and glucose levels of all rat groups.**

Groups	Onset weight (g)	End weight (g)	Glucose onset (mg/dL)	Glucose end (mg/dL)
Control	332 + 8.53	325 + 11.90	69.50 + 3.52	69.25 + 3.40
NAC25	334 + 37.36	370 + 24.89	68.60 + 1.60	60.00 + 1.76
NAC75	332 + 6.63	332 + 5.83	66.11 + 2.51	65.20 + 3.00
Diabetic	240 + 5.77*	226 + 8.82*	347.66 + 34.26*	400.33 + 26.02*
DNAC25	229 + 12.03*	194 + 10.87*	347.00 + 13.98*	415.42 + 13.14*
DNAC75	216 + 7.48*	182 + 9.69*	337 + 26.79*	379.60 + 33.91*

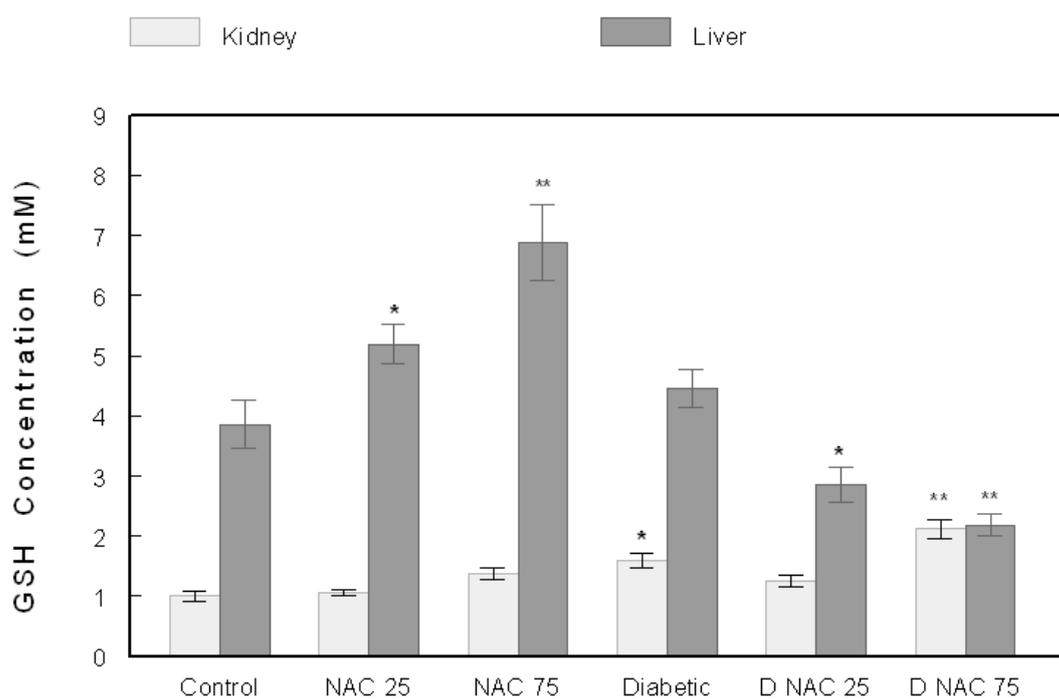
Control (saline); NAC25 – control treated with 25 mg/kg NAC; NAC75 – control treated with 75 mg/kg NAC; Diabetic (saline); DNAC25: Diabetic treated with 25 mg/kg NAC; DNAC75 Diabetic treated with 75 mg/kg NAC (n=6/group). Results expressed as mean ± SE. \*Significantly different from control/saline group (p<0.05). (ANOVA/Duncan; p<0.05).



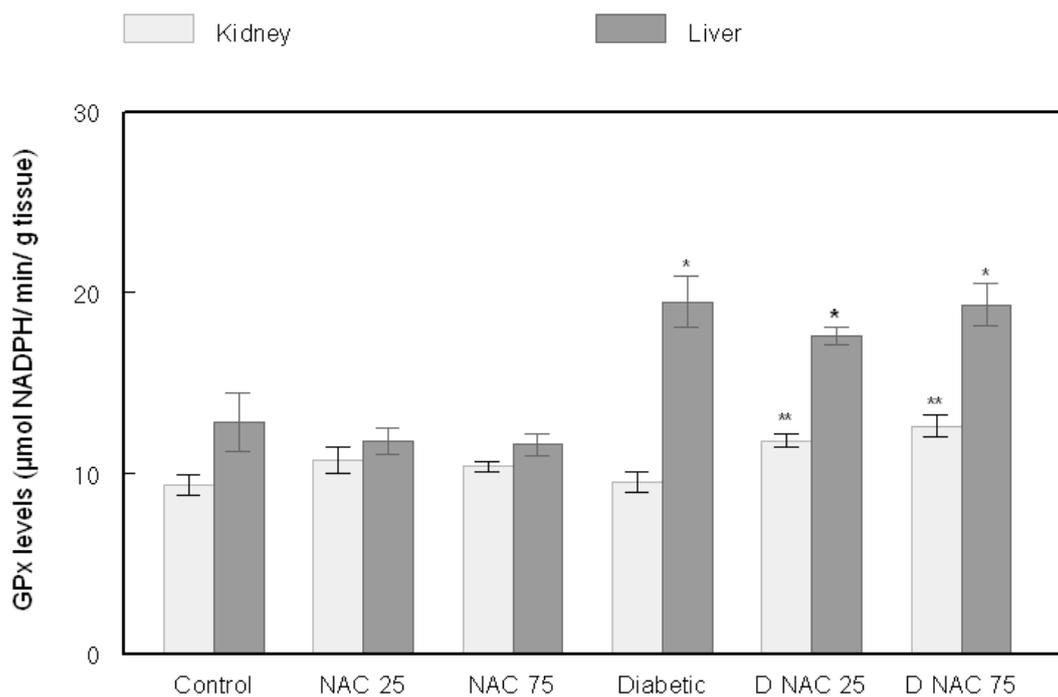
**Figure 1:** MDA levels ( $\mu\text{M/L}$ ) in kidney and liver of control (saline); NAC25 – control treated with 25 mg/kg NAC; NAC75 – control treated with 75 mg/kg NAC; Diabetic (saline); DNAC25: Diabetic treated with 25 mg/kg NAC; DNAC75 Diabetic treated with 75 mg/kg NAC ( $n=6/\text{group}$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SE. \*Significantly different from control. \*\*Significantly different from control and from diabetic (ANOVA/Duncan;  $p<0.05$ ).



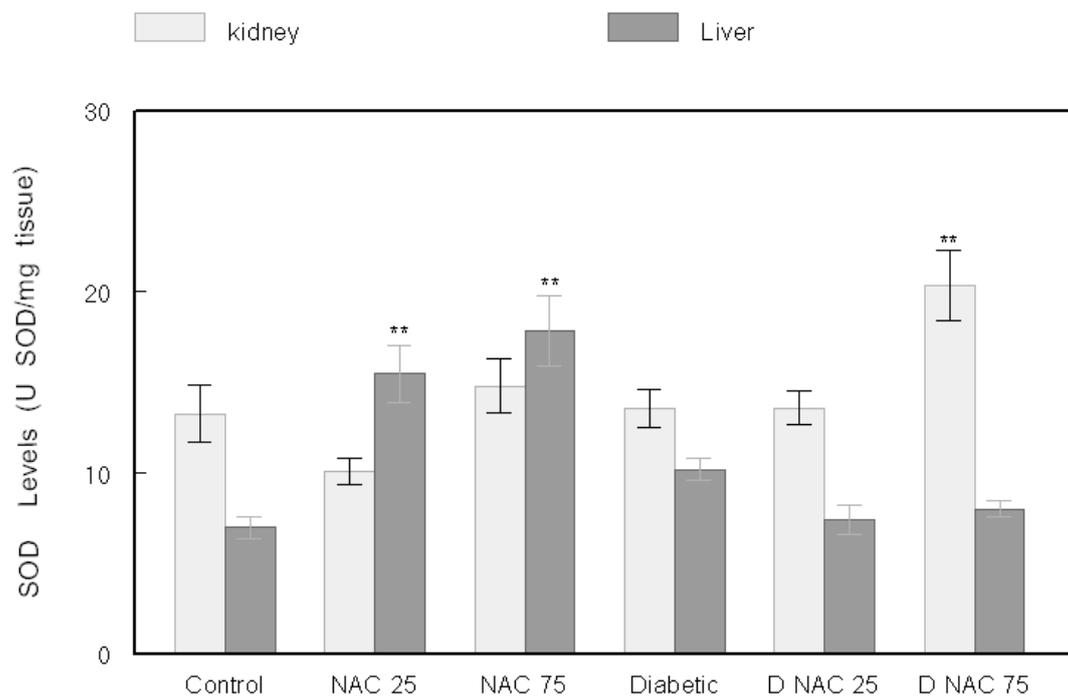
**Figure 2:** ALA-D activity (IU) in kidney and liver of control (saline); NAC25 – control treated with 25 mg/kg NAC; NAC75 – control treated with 75 mg/kg NAC; Diabetic (saline); DNAC25: Diabetic treated with 25 mg/kg NAC; DNAC75 Diabetic treated with 75 mg/hg NAC (n=6/group). Results are expressed as mean  $\pm$  SE. \*Significantly different from control. \*\*Significantly different from control and from diabetic (ANOVA/Duncan;  $p < 0.05$ ).



**Figure 3:** GSH levels (mM) in kidney and liver of control (saline); NAC25 – control treated with 25 mg/kg NAC; NAC75 – control treated with 75 mg/kg NAC; Diabetic (saline); DNAC25: Diabetic treated with 25 mg/kg NAC; DNAC75 Diabetic treated with 75 mg/hg NAC (n=6/group). Results are expressed as mean  $\pm$  SE. \*\*Significantly different from control and from diabetic (ANOVA/Duncan;  $p < 0.05$ ).



**Figure 4:** GPx activity ( $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g tissue}$ ) in kidney and liver of control (saline); NAC25 – control treated with 25mg/kg NAC; NAC75 – control treated with 75mg/kg NAC; Diabetic (saline); DNAC25: Diabetic treated with 25mg/kg NAC; DNAC75 Diabetic treated with 75mg/hg NAC ( $n=6/\text{group}$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SE. \*Significantly different from control. \*\*Significantly different from control and from diabetic (ANOVA/Duncan;  $p<0.05$ ).



**Figure 5:** SOD activity (U/mg tissue) in kidney and liver of control (saline); NAC25 – control treated with 25 mg/kg NAC; NAC75 – control treated with 75 mg/kg NAC; Diabetic (saline); DNAC25: Diabetic treated with 25 mg/kg NAC; DNAC75 Diabetic treated with 75 mg/hg NAC (n=6/group). Results are expressed as mean  $\pm$  SE. \*Significantly different from control. \*\*Significantly different from control and from diabetic (ANOVA/Duncan;  $p < 0.05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

O *Diabetes Melitus* é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que existam mais de 150 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que projeções da Organização Mundial da Saúde para 2025 sugerem que esse número possa chegar a 300 milhões (Lerco, 2003).

Essa patologia caracteriza-se por uma desordem no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas (Crawford, 2000). Dependendo da etiologia do diabetes, existem fatores que podem contribuir, em maior ou menor escala, para a hiperglicemia, como a redução da secreção da insulina (Powers, 2001). Estudos mostram que o DM tem ligação com o estresse oxidativo e sugerem que a hiperglicemia possa ser o fator responsável por esse desequilíbrio (Maxwell, 1997)

No presente estudo foi possível observar a relação existente entre o estresse oxidativo e o diabetes, através da indução dessa patologia com aloxano, droga que destrói as células  $\beta$  pancreáticas e leva a insuficiência insulínica primária, em ratos (Lerco, 2003).

Para observar a peroxidação lipídica, que é um indicador preciso de estresse oxidativo, pois altera a permeabilidade celular e pode levar a morte celular, foram quantificados os níveis de malondialdeído (MDA), o qual é um dos produtos finais dessa peroxidação. No rim, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e o grupo diabético. Entretanto, no fígado, os níveis de MDA nos animais diabéticos apresentaram-se maiores do que nos animais saudáveis. Isso pode ser explicado pelo fato de que o fígado absorve mais glicose que os rins, e a peroxidação lipídica pode estar relacionado às reações de glicação (Sacca, 1984; Sidossis, 1999).

Outros parâmetros utilizados para observar o estresse oxidativo foram as enzimas GSH, GPx e SOD, que são antioxidantes importantes. O grupo diabético mostrou níveis maiores de GSH do que o grupo controle, tanto no tecido hepático como no renal. Com relação a GPx e SOD, o grupo diabético apresentou maiores níveis que o grupo controle apenas no fígado. Esses dados sugerem que pode existir um mecanismo compensatório desses antioxidantes, uma vez que a indução do diabetes causou um aumento da

produção de espécies reativas, e, para tentar combatê-las, o organismo produziu mais enzimas antioxidantes. O mesmo ocorre em outras doenças em que o dano oxidativo está envolvido (Lucchi, 2005; Valentini, 2007; Ho, 1997; Dobrino, 1996; Wiseman, 1996).

Entretanto, no rim, não houve diferença entre os grupos de animais saudáveis e diabéticos, no que se refere aos níveis de GPx e SOD. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse órgão utiliza menos glicose que o fígado, dessa maneira sofre menos alterações oxidativas (Sacca, 1984).

Neste estudo também foi observado a diminuição na atividade da enzima ALA-D no fígado dos animais que integravam o grupo diabético ao serem comparados ao controle, o que sugere que a superprodução de espécies reativas podem ter reduzido a síntese dessa enzima e/ou aumentado a sua degradação (Gugliucci, 1996). No rim, não houve alteração da atividade da enzima entre os grupos, podendo estar relacionada com os níveis de MDA, que também não estavam alterados nesse órgão (Gabriel, 2005).

Outro ponto avaliado neste estudo foi o efeito do antioxidante N-acetilcisteína (NAC), nas doses de 25 mg/kg e 75 mg/kg, sobre os biomarcadores do estresse oxidativo no fígado e no rim de ratos saudáveis e com diabetes induzido, tratando-se, portanto, de um estudo inédito. A droga em questão é um composto tiólico e precursor de glutathiona reduzida (GSH).

Os resultados obtidos sugerem que a NAC exerce um efeito protetor da peroxidação lipídica, uma vez que no fígado do grupo diabético, os níveis de MDA diminuíram até aos níveis encontrados no grupo controle. A dose que foi mais eficiente em conter esse processo foi a de 75 mg/Kg. O fígado é um órgão que tem grandes níveis do antioxidante GSH, principalmente, por ser o órgão onde esse composto é sintetizado. Devido a isso e ao mecanismo compensatório da produção de GSH no fígado em um estado diabético (Shelly, 1999; Lucchi, 2005), sugere-se que esse antioxidante é capaz de diminuir a peroxidação lipídica, conseqüentemente, reduz os níveis de GSH no fígado.

As doses administradas de NAC não alteraram os níveis de GPx e SOD no fígado. Entretanto, com relação a ALA-D, a dose de 75 mg/Kg foi capaz de aumentar a atividade dessa enzima tanto em animais saudáveis quanto em animais diabéticos, e nos dois órgãos estudados. Devido ao elucidado anteriormente, supõe-se que a proteção da enzima ALA-D pode ter ocorrido de

duas maneiras, através da doação de grupos tiólicos da NAC, ou então da doação desses grupos pela GSH, que foi produzida por esse composto antioxidante (Winniford, 1986; Grierson, 1992).

Com esses resultados, pode-se supor que o tratamento com NAC foi eficaz no combate ao estresse oxidativo apenas no tecido hepático em ratos diabéticos.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que:

- O diabetes tem relação com o estresse oxidativo, uma vez que os valores de peroxidação lipídica foram aumentados nesse grupo, corroborando outros estudos.
- O fígado sofre mais alterações oxidativas.
- O tratamento com N-acetilcisteína é eficiente para a proteção contra o estresse oxidativo apenas no tecido hepático.
- Os biomarcadores do estresse oxidativo aqui estudados, tanto no rim quanto no fígado, apresentaram-se de formas diferentes ao tratamento com o antioxidante.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, J. et al. **Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron efficiency.** Eur J Haematol, n. 47, p. 287-91, 1991.

AIELLO, L. P. et al. **Diabetic retinopathy.** Technical review. Diabetes Care, n. 21, p. 143-56, 1998.

ANDRADE J.r., D.R., SOUZA, R.B., SANTOS, S.A., ANDRADE, D.R. **Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares.** J. Bras. Pneumol., v.31, n. 1, p.60-68, 2005.

ARMSTROG, D. G. et al. **Choosing a practical screening instrument to identify patients at risk for diabetic foot ulceration.** Arch Intern Med, v.158, p. 289-92, 1998.

ARUOMA, O.I. et al. **The antioxidant action of N-acetylcysteine:** its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Free Radic. Biol. Med, v.6, p.593-7, 1989.

ASSUNÇÃO, M. C. F., SANTOS, I. S., COSTA, J. S. D. **Avaliação do processo de atenção médica:** adequação do tratamento de pacientes com diabetes mellitus , Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Cad. Saúde Pública, v.18, n.1, 2002.

ATKINSON, M. A.; MACLAREN, N. K. **The pathogenesis of insulin dependent diabetes.** N Engl J Méd, n. 331, p. 1428-36, 1994.

BABIOR, B. M. **Superoxide: a two-edged sword.** Braz J Med, v. 30, p. 141-55, 1997.

BAGIS, S.; TAMER, L.; BILGIN, G.S.R.; GULER, H.; ERDOGAN, B.E.C. **Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder?** Rheumatol. Int., v.25, n.3, p.188-190, 2005.

BAIER, J. E. et al. **Radiation protection through cytokine release by N-acetylcysteine.** Strahlenther Onkol, v. 172, p. 91-8, 1996.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Quim. Nova, n. 29, v. 1, p. 113-23, 2006.

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

BIERHAUS A. et al. **AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus.** I. The AGE concept. Cardiovasc Res, n. 37, v. 3, p. 586-600, 1998.

BORGSTROM, L.; KAGEDAL, B.; PAULSEN, O. **Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man.** Eur J Clin Pharmacol, v. 31, p. 217-22, 1986.

BOULTON, A. J. M.; GRIES, F. A.; JERVELL, J. Á. **Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy.** Diabetic Medicine, v.15, p. 508-14, 1998.

BOVERIS, A. **Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues.** Medicina, v.58, p. 350-6, 1998.

BROWNLEE M. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.** Nature, v. 414, p. 813-20, 2001.

COHEN, M. V. **Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials?** Ann Intern Méd, v. 111, p. 918-31, 1989.

CRAWFORD, J. M., COTRAN, R.S. Pancreas. In: COLLINS, T.; KUMAR, V., COTRAN, R. (Ed.) **Patologia estrutural e funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 809-33., 2000.

DAVIS, K.L. et al. **Novel effects of nitric oxide.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol, v.41, p.203-36, 2001.

De CARO, L. et al. **Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers.** Arzneimittel Forsh, n. 39, p. 382-5, 1986.

De FLORA, S. et al. **In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and or mutagenic compounds.** *Carcinogenesis*, v. 6, p. 1735-45, 1985.

De VRIES, N.; De FLORA, S. **N-acetil-L-Cysteine.** *J. Cell Biochem*, v.17F, p. S270- 7, 1993.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. **A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress.** *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, v.15, p.316-328, 2005.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B.L. **Regulation of cellular glutathione.** *Am J Physiol*; n. 257, p. L163-73, 1989.

DIAZ, J. et al. **References intervals for four biochemistry analyttes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma.** *Clin. Chem*, v.44, n.10, p. 2215-7, 1998.

ENGELGAU, M. M. et al. **Comparison of fasting and 2h glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes: diagnostic criteria and performance revisited.** *Diabetes Care*, v. 20, p. 785-91, 1997.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. **Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal.** *Method. Enzymol*, v.186, p.407-8, 1990.

FAURÉ, M. et al. **Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense.** *Phytochemistry*, v. 29, p. 3773, 1984.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FORTUÑO, A. et al. **Oxidative stress and vascular remodelling.** *Exp Physiol*, v. 90, n. 4, p. 457-62, 2005.

FRISCHER, H.; AHMAD, T. **Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency.** *J Lab Clin Med*, n. 109, p. 583-8, 1987.

GALL, M. A. et al. **Prevalence of micro- and macroalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients.** Diabetologia, v. 34, p. 655-61, 1991.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. **Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats.** Biochim Biophys Acta n.1271, v. 2-3, p. 321-6, 1995.

GILBERT, H. F.; MC LEAN, V.M. **Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange.** Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol; v. 63, p. 69-172, 1990.

GRIERSON, L.; HILDENBRAND, K.; BOTHE, E.. **Intramolecular transformation reaction of the glutathione thiyl radical into a non-sulphur-centred radical: A pulse-radiolysis and EPR study.** [International Journal of Radiation Biology](#), v. 62, p. 265 – 77, 1992.

GROSS, J. L. et al. **Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico.** Arq Bras Endocrinol Metab, n. 1, v. 46, p. 16-26, 2002.

GROSS, J. L.; NEHME, M. **Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia.** Rev Ass Med Brasil, n. 45, v. 3, p. 279-84, 1999.

GUIMARAES, F. P. M.; TAKAYANAGUI, A. M. M, **Orientações recebidas do serviço de saúde por pacientes para o tratamento do portador de diabetes mellitus tipo 2.** Revista de Nutrição, n. 15, v. 1, p. 37-44, Campinas, 2002.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** Methods Enzymol; v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E **The definition and measurement of antioxidants in biological systems.** J. Lab. Clin. Med, v. 119, p.598, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3 ed. Oxford, New York, 2000.

HALLIWELL, B.; Trends Biochem. Sci. 1999, 24, 255; Levine, M.; Daruwala, R. C.; Park, J. B.; Rumsey, S. C.; Wang, Y.; Nature 1998, 395, 231; Podmore, I. D.; Griffiths, H. R.; Herbert, K. E.; Mistry, N.; Mistry, P.; Lunec, J.; Nature 1998, 392, 559.

HARDMANN, J. G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Goldmann and Gilman's **The pharmacological basis of therapeutics**. 10<sup>th</sup> ed. International edition. Mc Graw Hill, 2001.

HEBBEL, R. P. **Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability**. J Lab Clin Med; n. 107, p. 401-4, 1986.

HOTHER-NIELSEN, O. et al. **Classification of newly diagnosed diabetic patients as insulin-requiring or non-insulin-requiring based on clinical and biochemical variables**. Diabetes Care, v. 11, p. 531-7, 1988.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P.; **Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids**. Phytochemistry, v. 26, p. 2489, 1987.

IMAGAWA, A., et al. for the Osaka IDDM Study Group. **A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies**. N Engl J Med, v. 342, p. 301-7, 2000.

INUKAI T, et al. **High glucose concentrations abolish the superoxide dismutase response of leukocytes to ascorbic acid or troglitazone in type 2 diabetes mellitus**. Life Sci, n. 70, p. 2391–401, 2002.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. **Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications**. Physiol Res, n. 53, v. 2, p. 131-42, 2004.

JOHANSEN, J. S. et al. **Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice**. Cardiovasc Diabetol, v. 45, p. 1-11, 2005.

KAKKAR, R. et al. **Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats**. Molecular and Cellular Biochemistry, v.151, p.113-19, 1995.

KELLY, G. S. **Clinical applications of N-acetylcysteine.** *Alternative Medicine Review*, n. 2, v. 3, p. 114-27, 1998.

KING, H.; AUBERT, R. E. ; HERMAN, W. H., **Global burden of diabetes, 1995-2025.** *Diabetes Care*, v. 21, p. 1414-31, 1998.

KITABCHI, A. E. et al. **Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes.** *Diabetes Care*, v. 24, p. 131-53, 2001.

KLEINVELD, H. A. et al. **Improved measurement of low-density lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein.** *Clin Chem*, v. 38, p. 2066-72, 1992.

LERCO, M.M et al. **Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos.** Estudo clínico e laboratorial. *Acta cirúrgica brasileira*, n. 2, v. 18, p.132-42, 2003.

LUCCHI, L. et al. **Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments.** *Artif Organs*; n. 29, v.1, p. 67-72, 2005.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. **Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr.** The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diab Care*, v. 15, n. 11, p. 1509-16, 1992.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J.,. **Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 Yr.** *Diabetes Care*, v. 15, p.1509-16, 1992.

MASSY, Z.A.; NGUYEN – KHOA, T. **Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management.** *J Nephrol.*, v.15, n.4, p.336-41, 2002.

MAXWELL, S.R. **Prospects for the use of antioxidant therapies.** *Drugs*, v.39, p.345-61, 1995.

MAXWELL, S. R. J. et al. **Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 27, p. 484-90, 1997.

MAYES, P. A. **Biologic oxidation.** In MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. (eds): Harper's biochemistry., Appleton & Lange, 105-11, San Mateo, 1990.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. **Glutathione.** Ann. Rev. Biochem., v. 52, p. 711, 1983.

NATHAN, D. M.; MEIGS, J.; SINGER, D. E. **The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is ...or is it?** The Lancet, n. 350, v. 1, p. 4-9, 1997.

ODIN, A.P. **Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action.** Mutation Research, n. 386, v.1, p.39-67, Amsterdam, 1997.

OLIVEIRA, J. E. P.; SOARES, D. V.; OLIVEIRA, M. M. S. **Diabetes Mellitus, classificação e diagnóstico.** Ars Cvrandi, p. 21-8, 1999.

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

ÖZGÜNER, M.F.; DELÝBAŞ N.; TAHAN V.; KOYU A.; KÖYLÜ H. **Effects of industrial noise on the blood levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde.** Eas. J. Med., v.4, n.1, p.13-15, 1999.

PACKER, L.; CADENAS, E. **Handbook of Synthetic Antioxidants;** Marcel Dekker, Inc. p. 24-8 New York, 1997.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. **Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works.** Clin Diabetes; n. 21, v. 4, p.186-7, 2003.

POWERS, A. C. DIABETES MELLITUS. In: BRAUNWALD, E. et al HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE. 15 ed. McGraw-Hill (CD-ROM).

PRATT, S, IOANNIDES, C. **Mechanism of the protective action of N-acetylcysteine and methionine against paracetamol toxicity in the hamster.** Arch Toxicol, v. 57, p.173-7, 1985.

PROGRAMA Harvard Joslin - SBD. **Educação em diabetes no Brasil: aspectos fundamentais do diagnóstico e tratamento do diabetes mellitus.** SBD. p. 94, Brasília 1996.

RAMAKRISHNA, V.; JAILKHANI, R. **Evaluation of oxidative stress in insulin dependent diabetes mellitus patients.** *Diag. Pathology.*, v.22, n.2, p.1-20, 2007.

RAY, R., SHAH, A. M. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci*, v. 109, n. 3, p. 217-26, 2005.

REICHELDT, A. J. et al, for the Brazilian Study of Gestational Diabetes (EBDG) Working Group. **Fasting plasma glucose is a useful test for the detection of gestational diabetes.** *Diabetes Care*, v. 21, p. 1246-9, 1998.

RILEY, P.A. **Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation.** *International Journal of Radiation Biology*, London, v.65, n.1, p.27-33, 1994.

RODENSTEIN, D.; De COSTER, A.; GAZZANIGA, A. **Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: absorptions, binding, and metabolism in patients with respiratory disorders.** *Clin Pharmacokin*, v. 3, p. 247-54, 1978.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. **Antioxidant defense systems and oxidative stress.** In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p.151-70, 1991.

SACCA, L. G., et al. **Differential roles of splanchnic and peripheral tissues in the pathogenesis of impaired glucose tolerance.** *J. Clin. Invest.*, v. 73, p.1683-7, 1984.

SERVICE, F. J. et al. **The classification of diabetes by clinical and C-peptide criteria. A prospective population-based study.** *Diabetes Care*, v. 20, p. 198-201, 1997.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. **Glutathione-dependent protection against oxidative injury.** *Pharmacol Ther*; v. 47, p. 61-71, 1990.

SHELLY C. LU. **Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies.** The FASEB Journal, n.13, p. 1169-83, 1999.

SIDOSSIS, L. S. et al. **Regional disposal of intravenously infused glucose during prolonged hyperglycemia-hyperinsulinemia.** J. Nutr. Biochem. v. 10, p. 547-54, 1999.

SINGAL, P. K. **Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease.** Free Radical Biol. Med, v. 26, p. 746, 1999.

SLATER, T. F. **Free radical mechanism in tissue injury.** Biochem. J., v. 222, p.1-15, 1984.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2, 2000.** Disponível em:<http://www.diabetess.org.br>

STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. **Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum.** Free Radical. Biol. Med., v.31, n.2, p.242-9, 2001.

THE EXPERT COMMITTEE on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Diabetes Care, v. 20, p. 1183-97, 1997.

TRABER, M.G. **Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants.** Mineral and Electrolyte Metabolism, Basel, n.23, v.3/6, p.135-9, 1997.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33).** Lancet, v. 352, p. 837-53, 1998.

VALENTINI, J, et al. **Human erythrocyte d-aminolevulinatase dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients.** Clin Biochem, n. 40, p. 591-4, 2007.

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

Ventresca, G. P., CICHETTI, V., FERRARI, V.: **Acetylcysteine.** In: Braga P C, Allegra L. Drug in bronchial mucology, New York, Raven Press, p. 59-67, 1989.

WINNIFORD, M. D. et al **Potential of nitroglycerin-induced coronary dilatation by N-acetylcysteine.** Circulation, n. 73, p. 138–142, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications:** report of a WHO consultation., World Health Organization, p. 59p, Geneva, 1999.

ZAFARULLAH, M. et al **Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions.** Cell. Mol. Life Sci., v.60, p.6-20, 2003.

ZIMENT, I. **Acetylcysteine:** a drug that is much more than a mucokinetic.biomed pharmacother. v. 42, p. 513-20, 1988.

ZIMMET, P. Z.; McCARTY, D. J.; de COURTEN, M. P. **The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome.** Journal of Diabetes and its complications, v. 11, p. 60-8, 1997.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** Nature, v. 414, p. 782-7, 2001.