

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/03/2019.

UNIVERSIDADE ESTATUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

ANDERSON KIYOSHI KAGA

Efeito do tratamento de N-acetilcisteína sobre o metabolismo energético e estresse oxidativo no miocárdio de ratos diabéticos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Angélica Henrique Fernandes

BOTUCATU
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Kaga, Anderson Kiyoshi.

Efeito do tratamento de N-acetilcisteína sobre o metabolismo energético e estresse oxidativo no miocárdio de ratos diabéticos / Anderson Kiyoshi Kaga. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ana Angélica Henrique Fernandes
Capes: 21000000

1. Metabolismo energético. 2. Stress oxidativo. 3. Antioxidantes. 4. Miocárdio - Doenças. 5. Rato como animal de laboratório. 6. Diabetes mellitus tipo 1.

Palavras-chave: Antioxidantes; Diabetes mellitus tipo 1; Estresse oxidativo; Metabolismo energético; Tecido cardíaco.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aímar e Kiyosí e a minha tia Ayako por me proporcionarem toda a instrução e recurso necessário para conquistar mais este passo em minha vida, a presença de vocês é de suma importância, pois vocês são a minha base, minha estrutura.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Angélica, por ter me recebido em seu laboratório, ter tido paciência comigo e pelo seu carinho. A sua orientação me proporcionou adquirir uma nova visão sobre o conteúdo abordado na área de bioquímica, bem como aprofundado todo o conhecimento teórico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aimar e Kiyosi e também a minha tia Ayako por participarem da realização deste sonho.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Angélica por ter compartilhado do seu tempo e saber, pelos auxílios fornecidos e permitido que eu pudesse navegar pelo imenso “mar” da Bioquímica.

A meus familiares de Botucatu, Lúcia e Nivaldo por terem me acolhido na chegada a cidade de Botucatu, este apoio foi fundamental para eu alcançar este objetivo.

A minhas amigas, irmãs de coração, Daniele, Fabiana, Gióia e Silvia, são as culpadas por eu alcançar este objetivo, mesmo que distantes, sempre estavam próximas me auxiliando e me acalmando nos piores momentos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório do departamento de Bioquímica, Nágilla, Pedro e Priscila, e também aos alunos de iniciação científica que passaram este período comigo, Bárbara, Lucas e Mariana.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação no programa de Farmacologia e Biotecnologia, em especial, Daniel, Lilliam e Loyane.

As minhas amadas amigas, “irmãs” de Botucatu, Ketlin, Priscila e Talita, por me acompanharem, fornecerem o ombro, e também a me puxarem a orelha quando foi necessário.

Aos técnicos do departamento de Química e Bioquímica, Augusto Santana Nascimento, Danielle Fernandes da Silva e Fábio Henrique Fava, pessoas maravilhosas que me auxiliaram durante o desenvolvimento do meu experimento e sempre estiveram dispostos a ajudar.

A secretária do departamento de Química e Bioquímica, Gabriela Cristina Gomes Valim Athanazio por me auxiliar, principalmente naqueles momentos corriqueiros.

Ao departamento de Química e Bioquímica por fornecer a estrutura física necessária para o desenvolvimento do estudo.

A seção de pós-graduação e a coordenação do programa de pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia pelo suporte acadêmico.

A CAPES pelo apoio financeiro, ao conceder a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

“Toda a arte de ensinar é apenas a arte de acordar a curiosidade natural nas mentes jovens, com o propósito de serem satisfeitas mais tarde”

(Anatole France)

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	09
<i>ABSTRACT</i>	13
<i>INTRODUÇÃO</i>	16
<i>HIPÓTESE E OBJETIVOS</i>	28
<i>CAPÍTULO 1</i>	30
<i>Evaluation of energetic metabolism and oxidative stress in cardiac tissue of diabetic rats: favorable effect of NAC</i>	
Journal of Biomedical Sciences	
<i>CAPÍTULO 2</i>	59
<i>Lipid profile of diabetic rats STZ-induced treated with N-acetylcysteine</i>	
OMICS: A Journal of Integrative Biology	
<i>CONCLUSÃO</i>	78
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	80

RESUMO

O diabetes mellitus é um grupo heterogêneo de distúrbios no metabolismo energético e consequente estresse oxidativo, fatores importante para o desenvolvimento de complicações diabéticas como cardiomiopatias. A utilização de antioxidantes tem contribuído para melhorar a hiperglicemia e também minimizar as complicações diabéticas. O N-acetilcisteína apresenta ação antioxidante e antihiperglicemiante, sendo capaz de contribuir na terapêutica desta patologia. Este estudo propôs avaliar o metabolismo energético e estresse oxidativo no miocárdio de ratos com diabetes mellitus tipo 1 tratados com N-acetilcisteína. Foram utilizados 32 ratos wistar, com peso corporal ± 250 g, e 60 dias de idade. Os animais foram distribuídos nos grupos experimentais ($n=8$): C (normais, controle); NAC (normais, tratados com N-acetilcisteína); DM (diabéticos, não tratados); DM-NAC (diabéticos, tratados com N-acetilcisteína). Os animais receberam ração e água *ad libitum*. O diabetes mellitus tipo 1 experimental foi induzido através da administração de estreptozotocina através da via intraperitoneal, em dose única, dose de 60mg Kg^{-1} de peso corporal. Os animais dos grupos NAC e DM-NAC receberam N-acetilcisteína, por via intragástrica com dose de $25\text{mg Kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ durante 37 dias. Durante o período experimental (37 dias) foram avaliados consumo de água e ração. Após o período experimental os animais, em jejum de 12h, foram anestesiados (xilazina e cetamina) e eutanasiados. O sangue e tecido cardíaco ($\pm 100\text{mg}$ ventrículo esquerdo) foram coletados e armazenados em freezer -80°C . Os resultados foram analisados por ANOVA One-way seguido do teste de Tukey para comparação das médias. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0.05$. A ingesta alimentar e hídrica foi maior ($p < 0.05$) no grupo DM, quando comparado aos demais grupos. Enquanto o peso corporal diminuiu ($p < 0.05$) em animais diabéticos em relação a C e NAC, os quais não diferiram ($p > 0.05$) de DM-NAC. O NAC reduziu ($p < 0.05$) a glicemia nos ratos diabéticos, porém apresentou glicemia maior que os ratos normais (C e NAC). A insulina sérica no grupo DM-NAC esteve aumentada ($p < 0.05$) quando comparada aos ratos do grupo DM. A energia ingerida e o consumo de carboidratos e proteínas aumentou ($p < 0.05$) em ratos diabéticos não tratados (DM) comparativamente aos demais grupos, porém sem diferença significativa ($p > 0.05$) entre C e NAC. A eficiência alimentar em DM foi menor ($P < 0.05$) quando comparada a DM-NAC, os ratos normais (C e NAC) apresentaram valores maiores ($P < 0.05$) que os diabéticos. A concentração cardíaca de proteínas totais e glicogênio em animais diabéticos (DM) foi inferior ($p < 0.05$) aos

demais grupos, sendo que o tratamento com NAC melhorou ($p<0.05$) estes parâmetros. A atividade da fosfofrutoquinase no miocárdio de ratos diabéticos foi recuperada ($p<0.05$) pela administração de NAC alcançando valores dos grupos obtidos para C e NAC. Não houve diferença estatística na atividade da lactato desidrogenase sérica entre os grupos ($p>0.05$). O NAC reduziu ($p<0.05$) a concentração sérica de triacilgliceróis, colesterol total, VLDL-colesterol e LDL-colesterol e aumentou ($p<0.05$) a concentração de HDL-colesterol em ratos diabéticos em comparação ao grupo DM. O grupo NAC-DM apresentou menor ($p<0.05$) índice aterogênico em relação ao grupo DM. A atividade da lactato desidrogenase no tecido cardíaco de ratos não demonstrou diferença estatística entre os grupos. No miocárdio de ratos diabéticos a atividade piruvato desidrogenase diminuiu ($p>0.05$), e o NAC melhorou ($p>0.05$) em DM-NAC, porém sem alcançar os valores obtidos em ratos normais (C e NAC). A administração de NAC foi capaz de melhorar ($p>0.05$) atividade de β -hidroxiacil-CoA desidrogenase e citrato sintase no tecido cardíaco dos ratos diabéticos (DM-NAC). A relação da atividade da lactato desidrogenase/citrato sintase foi menor ($p<0.05$) no grupo DM que em outros, os quais não diferiram significativamente. Não houve diferença significativa na relação β -hidroxiacil-CoA desidrogenase/citrato sintase. A atividade da superóxido dismutase no miocárdio reduziu no grupo DM, enquanto os grupos que receberam NAC (NAC e DM-NAC) demonstraram valores intermediários entre C e DM. O NAC aumentou ($p<0.05$) a atividade cardíaca da catalase em ratos diabéticos, atingindo valores próximos aos grupos C e NAC. A atividade da glutathione peroxidase no tecido cardíaco aumentou no grupo DM-NAC em relação a DM, mas não diferiu ($p>0.05$) quando comparada ao grupo C e NAC. A concentração cardíaca de glutathione total e GSH diminuiu ($p<0.05$) em DM quando comparada com outros grupos. O grupo DM mostrou maiores valores para hidróperóxido de lipídeo no miocárdio, enquanto a administração de NAC melhorou este valor ($p<0.05$). O tratamento com NAC normalizou ($p<0.05$) a relação do hidróperóxido de lipídeo com as enzimas antioxidantes em ratos diabéticos. Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que o DM1 promoveu alterações metabólicas em cardiomiócitos, favorecendo a oxidação de ácidos graxos em detrimento da oxidação de glicose com estresse oxidativo levando as disfunções cardíacas. A administração de NAC pode ser uma alternativa terapêutica, pois reverteu a desregulação do metabolismo energético induzido pelo

DM1 no músculo cardíaco através do seu efeito antiabetogênico, controlando a glicemia e consequentemente atenuou o estresse oxidativo. O NAC melhorou os parâmetros nutricionais e normalizou o perfil lipídico e o índice aterogênico.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a heterogeneous group of disturbances in energy metabolism and consequent oxidative stress, important factors for the development of diabetic complications such as cardiomyopathies. The use of antioxidants has contributed to improve hyperglycemia and also minimize diabetic complications. N-acetylcysteine has antioxidant and antihyperglycemic action, being able to contribute to the therapeutics of this pathology. This study aimed to evaluate the energetic metabolism and oxidative stress in the myocardium of rats with type 1 diabetes mellitus treated with N-acetylcysteine. 32 male wistar rats, with ± 250 g body weight, 60 days old were distributed in groups ($n=8$): C (normal, control); NAC (normal, treated with N-acetylcysteine); DM (diabetic, untreated); DM-NAC (diabetic, treated with N-acetylcysteine). The rats received water and a rodent chow *ad libitum*. Experimental type 1 diabetes mellitus was induced by streptozotocin (60mg Kg^{-1} body weight, single dose, i.p.). Animals of the group NAC and DM-NAC received N-acetylcysteine ($25\text{mg Kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$) by gavage for 37 days. During the experimental period (37 days), food and water intake were evaluated. After this period the animals, in a 12h fast, were anesthetized (xylasin and ketamin) and euthanized. Blood and cardiac tissue ($\pm 100\text{mg}$, left ventricle) were collected and stored in a freezer -80°C . Results were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey test for comparison of means. The results were considered significant when $p < 0.05$. Food and water intake were higher ($p < 0.05$) in the DM group, when compared to the other groups. While body weight decreased ($p < 0.05$) in diabetic animals related to C and NAC, which did not differ ($p > 0.05$) DM-NAC. NAC increased ($p < 0.05$) glycemia in diabetic rats, but presented higher glycemia than normal rats (C and NAC). Serum insulin in DM-NAC group was increased ($p < 0.05$) when compared to DM group rats. Energy intake and carbohydrate and protein consumption increased ($p < 0.05$) in untreated diabetic rats (DM) compared to the other groups, but without significant difference ($p > 0.05$) between C and NAC. Alimentary efficiency in DM was lower ($p < 0.05$) when compared to DM-NAC, normal rats (C and NAC) had higher values ($p < 0.05$) than diabetics. Cardiac concentration of total proteins and glycogen in diabetic animals (DM) were decreased ($p < 0.05$) to the other groups, and treatment with NAC improved ($p < 0.05$) these parameters. Phosphofructokinase activity in myocardium of diabetic rats was recovered ($p < 0.05$) by the administration of NAC reaching values of the groups C and NAC. There was no statistical difference in serum lactate

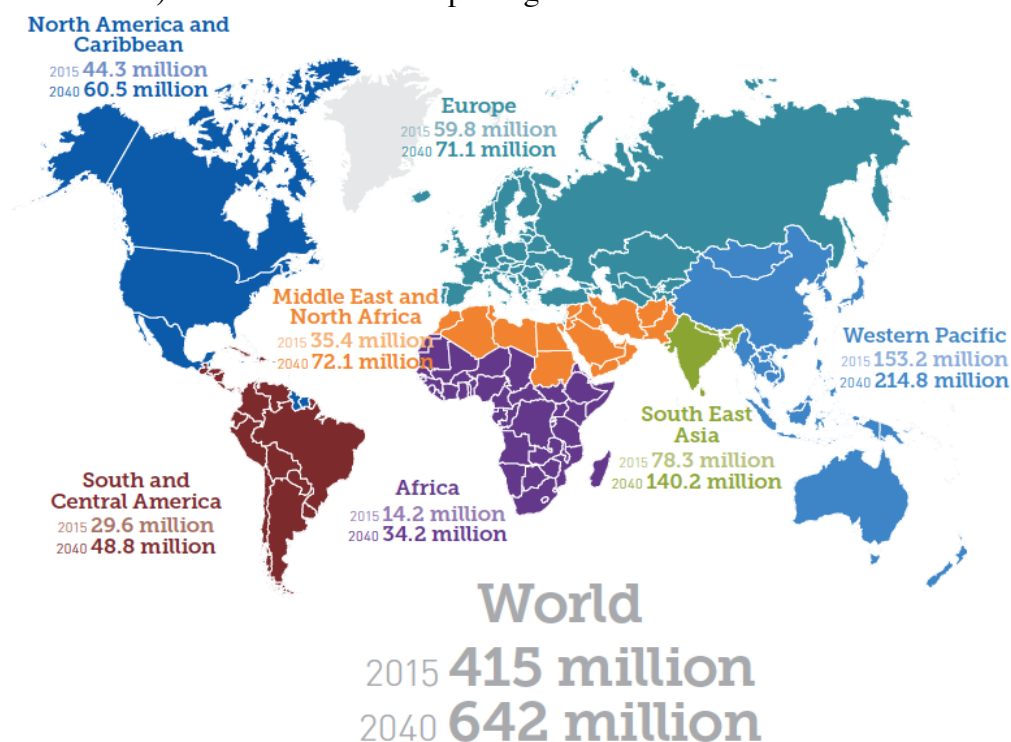
dehydrogenase activity between the groups ($p>0.05$). NAC decreased serum concentration of triacylglycerols, total cholesterol, VLDL-cholesterol and LDL-cholesterol ($p<0.05$) and increased HDL-cholesterol concentration in diabetic rats compared to the DM group ($p<0.05$). NAC-DM group had a lower ($p<0.05$) atherogenic index than the DM group. Lactate dehydrogenase activity in rat heart tissue did not show statistical difference ($p>0.05$) between the groups. In myocardium of diabetic rats pyruvate dehydrogenase activity decreased ($p<0.05$), and NAC improved ($p<0.05$) in DM-NAC, but did not reach values obtained in normal rats (C and NAC). NAC administration was able to improve ($p>0.05$) β -hydroxyl-CoA dehydrogenase activity and citrate synthase in cardiac tissue of diabetic rats (DM-NAC). The ratio Lactate dehydrogenase/citrate synthase was lower ($p<0.05$) in DM group than others, which did not differ significantly. There was no significant difference in ratio β -hydroxyl-CoA dehydrogenase/citrate synthase. Superoxide dismutase activity in myocardium was reduced ($p<0.05$) in DM, whereas groups receiving NAC (NAC and DM-NAC) demonstrated intermediate values between C and DM. NAC increased ($p<0.05$) cardiac catalase activity in diabetic rats, reaching values close to the C and NAC groups. Glutathione peroxidase activity in myocardium increased in DM-NAC group compared to DM, but did not differ ($p>0.05$) when compared to group C and NAC. The cardiac concentration of total glutathione and reduced glutathione activity decreased ($p<0.05$) in DM when compared to the other groups. DM group showed higher values for lipid hydroperoxide in myocardium, while the administration of NAC improved this value ($p<0.05$). NAC treatment normalized ($p<0.05$) the relationship between lipid hydroperoxide and activity antioxidants enzymes in diabetic rats. In view of the obtained results it can be concluded that type 1 diabetes mellitus promoted metabolic alterations in cardiomyocytes, favoring the oxidation of fatty acids in detriment of oxidation of glucose with oxidative stress leading to cardiac dysfunction. NAC administration may be a therapeutic alternative, since it reversed the deregulation of the energy metabolism induced by the DM1 in the cardiac muscle through its antidiabetogenic effect, controlling the glycemia and consequently attenuated the oxidative stress. NAC improved the nutritional parameters and normalized the lipid profile and the atherogenic index.

INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus é uma das doenças crônicas degenerativas que ocupa a quinta maior causa de morte em países desenvolvidos, ocasionando sério problema de saúde pública, sendo caracterizada uma das maiores emergências de saúde global do século (Bandeira *et al.*, 2013; International Diabetes Federation - IDF , 2015).

A Federação Internacional de Diabetes em 2015 estimou que a população diabética mundial era de 415 milhões de pessoas no mesmo ano da publicação, sendo que este valor alcançará 642 milhões em 2040. Enquanto Wild *et al.* (2004) estimaram 366 milhões de indivíduos acometidos pela doença e Rochette *et al.* (2014) 430 milhões em 2030 (Figura 1).

Figura 1. Número estimado de indivíduos com diabetes mellitus (20 a 79 anos de idade) ao redor do mundo e por região em 2015 e 2040.



Este infográfico apresenta o número de indivíduos diabéticos em 2015, e a estimativa de indivíduos que terão diabetes em 2040, dados expressos em milhões. Os dados são demonstrados no geral no mundo, cinza, e depois por diferentes regiões do mundo, como: América do sul e central, vermelho; América do norte e Caribe, azul marinho; Europa, turquesa; Oriente médio e Norte da África, laranja; África, roxo; Sudoeste asiático, verde; Oeste pacífico, azul (fonte IDF, 2015).

O número de pessoas falecidas pelas complicações diabéticas em 2013 foi de 5,1 milhões, números superiores quando comparados a outras patologias como a

síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e a tuberculose, com 1,5 milhões óbitos em cada patologia (Figura 2) (IDF 2013, IDF 2015).

Figura 2. Número de adultos que morreram com diabetes, SIDA e tuberculose no mundo em 2013.



Este infográfico apresenta os dados de adultos que morreram ao redor do mundo em 2013 devido a diabetes, síndrome da imunodeficiência adquirida e tuberculose, dados expressos em milhões (Adaptado: IDF, 2013; IDF 2015).

O Diabetes mellitus é uma doença caracterizada pela produção insuficiente de insulina e/ou a deficiência na ação insulínica, promovendo um grupo heterogêneo de distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, levando a hiperglicemia (American Diabetes Association, 2012; IDF, 2015; Tao, 2015).

Esta patologia pode ser classificada em: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 e diabetes gestacional. O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é resultado de uma resposta auto-imune, que promove a destruição de células β -pancreáticas levando a uma deficiência na produção de insulina, o qual é responsável por estimular a translocação dos transportadores de glicose para a superfície da membrana plasmática para internalizar glicose da corrente sanguínea. Este tipo acomete principalmente crianças e adolescentes, porém pode ocorrer na fase adulta em menor incidência (American Diabetes Association, 2012; Atkinson *et al.*, 2014)

O diabetes mellitus tipo 2 é desenvolvido devido a múltiplos fatores, como por exemplo a obesidade, a qual leva a resistência insulínica com isso prejuízo na internalização da glicose (American Diabetes Association, 2012; Marx, 2002). É frequentemente desenvolvida em indivíduos adultos, porém a incidência vem

aumentando em crianças e adolescentes, devido hábitos alimentares inadequados e ao sedentarismo (Marx, 2002; Winer & Sowers, 2004; Tao, 2015; IDF 2015). Porém indivíduos portadores do diabetes mellitus tipo 2 podem não mais produzirem insulina por perda de massa pancreática pela produção exacerbada de insulina e assim desenvolverem o DM1 (Sah, 2016).

A terceira classificação corresponde ao diabetes gestacional que ocorre quando os níveis glicêmicos se tornam elevados durante a gestação por volta de 24^a. semana e normaliza ao nascimento ou persisti por mais dois meses (American Diabetes Association, 2012; IDF, 2015).

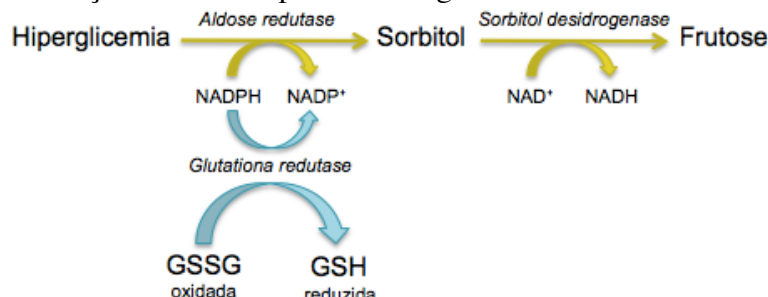
Entretanto o DM1 acomete cerca de 10% da população diabética (Gillespie, 2006; Tao, 2015) tendo incidência mundial de 3 a 5% ao ano, porém de 5 a 15% de adultos portadores de diabetes mellitus tipo 2 desenvolvem DM1 (Raskin & Mohan, 2010; Atkinson *et al.*, 2014).

No DM1 a hiperglicemia crônica e persistente que promovem sinais clássicos como: polidipsia, poliúria, polifágia, perda de peso e cetoacidose; além de ser a causa primária das complicações diabéticas, dentre elas: nefropatia, neuropatias, retinopatias e complicações cardiovasculares (American Diabetes Association, 2012; Raskin & Mohan, 2010; Atkinson *et al.*, 2014; Tao, 2015).

A recuperação da homeostase glicêmica pode ser obtida através da ativação de diferentes vias metabólicas tais como: via dos polióis – realizada com a finalidade de reduzir glicose a sorbitol, com diminuição dos níveis de NADPH, o qual é substrato para a glutathione redutase realizar a conversão de glutathione oxidada a glutathione reduzida (figura 3); glicação avançada – glicação de lipídeos e proteínas com consequente aumento de mediadores pró-inflamatórios; proteína quinase C – contribui com o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios e a via da hexosamina –

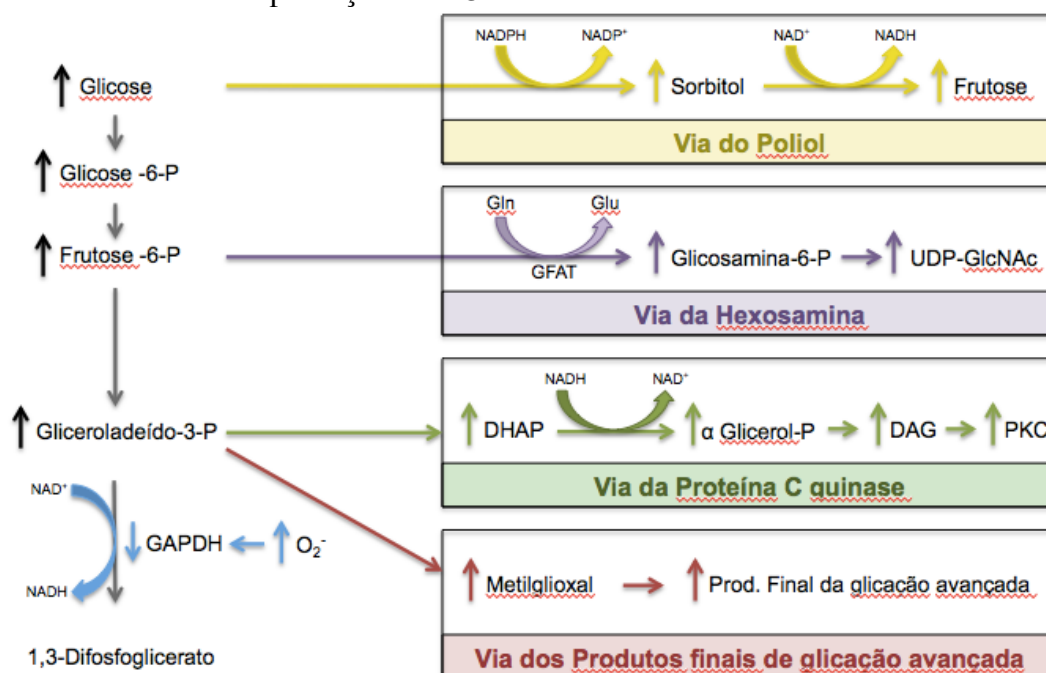
participa do aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Figura 4) (Brownlee, 2001; Maritim *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2010).

Figura 3. Inter-relação da via dos polióis com glutatona redutase



A glicose é reduzida a sorbitol pela aldose redutase utilizando como co-fator o NADPH. Baixas concentrações de NADPH impedem com que a glutaciona redutase reduza a glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH). O sorbitol é reduzido a frutose pela sorbitol desidrogenase usando como co-fator NAD+ (Adaptado: Reis *et al.*, 2008).

Figura 4. Vias metabólicas que auxiliam na redução de hiperglicemia e promovem o aumento na produção de EROs



As quatro vias que auxiliam na homeostase de glicose. O aumento de superóxido inibe parcialmente a via glicolítica por inibir a atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Assim o há um aumento da gliceraldeído 3-fosfato, que promove o aumento de metilglioxal principal precursor dos produtos finais de glicação avançada. O aumento de gliceraldeído-3-fosfato favorece no aumento de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e consequentemente de diacilglicerol (DAG), o qual ativa a proteína c quinase (PKC). Com a elevação da concentração de frutose-6-fosfato favorecendo a formação de UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) aumenta a modificação de proteínas. O aumento de fluxo da via dos polióis, consome NADPH o que impede de restaurar os níveis de glutatona reduzida. GFAT, Glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase; Gln, Glutamina; Glu, Glutamato; NAD⁺, Dinucleótido de nicotinamida; UDP, Uridina difosfato (Adaptado: Ceriello & Testa, 2009).

Embora sejam vias que tendem a diminuir a glicemia trazem prejuízos por aumentarem a produção de radicais livres derivados do oxigênio molecular, denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Bennett & Seefeldt, 2010).

Por outro lado, a deficiência de produção insulina promove diminuição na razão insulina:glucagon, o que torna possível o entendimento pelo qual o metabolismo em indivíduos diabéticos torna-se catabólico com características de desnutrição, desta forma a lipólise, degradação de proteínas gliconeogênese e glicogenólise estão acentuadas (Herbert & Nair, 2010; Rains & Jain, 2011).

Na lipólise ocorre a hidrólise dos triacilgliceróis no tecido adiposo em ácidos graxos livres para a corrente sanguínea, os quais são β -oxidados em moléculas de acetil-CoA que são oxidadas no ciclo do ácido cítrico com produção de equivalentes redutores FADH_2 e NADH , os quais serão re-oxidados na cadeia transportadora de elétrons com produção de energia. A elevação da concentração de equivalentes redutores aumenta o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, o que promove a hiperpolarização da membrana mitocondrial interna através durante a fosforilação oxidativa. Estes eventos favorecem a redução parcial do oxigênio molecular às principais formas de EROs, tais como, o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Rolo & Palmeira, 2006; Valko *et al.*, 2007; Sivitz & Yorek, 2010; Rains & Jain, 2011).

Os EROs também podem ser denominados radicais livres, moléculas ou fragmentos moleculares que possuem um ou mais elétrons desapareados em sua orbita molecular, com aumento no seu grau de reatividade (Valko *et al.*, 2007).

O ânion superóxido também pode ser produzido através de reações enzimáticas, pela via NADPH oxidase, xantina oxidase. As EROs também podem ser produzidas através de reações não enzimáticas pela reação do oxigênio com compostos orgânicos (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Estudos experimentais e clínicos revelaram que a hiperglicemia estabelecida no diabetes mellitus está associada à produção aumentada de EROs, caracterizando o

estado de estresse oxidativo (Johansen *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo é caracterizado por desequilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes, com favorecimento de espécies reativas (Sies, 1997), possivelmente devido a falha na defesa endógena antioxidante (Valko *et al.*, 2007).

Elevados níveis de radicais livres provocam danos aos componentes celulares como proteínas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos, resultando em disfunção e, eventualmente morte celular, devido ao desequilíbrio entre a produção e a neutralização das EROs, cenário denominado de estresse oxidativo (Gillespie, 2006; Small *et al.*, 2012; Rajendran *et al.*, 2014). Isto implica na etiologia de grande número de doenças crônicas degenerativas, incluindo aterosclerose, câncer, diabetes e envelhecimento (Bray, 2000), que apresentam as estruturas celulares danificadas (Pham-Huy *et al.*, 2008; Small *et al.*, 2012; Rajendran *et al.*, 2014).

Portanto as alterações metabólicas encontradas no estado diabético, provenientes da produção insuficiente de insulina e consequente hiperglicemia, estabelecem um quadro de estresse oxidativo que é um dos fatores desencadeantes das complicações diabéticas como cardiomiopatias, e em especial a aterosclerose (Asghar *et al.*, 2009; Kim, *et al.*, 2011).

O miocárdio é caracterizado por elevada capacidade oxidativa (Stanley & Sabbah, 2005) com grande quantidade de mitocôndrias e, possui elevada taxa de consumo de oxigênio, uma vez que utiliza os ácidos graxos como principal substrato para produção de energia (Lopaschuk *et al.*, 2002). E, portanto maior produção de equivalentes redutores (NADH e FADH₂), contribuindo para aumentar a fonte de EROs.

Além disso a oxidação completa de ácidos graxos seguido da fosforilação oxidativa no tecido cardíaco exige alto consumo de oxigênio para produção de ATP,

diminuindo a razão P:O (moléculas de ATP produzidas / Oxigênio consumido) (Lopaschuk *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2014). Desta forma, aumenta a possibilidade de geração de EROs neste tecido, uma vez que torna-se altamente oxigenado.

A dislipidemia, distúrbio que acomete cerca de 97% dos pacientes diabéticos (Dokken, 2008), é caracterizada por elevação no nível plasmático de triacilgliceróis e de colesterol total, promovendo aumento na concentração das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol) e a de baixa densidade (LDL-colesterol), e diminuição da concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) (Grundy, 1999; Kim, *et al.*, 2011).

A hiperglicemia observada no DM1 está intimamente relacionada com a dislipidemia o que leva ao aumento do risco de doenças isquêmicas cardiovasculares e cerebrovasculares. Por outro lado, a susceptibilidade da LDL a glicação e oxidação parece estar relacionada ao controle glicêmico inadequado e pela redução no sistema de defesa antioxidante, observada no DM1. Desta forma, o controle da glicemia é determinante como fator benéfico, pois diminui o estresse oxidativo e reduz a aterogênese diabética (Johansen *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram que o aumento de LDL-colesterol relaciona-se diretamente com o desenvolvimento da aterosclerose, através do processo inflamatório desencadeado pela oxidação das LDL-colesterol, as quais são fagocitadas por macrófagos na camada sub-endotelial, com diferenciação em células esponjosas que entram na constituição da placa de ateroma e consequentemente aterosclerose (Valko *et al.*, 2007; Dokken, 2008; Schwartz & Reaven, 2012; Schilling, 2015).

Diversos estudos têm demonstrado que a hiperglicemia crônica e persistente, e estresse oxidativo podem explicar os mecanismos de diversas complicações diabéticas (Niedowicz & Daleke, 2005; Bandeira *et al.*, 2013).

A neutralização das EROs e portanto o controle do estresse oxidativo é realizado por antioxidantes. Existem basicamente dois sistemas antioxidantes: enzimático e não-enzimático (Halliwell, 1996; Sies, 1997). O primeiro corresponde às enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Os agentes não-enzimáticos correspondem principalmente, a glutathione, vitaminas C e E (Kakkar *et al.*, 1995; Maritin, 2003).

O sistema antioxidante enzimático tem como a primeira linha de defesa a atividade da SOD, responsável pela dismutação do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto a CAT e a GSH-Px reduzem o H_2O_2 em água através de mecanismos distintos. A CAT é uma enzima NADPH-dependente, desta forma há necessidade de NADPH para que haja a reação de redução. Enquanto a GSH-Px necessita de glutathione reduzida (GSH) como substrato para converter o H_2O_2 em água com liberação de glutathione oxidada (GSSG), a qual requer a atividade da glutathione redutase (GR), na presença de NADPH, para retorna na forma reduzida (GSH) (Niedowicz & Daleke, 2005; Bennett & Seefeldt, 2010).

Um dos principais mecanismos que tentam explicar o estresse oxidativo está relacionado com a redução do conteúdo celular de GSH e/ou aumento da GSSG. Assim, pode-se atribuir ao estresse oxidativo a deficiência e/ou redução da concentração de GSH ou até mesmo a deficiência de seu precursor, o aminoácido cisteína (Atkuri *et al.*, 2007).

A utilização de substâncias naturais com propriedades tanto antioxidantes como hipoglicemiantes têm sido extensivamente estudadas. Estudos vêm

demonstrando que a suplementação de antioxidantes é capaz de atenuar as doenças crônico-degenerativas como diabetes mellitus, bem como as complicações a ela associada (Pham-Huy *et al.*, 2008; Sadi *et al.*, 2012; Sindhi *et al.*, 2013, Rajendran *et al.*, 2014).

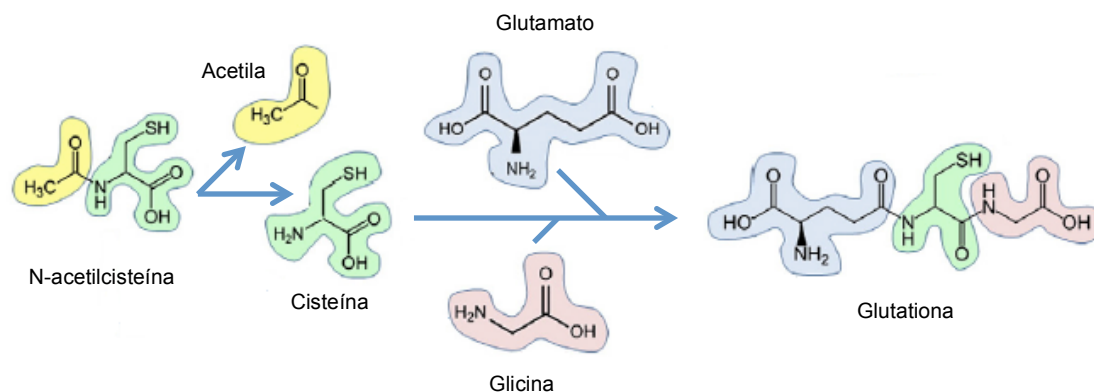
Deste modo, estudos com intervenção farmacológica baseada em compostos antioxidantes sobre as enfermidades crônicas-degenerativas como o diabetes mellitus são de grande interesse. Os antioxidantes são substâncias estáveis que atuam como agentes redutores, capazes de reduzir as substâncias oxidadas tornando-as estáveis, desta forma tendo a função de reparar a estrutura das macromoléculas celulares (Lobo *et al.*, 2010; Carochio & Ferreira, 2013).

Além disso, torna-se notório a atuação dos antioxidantes ao neutralizar as EROs, com o impedimento da propagação do estresse oxidativo (Ceriello & Testa, 2009) de tal forma, que poderiam prevenir e/ou retardar o desenvolvimento das complicações diabéticas (Ceriello & Motz, 2004). Desde que o sistema antioxidante torna-se ineficaz ao compensar à produção excessiva de EROs, favorecendo, portanto, o estresse oxidativo, a administração de antioxidantes pode ser efetiva no controle do diabetes mellitus. Estudos epidemiológicos estabeleceram que a ingestão de antioxidantes encontra-se relacionada inversamente com a ocorrência de doenças promovidas pelas EROs (Sadi *et al.*, 2012).

A N-Acetilcisteína (NAC, $C_5H_9NO_3S$) tem sido usada na prática clínica como agente mucolítico, devido a reduzir as pontes dissulfeto de proteínas presentes no muco. Também pode ser utilizado como antidoto para overdose de paracetamol, uma vez que o NAC é capaz de restaurar os níveis de glutathione (figura 5), o qual está depletado nesta condição. Atualmente, o NAC é utilizado extensivamente na prática clínica na prevenção da nefropatia, causada por contraste radioativo, toxicidade de

quimioterápicos, desordens psiquiátricas e cardiotoxicidade da doxorubicina (Giustarini *et al.*, 2012; Samuni *et al.*, 2013; Rushworth & Megson, 2014).

Figura 5. N-acetilcisteína como precursor de Cisteína na síntese de Glutathiona.



A N-acetilcisteína sofre hidrólise em acetila e o aminoácido cisteína, o qual é conjugado com glicina e glutamato respectivamente, para formação da glutathiona. (Adaptado: Rushworth & Megson, 2014).

O efeito antioxidante do NAC está bem estabelecido, ele exerce efeito antioxidante direto por sequestrar EROs através do radical sulfidril presente na sua estrutura química (Sivitz & Yorek, 2010). E exerce efeito antioxidante indireto que após sofrer hidrólise fornece o aminoácido cisteína, o qual é precursor da GSH (figura 4), que é substrato para a GSH-Px converter o peróxido de hidrogênio em água (Atkuri *et al.*, 2007; Seiva *et al.*, 2009; Sivitz & Yorek, 2010).

Sheela *et al.* (1995) administraram de N-acetilcisteína sulfóxido, isolado e purificado da cebola, em ratos com diabetes induzido por aloxana e observaram redução na concentração sérica de glicose, enquanto que a quantidade de glicogênio hepático aumentou consideravelmente em relação àqueles diabéticos não tratados com N-acetilcisteína sulfóxido. Outros estudos demonstraram que o NAC é capaz de reduzir os níveis glicêmicos, devido provavelmente à sua capacidade de provocar a produção e secreção de insulina (Fulghesu *et al.*, 2002; Rushworth & Megson, 2014).

A NAC reduziu tanto a glicemia como a concentração sérica e hepática de triacilgliceróis e de colesterol, ao diminuir a atividade das enzimas lipogênicas, tais

como, a ácido graxo sintase, HMG-CoA redutase, respectivamente (Hsu *et al.*, 2004). Além disso, há relatos do NAC atenuar a severidade da aterosclerose, ao estabilizar o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Samuni *et al.*, 2013). Outros autores como Diniz *et al.*, (2006); Novelli *et al.*, 2009 verificaram que administração de NAC diminuiu a concentração tanto de colesterol, e suas frações lipoproteicas, como de triacilgliceróis, enquanto o nível sérico de HDL-colesterol aumentou na presença de dieta hipercalórica.

CONCLUSÃO

A deficiente produção/ação da insulina no DM1 promove a hiperglicemia e alterações nos parâmetros nutricionais, e também causa alterações no metabolismo energético nas células cardíacas favorecendo a oxidação de ácidos graxos em detrimento a oxidação de glicose, aumentando o estresse oxidativo com disfunção cardíaca, além de provocar a dislipidemia e consequentemente o índice aterogênico. A administração do NAC é uma alternativa terapêutica que melhora a glicemia, parâmetros nutricionais e regula o metabolismo energético alterado pelo DM1 no tecido cardíaco através de seu efeito antidiabetogênico e antioxidante atenuando o estresse oxidativo, e portanto, reduz as complicações diabéticas tais como dislipidemia e aterosclerose por melhorar o índice aterogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bandeira SM, Fonseca LJS, Guedes GS, Rabelo LA, Goulart MOF, Vasconcelos SML. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14(2) : 3265-3284.
2. International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas*. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004; 27(5) : 1047-1053
4. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *BBA-Gen Subjects*. 2014; 1840(9) : 2709-2729.
5. International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas*. 6th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2013.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012; 35(Supp 1) : S64-S71.
7. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015; 73(1) : 181-185.
8. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet*. 2014; 383 : 69-82.
9. Marx, J. Unraveling the causes of diabetes. *Science*. 2002; 296(5568) : 686-689.
10. Winer N, Sowers JR. Epidemiology of diabetes. *Journal of clinical pharmacology*. 2004; 44(4) : 397-405.
11. Sah SP, Singh B, Choudhary S, Kumar A. Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacological Reports*. 2016; 68(6) : 1165-1177.
12. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ: Canadian Medical Association journal*. 2006; 175(2) : 165-170.
13. Raskin P, Mohan A. Emerging treatments for the prevention of type 1 diabetes. *Expert opinion on emerging drugs*. 2010; 15(2) : 225-236.
14. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865) : 813-820.

15. Maritin AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A Review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2003; 17(1) : 24-38.
16. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; 39(1) : 44-84.
17. Pan H, Zhang L, Guo M, Sui H, Li H, Wu W, Qu N, Liang M, Chang D. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta diabetologica*. 2010; 47(1) : 71-76.
18. Bennett LL, Seefeldt T. The role of antioxidants on oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Pharmacy Technology*. 2010; 26(5) : 293-299.
19. Herbert SL, Nair KS. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clinical Nutrition*. 2010; 29(1) : 13-17.
20. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 50(5) : 567-575.
21. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006; 212(2) : 167-178.
22. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*. 2010; 12(4) : 537-711.
23. Pham-Huy LA, He H, and Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2) : 89-96.
24. Sies H. *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*. Academic Press: San Diego, CA, 1997.
25. Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*. 2012; 17(4) : 311-321.
26. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*. 2014; 436 : 332-347.
27. Bray TM. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition*. 2000; 16(7) : 578-581.

28. Asghar O, Al-Sunni A, Khavandi K, Khavandi A, Withers, Greenstein A, Heagerty AM, Malik RA. Diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci*. 2009; 116(10) : 741-760.
29. Kim MS, Wang Y, and Rodrigues B (2011). Lipoprotein lipase mediated fatty acid delivery and its impact in diabetic cardiomyopathy. *BBA-Mol Cell Biol L*. 2011; 1821(5) : 800-808.
30. Stanley WC, Sabbah HN. Metabolic therapy for ischemic disease: The rationale for inhibition of fatty acid oxidation. *Heart Fail Rev*. 2005; 10(4) : 275-279.
31. Lopaschuk GD, Rebeyca IM, Allard MF. Metabolic modulation. A means to mend a broken heart. *Circulation*. 2002; 105 : 140-142.
32. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley, WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010; 90(1) : 207-258.
33. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(14) : 2577-2604.
34. Dokken BB. The pathophysiology of cardiovascular disease and diabetes: beyond blood pressure and lipids. *Diabetes Spectrum*. 2008; 21(3) : 160-165.
35. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith Jr SC, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999; 100(10) : 1134-1146.
36. Johansen JS, Harris AK, Rychly D, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabet*. 2005; 4(1) : 5.
37. Schwartz EA, Reaven PD. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis. *BBA-Mol Cell Biol L*. 2012; 1821(5) : 858-866.
38. Schilling JD. The mitochondria in diabetic heart failure: from pathogenesis to therapeutic promise. *Antioxid Redox Sign*. 2015; 22(17) : 1526-1537.
39. Niedowicz DM, Daleke DL. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys*. 2005; 43(2) : 289-330.
40. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr*. 1996; 16(1) : 33-50.

41. Kakkar R, Kaira J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetes rats. *Mol Cell Biochem.* 1995; 151(2) : 113-119.
42. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol.* 2007; 7(4) : 355-359.
43. Sadi G, Eryilmaz N, Tütüncüoğlu E, Cingir Ş, Güray, T. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012; 28(3) : 228-235.
44. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants – A review. *J Pharm Res.* 2013; 7(9) : 828-835.
45. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010; 4(8) : 118-126.
46. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013; 51 : 15-25.
47. Ceriello A, Testa R. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009; 32(suppl 2) : S232-236.
48. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease? The commom soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(5): 816-823.
49. Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. N-Acetylcysteine ethyl ester (NACET): A novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential. *Biochem Pharmacol.* 2012; 84(11) : 1522-1533.
50. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *BBA-Gen Subjects.* 2013; 1830(8) : 4117-4129.
51. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Therapeut.* 2014; 141(2) : 150-159.
52. Seiva FRF, Amauchi JF, Rocha KKR, Ebaid GX, Souza G, Fernandes AAH, Cataneo AC, Novelli ELB. Alcoholism and alcohol abstinence: N-acetylcysteine

- to improve energy expenditure, myocardial oxidative stress, and energy metabolism in alcoholic heart disease. *Alcohol*. 2009; 43(8) : 649-656.
53. Sheela CG, Kumud K, August KT. Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Med*. 1995; 61(4): 356-357.
 54. Fulghesu AM, Ciampelli M, Muzj G, Belosi C, Selvaggi L, Ayala GF, Lanzone A. N-Acetyl-cysteine treatment improves insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2002; 77(6) : 1128-1135.
 55. Hsu CC, Yen HF, Yin MC, Tsai CM, Hsieh CH. Five cysteine-containing compounds delay diabetic deterioration in Balb/cA mice. *J Nutr*. 2004; 134(12) : 3245-3249.
 56. Diniz YS, Rocha KKHR, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Novelli Filho JLVB, Cicogna AC, Novelli ELB. Effects of n-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dislipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 543(1) : 151-157.
 57. Novelli ELB, Santos P, Assalin H, Souza G, Rocha K, Ebaid G, Seiva FRF, Mani F, Fernandes AAH. N-acetylcysteine in high sucrose induced obesity: energy expenditure, metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacol Res*. 2009; 59(1) : 74-79.