



UFSM
Dissertação de Mestrado

**EFEITOS TÓXICOS DO ETANOL E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE
OXIDATIVO**

LUCINÉIA ALBANIO PIVETTA

PPGBTOX

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**EFEITOS TÓXICOS DO ETANOL E SUA RELAÇÃO COM O
ESTRESSE OXIDATIVO**

por

LUCINÉIA ALBANIO PIVETTA

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

PPGBTOX

Santa Maria, RS, Brasil

2005

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

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

**EFEITOS TÓXICOS DO ETANOL E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE
OXIDATIVO**

elaborada por

Lucinéia Albanio Pivetta

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Marcelo Farina
(Presidente-Orientador)

Dr. João Batista Teixeira da Rocha
(Co-orientador)

Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Santa Maria, 12 de Agosto de 2005

A Deus, Elvira Albanio
&
Jeferson Marques

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Marcelo Farina pela orientação no desenvolvimento desse trabalho, pelo exemplo de profissionalismo e em especial a sua atenção e dedicação, que contribuíram para a conclusão desta dissertação.

Ao Professor Dr. João Batista Teixeira da Rocha, pela possibilidade de conhecer a pesquisa ao ingressar no seu grupo de trabalhos, pelo exemplo de persistência e disposição frente às dificuldades enfrentadas pela pesquisa no país.

Aos colegas do laboratório do professores João, Cristina e Gilson que, com certeza, oportunizaram, de diversas formas, a conclusão desse trabalho. Àqueles colegas de aula que, através de conversas, possibilitaram o surgimento e aprimoramento de idéias.

Em especial, a duas pessoas que se tornaram essenciais colaboradores para a execução teórico-prática deste trabalho, a quem dedico meio sincero muito obrigado e minha amizade: Romaiana Picada Pereira e Marcelo Farinon.

À Universidade Federal de Santa Maria e a CAPES, pelo apoio financeiro. Ao Departamento de Química e aos funcionários, em especial, ao Rinaldo, por possibilitarem o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus familiares (avós e tios) pelo apoio, compreensão e exemplos de vida. Em especial aos meus irmãos Ricardo e Tiago e a minha grande amiga e mãe Elvira Albano pelos incansáveis conselhos e exemplo de dedicação e perseverança.

Aos meus sogros, Beloni e Carlos Marques pela compreensão, apoio e carinho. Às minhas cunhadas Jenifer e Joice Marques e meu cunhado Roger e Fabiano pela amizade e companheirismo.

Ao meu esposo, incentivador e eterno amor Jeferson Marques, o qual torna a caminhada da vida mais tranqüila e feliz.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	v
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
Capítulo 1- Introdução.....	1
1.1 Objetivo geral.....	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
Capítulo 2 - O consumo de etanol e seus efeitos no organismo.....	4
2.1 Ingestão de etanol: uma prática antiga.....	4
2.2 Metabolismo do etanol – aspectos gerais.....	5
2.3 Metabolismo do etanol – sistema hepático.....	6
2.3.1 Álcool desidrogenase (ALD).....	7
2.3.2 Aldeído desidrogenase (ALDH).....	7
2.3.3 Sistema Microsossomal de Oxidação do Etanol (SMOE).....	8
2.3.4 Catalase.....	8

2.4 Metabolismo do etanol – desequilíbrio celular.....	10
2.4.1 Doenças hepáticas provocadas pelo consumo excessivo do etanol.....	11
2.4.2 Acetaldeído.....	13
2.4.3 Estresse Oxidativo.....	14
Capítulo 3 - Interação entre etanol e compostos sulfidrílicos.....	16
3.1 Etanol, glutathiona e δ -ALA-D.....	16
3.1.2 Glutathiona (GSH).....	16
3.1.3 δ -Aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D).....	18
Capítulo 4. Compostos antioxidantes: ebselen e NAC.....	20
4.1 Introdução.....	20
4.1.2 N-Acetilcistéina (NAC).....	20
4.1.3 Ebselen (2-fenil-1,2-benzoselenazol-3(2H)-ona).....	21
Capítulo 5- Materiais e Métodos.....	23
5.1 Reagentes químicos.....	23
5.1.1 Trabalho <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	23
5.2 Modelo experimental.....	25
5.2.1 Estudo <i>in vivo</i>	25
5.2.2 Animais.....	25
5.2.3 Tratamento.....	25
5.3 Preparação Tecidual.....	27

5.4 Determinações enzimáticas.....	27
5.4.1 Estudo da atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase.....	27
5.4.2 Estudo da atividade da enzima GSH-Px.....	27
5.5 Verificação dos níveis de tióis não protéicos.....	28
5.6 Determinação protéica.....	28
5.7 Estudo <i>in vitro</i>	28
5.7.1 Animais.....	28
5.7.2 Preparação Tecidual.....	28
5.7.3 Determinação da atividade das enzimas GSH-r e GSH-Px....	29
5.7.4 Determinação da atividade tiol-peroxidase do ebselen.....	29
5.7.5 Estudos de espectroscopia.....	30
5.7.6 Determinação de grupamentos sulfidrílicos.....	30
5.7.7 Determinação protéica.....	30
5.8 Análise estatística.....	30
Capítulo 6- Resultados obtidos.....	31
6.1 Estudo <i>in vivo</i>	31
6.2. Estudo <i>in vitro</i>	35
Capítulo 7- Discussão.....	45
Capítuo 8- Conclusões.....	52
Referências bibliográficas.....	55

Anexos.....77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Grupo dos camundongos tratados com etanol 3 g/kg; 11 mL/kg.....	26
TABELA 2: Grupo dos camundongos controle (glicose); 11mL/kg.....	26
TABELA 3: Efeito <i>in vitro</i> do acetaldeído nas atividades das enzimas hepáticas glutathione redutase (GSH-R) e glutathione peroxidase (GSH-Px) de camundongo e na atividade tiol- peroxidase do ebselen.....	37
TABELA 4: Efeitos <i>in vitro</i> do acetaldeído sob a oxidação da glutathione na presença da glutathione-S-transferase (GST).....	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Metabolismo do etanol.....	9
FIGURA 2: Mecanismo pelo qual o consumo excessivo de etanol pode levar aos danos no fígado.....	12
FIGURA 3: Rota de óxido-redução, relação entre glutathiona reduzida e glutathiona oxidada.....	17
FIGURA 4: Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos.....	19
FIGURA 5: Estrutura molecular da N-acetilcisteína.....	21
FIGURA 6: Estrutura molecular do ebselen.....	22
FIGURA 7: Efeito da administração de N-acetilcisteína (NAC) e/ou ebselen nos níveis hepáticos de tióis não-protéicos (SHNP) dos camundongos controle e expostos ao etanol.....	32
FIGURA 8: Efeito da administração de N-acetilcisteína (NAC) e/ou do ebselen sobre a atividade da enzima δ -ALA-D hepática dos camundongos controle e expostos ao etanol.....	33
FIGURA 9: Efeito da administração de N-acetilcisteína (NAC) e/ou do ebselen sobre a atividade da enzima GSH-Px hepática dos camundongos controle e dos camundongos expostos ao etanol.....	34
FIGURA 10: Espectro de absorção do ebselen e os produtos da sua interação com glutathiona e/ou acetaldeído.....	38
FIGURA 11: Espectro de absorção do ebselen e os produtos da sua interação com glutathiona e/ou acetaldeído.....	39

FIGURA 12: Efeito <i>in vitro</i> do acetaldeído sob a oxidação da glutationa.....	40
FIGURA 13: Efeito <i>in vitro</i> do acetaldeído sob a oxidação do ditioeritritol (DTE).....	41
FIGURA 14: Efeito <i>in vitro</i> do acetaldeído na oxidação grupamentos sulfidrílicos totais de fígado de camundongo.....	42
FIGURA 15: Efeito <i>in vitro</i> do acetaldeído na oxidação grupamentos sulfidrílicos não protéicos de fígado de camundongo.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

δ -ALA-D: δ -aminolevulinato desidratase

a.C.: antes de Cristo

ADH: álcool desidrogenase

ALDH: aldeído desidrogenase

ATP: adenosina-5'trifosfato

CYP 450IIE1: citocromo P450IIE1

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTE: ditioeritritol

DTNB: ácido ditio-bis-nitrobenzóico

FAS: Síndrome Alcoólica Fetal

GSH: glutathiona reduzida

GSH-Px: glutathiona peroxidase

GSH-R: glutathiona redutase

GSSG: glutathiona oxidada

GST: glutathiona-S-transferase

NAC: N-acetilcisteína

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma oxidada

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma oxidada

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma reduzida

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma reduzida

RNA: ácido ribonucléico

SMOE: sistema microssomal de oxidação do etanol

SHNP: conteúdo de tióis (SH) não-protéicos

SNC: sistema nervoso central

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Artigo 1 - “Ethanol inhibits δ -aminolevulinate dehydratase and glutathione peroxidase activities in mice liver: protective effects of ebselen and N-acetylcysteine”78

ANEXO 2: Artigo 2 - “Absence of direct inhibitory effects of acetaldehyde on liver glutathione peroxidase and reductase activities.....99

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica
Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS TÓXICOS DO ETANOL E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

Autora: Lucinéia Albanio Pivetta

Orientador: Marcelo Farina

Co-orientador: João Batista Teixeira da Rocha

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 12 de agosto de 2005.

O etanol é uma das substâncias mais consumidas entre as diferentes sociedades. Torna-se, assim, alvo de numerosos estudos que buscam o aprimoramento dos conhecimentos acerca de sua toxicidade. Esse estudo foi realizado com a finalidade de se compreender melhor a relação existente entre o etanol com o dano oxidativo direta ou indiretamente a ele associado. Levando em conta o fato de que esses danos estão geralmente ligados à depleção de compostos sulfidrílicos, dois compostos antioxidantes, a N-acetilcisteína e o ebselen, foram testados, sozinhos ou em combinação, frente aos efeitos da ingestão crônica de etanol sobre o estado tiólico celular. As atividades das enzimas glutaciona

peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase foram investigadas no fígado de camundongos. Camundongos machos da espécie *Swiss albino* receberam, durante 30 dias, uma única administração diária de etanol (3 g/kg) por gavagem, o que levou a uma significativa diminuição na concentração de tióis não protéicos no fígado. Injeções intraperitoneais diárias com N-acetilcisteína (300 mg/kg) ou ebselen (5 mg/kg) foram capazes de restabelecer estes níveis aos do grupo controle. Entretanto, a combinação dos dois compostos não demonstrou efeito protetor aditivo neste parâmetro analisado. Este fenômeno se repetiu nas atividades das enzimas glutathione peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase, as quais tiveram suas atividades diminuídas pela exposição ao etanol e restabelecidas pelo tratamento individual com as drogas. Os compostos sulfidrílicos de fonte não protéica apresentaram uma correlação significativa com a atividade das enzimas glutathione peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase. Estes resultados demonstraram que a N-acetilcisteína e o ebselen, sozinhos, são capazes de restabelecer os danos provocados pelo consumo de etanol em enzimas cuja função catalítica depende da integridade de seus grupamentos tiol (δ -ALA-D) ou selenol (GSH-Px). Os efeitos *in vitro* de concentrações crescentes de acetaldeído sobre as atividades das enzimas glutathione peroxidase e glutathione redutase de fígado de camundongos, estado tiólico celular, atividade tiol peroxidase do ebselen e a interação entre ebselen e glutathione foram avaliados para a melhor compreensão da relação entre o acetaldeído e os grupamentos nucleofílicos de biomoléculas. As atividades das enzimas glutathione peroxidase e glutathione redutase hepáticas não foram modificadas pela incubação com acetaldeído, assim como a atividade tiol peroxidase do ebselen. O estado tiólico total apresentou uma diminuição significativa frente à incubação com 300 μ M de acetaldeído, fato que se repetiu nos níveis de compostos tíolicos não protéicos nas concentrações de 100 e 300 μ M de acetaldeído. Tendo em vista que o acetaldeído, nestas mesmas condições, não oxidou a glutathione e o ditioeritritol na ausência de sobrenadante hepático, estes resultados indicam que a oxidação de glutathione hepática causada pelo acetaldeído depende, ao menos em parte, do seu metabolismo por constituintes do fígado.

ABSTRACT

Mastership Dissertation

Program of Post-Graduation in Biological Sciences - Toxicological
Biochemistry

Universidade Federal de Santa Maria

THE TOXIC EFFECTS OF ETHANOL AND THEIR RELATIONSHIPS WITH THE OXIDATIVE STRESS

Author: Lucinéia Albanio Pivetta

Adviser: Marcelo Farina

Co-adviser: João Batista Teixeira da Rocha

Local and Date: Santa Maria, August, 12 2005.

Ethanol is one of the most ingested substances among the different societies. So, it becomes target of several studies that intent to elucidate its mechanisms of toxicity. This study was aimed to better understand the link between ethanol and oxidative stress. Taking into account that thiol depletion is observed in ethanol injuries, two antioxidant compounds, N-acetylcysteine and ebselen, were tested, alone or simultaneously, against the effects of the chronic ethanol consumption on the cellular sulfhydryl status. The activities of glutathione peroxidase and δ -aminolevulinatase were evaluated in mice liver. Male *Swiss albino* mice received, during 30 days, a single administration of ethanol (3 g/kg) by gavage. This treatment caused a significant reduction in the levels of

liver nonprotein thiols (NPSH). Daily intraperitoneal injections of either N-acetylcysteine (300 mg/kg) or ebselen (5 mg/kg) were able to blunt NPSH to the control levels. However, the simultaneous administration of N-acetylcysteine and ebselen did not show additive protective effect in this parameter. This phenomenon was also observed for the activities of liver glutathione peroxidase and δ -aminolevulinate dehydratase. Their activities were inhibited by ethanol and blunted by the individual treatment with N-acetylcysteine or ebselen. Liver NPSH were positively correlated with glutathione peroxidase and δ -aminolevulinate dehydratase activities. These results demonstrated that either N-acetylcysteine or ebselen, alone, are able to restore the harmful effects of ethanol consumption on enzymes whose catalytic activities depend on their thiol (δ -ALA-D) and selenol (GSH-Px) groups. The *in vitro* effects of crescent concentrations of acetaldehyde in the activities of mice liver glutathione peroxidase and glutathione reductase, cellular sulfhydryl status, thiol peroxidase activity of ebselen and the interaction between ebselen and glutathione were evaluated to better comprehend the relationship between acetaldehyde and the nucleophilic groups of biomolecules. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in mice liver supernatants were not changed after pre-incubation with acetaldehyde. Acetaldehyde, up to 300 μ M, did not affect the thiol-peroxidase activity of ebselen. Total sulfhydryl status was significantly reduced after the incubation with acetaldehyde (300 μ M) and this phenomenon was also observed for NPSH at acetaldehyde concentrations of 100 and 300 μ M. Taking into account that acetaldehyde, under these same above-mentioned conditions, did not oxidize glutathione and dithioerythritol in the absence of hepatic supernatant, these results indicate that the acetaldehyde-dependent oxidation of glutathione seems to depend, at least in part, on liver constituents.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Dados do Ministério da Saúde revelam que o Brasil gasta, anualmente, milhões de reais com o tratamento de doenças decorrentes da ingestão abusiva de etanol (Ministério da Saúde, 2003). Acrescentado a este fato, está a associação entre o excesso de etanol ingerido e a criminalidade, os acidentes de trânsito, o abuso de outras drogas lícitas e ilícitas, a Síndrome Alcoólica Fetal, as porfírias e vários outros problemas sociais que conduzem a reflexão dos critérios utilizados acerca do consumo dessa substância (Minayo & Deslandes, 1998; Bau, 2002; Lopes & Sichieri, 2002). Deste modo, torna-se extremamente importante a realização de pesquisas com o intuito de esclarecer e compreender melhor o alcoolismo e, ao mesmo tempo, tentar encontrar novas drogas que revertam o quadro de danos ocasionados pelo etanol.

A associação entre o alcoolismo humano e diversas lesões hepáticas obtém reconhecimento desde a metade do século XIX (Koch et al., 2004). Entretanto, o mecanismo preciso e os fatores responsáveis para o dano no fígado ainda não são totalmente compreendidos. Assim, várias hipóteses têm sido propostas, entre elas, estão as predisposições genéticas (Bosron et al., 1993; Li et al., 2001), as mudanças metabólicas (Song et al., 1996; Lieber, 2000), a hepatotoxicidade direta do álcool ou seus metabólicos, as alterações imunológicas (Limuro et al., 1997; Jarvelainen et al., 2000) e a má-nutrição (Lieber, 2000). Recentemente, o papel nocivo dos radicais livres e espécies oxidantes em humanos e doenças experimentais tornou-se área de interesse de intensiva pesquisa.

O acetaldeído, produto principal do metabolismo do etanol, é uma molécula extremamente tóxica e reativa (Sorell et al., 1987). Apresenta a capacidade de reagir com proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, formando alguns aductos já identificados em pacientes alcoólatras e tem sido apontado por participar de forma ativa nos danos oxidativos decorrentes do abuso de etanol (Fraenkel-Konrad J. and Singer, G., 1988; Niemelä, 1999; Lin et al., 1990). Alguns estudos demonstram a interferência do etanol com os grupamentos tiólicos da glutathione, entretanto, a participação do acetaldeído nestes eventos, ainda não está bem definida (Vina et al., 1980; Lauterberg et al., 1984; Speisky et al., 1985).

1.1 Objetivo geral

Considerando as informações acima citadas, este trabalho objetivou, através da realização de um modelo crônico de intoxicação com etanol em camundongos, investigar seu efeito no estado tiólico hepático e nas atividades das enzimas hepáticas GSH-Px e δ -ALA-D. Simultaneamente, foram testadas duas drogas antioxidantes, a NAC (precursora de glutathione) e o ebselen (mimético da GSH-Px), para verificar-se uma possível atenuação dos efeitos pró-oxidativos induzidos pelo etanol. Além disso, com o objetivo de compreender melhor o mecanismo de interação entre o acetaldeído e as enzimas participantes do metabolismo da GSH, GSH-Px e GSH-R, realizou-se um estudo *in vitro*.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade da enzima GSH-Px hepática em camundongos cronicamente expostos ao etanol, juntamente com os possíveis efeitos protetores da administração intraperitoneal de NAC e/ou ebselen;
- Avaliar a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase hepática em camundongos cronicamente expostos ao etanol, juntamente com os possíveis efeitos protetores da administração de NAC e/ou ebselen;

- Avaliar o conteúdo de tióis não-protéicos hepáticos em camundongos cronicamente expostos ao etanol, juntamente com os possíveis efeitos protetores da administração de NAC e/ou ebselen;

- Avaliar, sob condições *in vitro*, os efeitos diretos de concentrações crescentes de acetaldeído (30, 100 e 300 μM) sobre as atividades das enzimas GSH-Px e GSH-R e no estado sulfidrílico (total e tióis não-protéicos) em sobrenadantes hepáticos de camundongos.

- Avaliar, sob condições *in vitro*, os efeitos diretos do acetaldeído sobre a atividade tiol-peroxidase do ebselen, bem como sobre a interação entre ebselen e glutathiona;

Capítulo 2

O CONSUMO DE ETANOL E SEUS EFEITOS NO ORGANISMO

Neste capítulo, serão abordados alguns tópicos extremamente relevantes para a compreensão do alcoolismo como uma doença, bem como um breve histórico acerca do consumo de bebidas alcoólicas pela humanidade.

2.1. Ingestão de Etanol: uma prática antiga

O consumo de bebidas alcoólicas é um fato que acompanha a história da humanidade (Silva, 2001). Registros arqueológicos revelam que os primeiros indícios sobre o consumo de etanol pelo ser humano datam de aproximadamente 6.000 a.C. A noção de etanol como uma substância divina, por exemplo, pode ser encontrada em inúmeros exemplos na mitologia. Além disso, os exércitos mediterrânicos, desde a antiguidade, também possuíam o hábito de ingerir bebidas alcoólicas (Carneiro, 2003).

Inicialmente, as bebidas possuíam um conteúdo alcoólico relativamente baixo por dependerem exclusivamente do processo de fermentação. Com o advento do processo de destilação, introduzido na Europa pelos árabes na Idade Média, surgiram novos tipos de bebidas alcoólicas (Silva, 2001; Carneiro, 2003). Nesta época, este tipo de bebida passou a ser considerado um raro e precioso remédio. A sensibilização econômica e social acerca do etanol teve seu impulso com o sistema colonial, a começar na ilha Madeira e, posteriormente, na América, com a introdução da cana-de-açúcar fornecendo uma matéria prima ideal para um novo produto: a aguardente de cana (Cascudo, 1986).

A partir da Revolução Industrial, registrou-se um grande aumento na oferta deste tipo de bebida, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando um aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema devido ao uso excessivo de etanol (Roth, J.L., 2005).

Até o final da década de cinqüenta, acreditava-se que as doenças provenientes do consumo excessivo de etanol estavam associadas exclusivamente à má-nutrição e nem se cogitava o fato de o etanol apresentar efeitos tóxicos *per se* (Lieber, 1993). Di Luzio (1963) e Lieber e Davidson (1962) foram os pesquisadores pioneiros ao postularem que o etanol afeta o equilíbrio antioxidante das células hepáticas. A partir da década de sessenta, foi dado início a pesquisas cujo objetivo era a amplificação de conhecimentos acerca dos efeitos do etanol no organismo (Koch et al., 2004).

2.2 Metabolismo do etanol – aspectos gerais

Após a ingestão de etanol, sua absorção ocorre principalmente no intestino delgado, por difusão passiva (Wilkinson et al., 1977; Holford, 1987) e, em menores quantidades, no estômago e no cólon. A eliminação do etanol ocorre através da urina (0.3%), pulmões (0.7%) e suor (0.1%) (Holford, 1987).

Para estimar-se com maior precisão a concentração de etanol que chega ao sangue¹, alguns fatores relevantes devem ser considerados. Entre eles estão a quantidade e o teor alcoólico de uma bebida consumida em um determinado tempo, a massa corporal do indivíduo, o polimorfismo genético² e a quantidade de alimento presente no estômago (Ramchandani et al., 2001; Norberg et al., 2003).

A distribuição do etanol ocorre de forma razoavelmente uniforme por todos os tecidos do organismo, afetando grande parte das funções vitais

¹ A quantidade de etanol que chega ao sangue é cuidadosamente analisada por uma área específica denominada Farmacocinética.

² Ocorre devido às diferenças étnicas e intra-individuais.

devido às suas características hidrofílicas e lipofílicas e também por ser uma molécula relativamente pequena do ponto de vista molecular (Lieber, 1992). Essa substância não se liga às proteínas plasmáticas, sendo que a passagem do etanol através das barreiras hematoencefálica e placentária ocorre facilmente (Gilman et al., 1996). Ambos os fatores ocasionam sérias complicações para a saúde. Entretanto, é interessante observar que o alto consumo de bebidas alcoólicas durante a gravidez causa vários efeitos nocivos sobre o feto, sendo que as conseqüências podem ser observadas em crianças portadoras da Síndrome Alcoólica Fetal (FAS), onde, nos casos mais graves, pode ocorrer morte (Famy et al., 1998; Kelly et al., 2000).

2.3 Metabolismo do etanol – sistema hepático

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

No metabolismo hepático do etanol, atuam duas rotas enzimáticas acessórias e uma principal que são encontradas em diferentes compartimentos celulares. A rota principal para a biotransformação do etanol no fígado ocorre através da atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), encontrada no citoplasma das células hepáticas, a qual produz o acetaldeído, posteriormente transformado até acetato, pela ação da enzima ALDH. As outras duas rotas são compostas pelo sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS - composto pelo CYP450IIE1, NADPH-citocromo-c-redutase e fosfolipídios), encontrado no retículo endoplasmático, e pela ação da catalase, localizada nos peroxissomos. O produto final dessas três rotas (ADH, MEOS e catalase) é o acetaldeído (Arteel et al., 2003).

2.3.1 Álcool Desidrogenase (ADH)

Existem múltiplas formas da ADH humana, as quais são moléculas diméricas contendo zinco³ em sua estrutura. Até o momento, sete genes e subunidades de ADH foram identificados (Edenberg, 1997; Edenberg e Bosron, 2000). Estes genes são agrupados dentro de cinco classes baseadas na seqüência dos aminoácidos, nas propriedades catalíticas e no tipo de tecido em que estão expressas (Duester et al., 1999). Essa última característica está intimamente ligada ao efeito do etanol em células e tecidos específicos, pois a ADH se expressa também no estômago, intestino, musculatura esquelética e tecido cerebral.

A ADH oxida alguns álcoois fisiológicos com alta eficiência catalítica como, por exemplo, o retinol, o ácido graxo ω -hidróxido, os hidróxidos de esteróides e os derivados hidróxidos do metabolismo da dopamina e epinefrina (Boleda et al., 1993).

A expressão da ADH em regiões diferentes no cérebro e, conseqüentemente, a formação de acetaldeído demonstram efeitos adversos deste metabólito como, por exemplo, os efeitos estimulante, hipnótico e sedativo (Hunt et al., 1996; Zimatkin et al., 1998).

2.3.2 Aldeído desidrogenase (ALDH)

Existem múltiplas formas moleculares da enzima aldeído desidrogenase no fígado humano. No entanto, somente duas classes de isoenzimas, ALDH1 e ALDH2, participam da oxidação do acetaldeído.

A enzima ALDH1 é encontrada no citoplasma e está ubiquamente distribuída nos tecidos inclusive no cerebral. A enzima ALDH2 situa-se na mitocôndria e está amplamente presente no fígado e estômago. Variações genéticas em relação a esta enzima indicam sensibilidades diferentes aos efeitos nocivos do etanol em etnias (Ramachadani et al., 2001).

³ A enzima álcool desidrogenase é classificada como uma metaloenzima por necessitar deste elemento para o seu funcionamento.

2.3.3 Sistema Microssomal de Oxidação do Etanol (SMOE)

Este sistema apresentou-se como um dos mais significativos contribuintes para a compreensão dos efeitos do etanol devido ao fato de apresentar muitas propriedades em comum com outros microssomas⁴ que metabolizam drogas no nosso organismo. Entre essas propriedades, inclui-se a utilização do citocromo P-450IIE1, NADPH e oxigênio (Lieber e Decarli, 1970).

Após o consumo crônico de etanol, há um aumento na atividade do sistema microssomal que metaboliza, além do etanol, numerosos agentes hepatotóxicos, tais como radicais livres⁵ (Shaw, 1989) e pró-carcinógenos (nitrosaminas, cloreto de vinil, aflatoxinas, hidrocarbonetos policíclicos e hidrazinas), contribuindo para o desenvolvimento de processos carcinogênicos (Pöschl & Seitz, 2004).

O etanol pode induzir o aumento dos constituintes do SMOE e, conseqüentemente, aumentar o metabolismo de outras drogas que também sofrem a ação desse sistema (tolerância cruzada), além de também ocasionar adaptações no sistema nervoso central. Isto explica o porquê de etilistas necessitarem de doses maiores de certas drogas (antibióticos, anticoagulantes...) quando comparados aos abstêmios para que os efeitos farmacológicos sejam evidenciados (Greghi e Greghi, 2000).

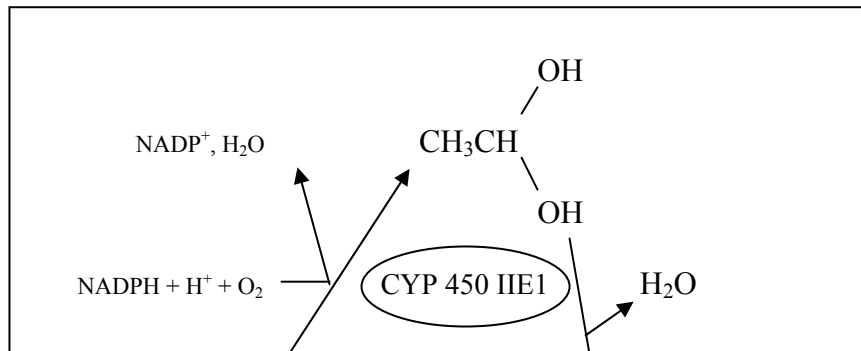
2.3.4 Catalase

A contribuição da enzima catalase na oxidação do etanol no hepatócito, em situações fisiológicas, não é tão expressiva, mas pode ser aumentada quando quantidades significativas de peróxido de hidrogênio tornam-se disponíveis (Sies, 1997), embora a geração de acetaldeído no SNC pareça ser devido a sua ação (Hunt, 1996; Sanchis-Segura et al., 1999). Uma visão geral do metabolismo do etanol esta representada na Figura 1.

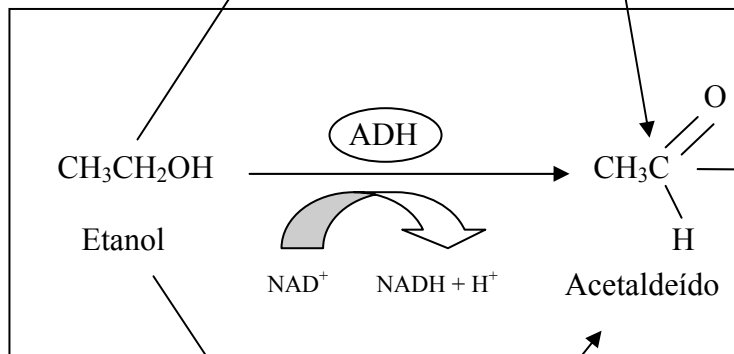
⁴ Microssomas são pequenas vesículas formadas após rompimento do retículo endoplasmático.

⁵ Radicais livres são átomos, íons ou moléculas que possuem um elétron não pareado em sua órbita externa.

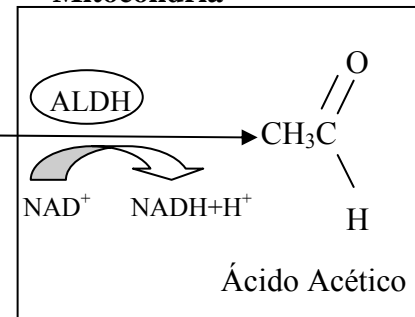
Microsomas



Citosol



Mitocôndria



Peroxisomas

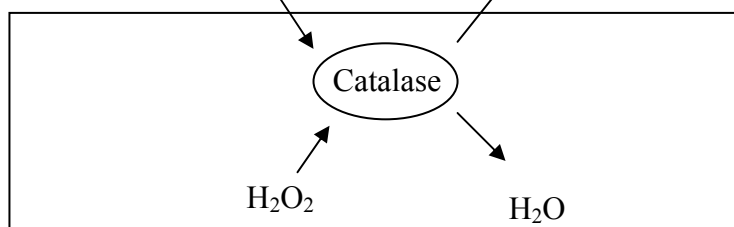


FIGURA 1: Metabolismo do etanol demonstrando a participação do CYP 450IIE1 nos microsomas hepáticos, a ação da ADH (álcool desidrogenase) citoplasmática e da catalase nos peroxissomas. Todas as reações formam o acetaldeído que será oxidado na mitocôndria pela ALDH (aldeído desidrogenase). Adaptado de Bermond II & Tose, 2000.

2.4 Metabolismo do etanol – desequilíbrio celular

A oxidação do etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase e do CYP 450IIE1 é dependente de dois cofatores⁶ o NAD^+ e o NADP^+ , respectivamente. Esta dependência acaba gerando um excesso de equivalentes reduzidos no citoplasma das células (Albano et al., 1988; Dupont et al., 1988), deste modo, ocorre um desequilíbrio no potencial redox⁷, gerando várias alterações metabólicas como, por exemplo:

(i) a concentração de lactato eleva-se em relação à concentração de piruvato, originando assim um quadro de hipoglicemia, que podem evoluir para acidose láctica e reduzir a capacidade do rim em excretar ácido úrico;

(ii) parte dos equivalentes reduzidos pode passar para a mitocôndria através de processos como o ciclo do alfa-glicerofosfato, ciclo do ácido málico e do ciclo de alongamento dos ácidos graxos;

(iii) há acúmulo de triglicerídeos no fígado e diminuição do consumo de ácidos graxos (Galli et al., 1999), devido à preferência do hepatócito pelo álcool, reduzindo assim a atividade do ciclo do ácido cítrico e aumentando o depósito hepático de gordura, originando a esteatose que representa a primeira fase de lesão hepática alcoólica (Bertelli & Conci, 1997).

2.4.1 Doenças hepáticas provocadas pelo consumo excessivo de etanol

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de doenças hepáticas ocasionadas pelo excesso de ingestão de bebidas alcoólicas. O tempo de consumo e o teor alcoólico da bebida são dados relevantes a se considerar para o

⁶ Cofatores enzimáticos são substâncias como, por exemplo, vitaminas e minerais que fazem parte do sítio ativo de enzimas e entram em contato com o substrato, sendo essenciais para um bom desempenho catalítico.

⁷ Potencial redox é o potencial de oxidação-redução produzido pela transferência de elétrons entre vários átomos e moléculas na água.

diagnóstico. Provavelmente o etanol atue como um “potencial de hepatotoxinas” no desenvolvimento de doenças hepáticas devido à coexistência de fatores externos (Arteel et al., 2003). Entre estes está o sexo⁸ (Becker et al., 1996), o polimorfismo de enzimas que metabolizam o etanol, fatores imunológicos, exposição a outras substâncias/drogas, infecções hepáticas virais, deficiência nutricional e obesidade.

Existem três categorias principais de danos hepáticos ocorridos devido à alta ingestão do etanol. Estes são agrupados por progressão dos efeitos severos decorrentes do excesso de bebida alcoólica ingerida.

(i) Fígado gorduroso ou Esteatose Hepática: caracteriza-se pelo acúmulo de gordura macrovesicular no citoplasma do hepatócito. Pode ocorrer após um único excesso de ingestão de bebida alcoólica ou após o consumo crônico. Geralmente não é detectado por ser assintomático. Este quadro é reversível podendo não acarretar em danos mais sérios. O fígado trabalha normalmente (Bouneva et al., 2003).

(ii) Hepatite alcoólica: esta doença é caracterizada por grande processo inflamatório e destruição do fígado (Enomoto et al., 2000). Os sintomas variam com a severidade da doença e podem incluir febre, cansaço, anorexia, perda de peso e dores abdominais entre outros sintomas. Há dano nas funções hepatocelulares e desenvolvimento agudo de hipertensão portal. Este quadro pode ser revertido com prolongada abstinência, embora o processo inflamatório persista por vários meses podendo se agravar durante as primeiras semanas de abstinência. É freqüente em 50% dos etilistas (Bouneva et al., 2003).

(iii) Cirrose hepática: é a forma mais severa e avançada das doenças hepáticas ocorridas em etilistas (Lieber, 1994). Ocorre deformação nas células afetadas, caracterizando-se geralmente por extensiva fibrose hepática, hipertensão portal, danos nas funções hepáticas, regeneração micronodular e predisposição a carcinoma hepatocelular (Bouneva et al., 2003).

⁸ 40-80 gramas por dia para homens e 20-40 gramas por dia para mulheres.

A seguir, (Figura 2), demonstra-se um esquema que evidencia os múltiplos fatores envolvidos na resposta celular ao consumo abusivo de etanol, bem como as modificações celulares em resposta a esta substância.

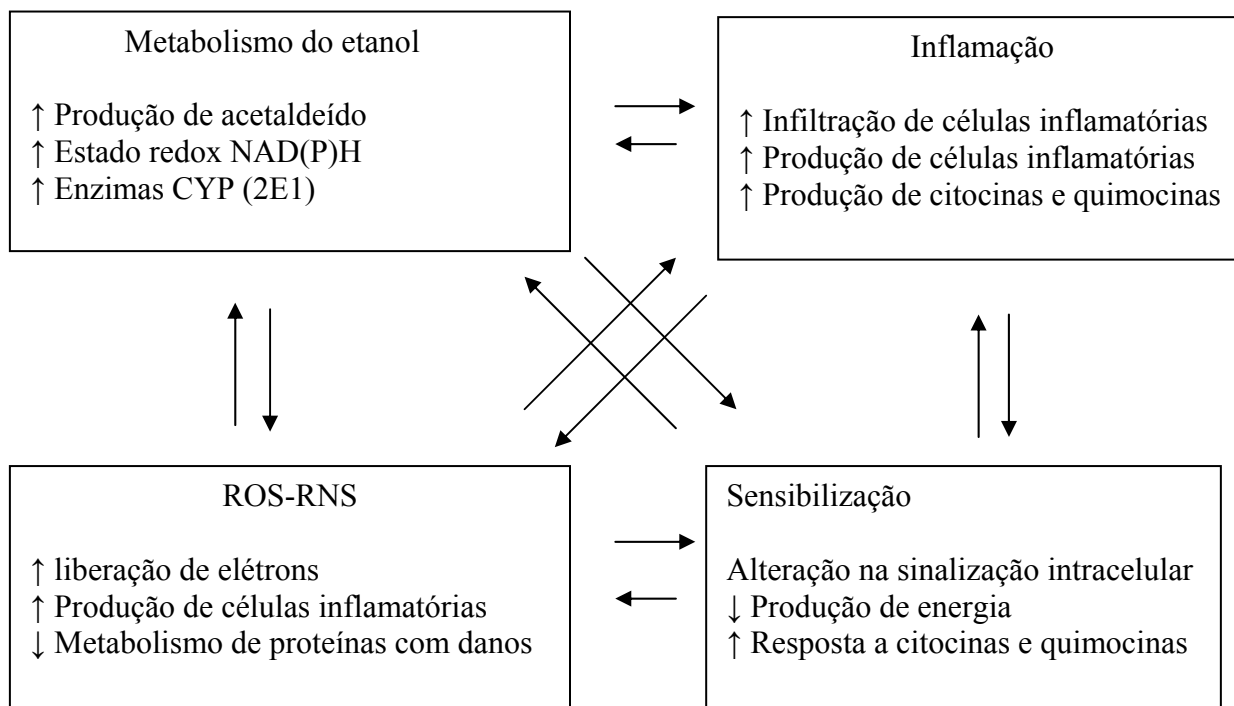


FIGURA 2: Mecanismos pelos quais o consumo excessivo de etanol pode levar aos danos no fígado. Demonstra-se o metabolismo do etanol, produzindo o acetaldeído, aumentando o estado redox celular e induzindo enzimas que metabolizam o etanol. A inflamação juntamente com o aumento destas células imunes e um aumento nos sinais pró-inflamatórios (citocinas, quimocinas). A sensibilização das células hepáticas, via alteração da sinalização intracelular, depleção das reservas de energia da célula e aumento na resposta a estímulos externos, aumento da resposta celular durante o tempo de ação do etanol. Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio via liberação de elétrons do sistema enzimático (mitocôndria e CYP450IIE1), células inflamatórias e diminuição da degradação de proteínas oxidativamente modificadas são fatores propostos como sendo essenciais em mediar os efeitos causados pelo etanol. Estes eventos não são mutuamente exclusivos e tendem a aumentar o efeito de outras

rotas. Este esquema representa um ciclo contínuo de danos e progressão da doença. Adaptado de Arteel et al., 2003.

2.4.2 Acetaldeído

Como mencionado anteriormente o acetaldeído, produto principal da ação das rotas enzimáticas de detoxificação do etanol, é uma molécula extremamente tóxica e altamente reativa (Tuma, 2002). Os efeitos sistêmicos mais comumente observados após o excesso de ingestão de etanol (tontura, dor de cabeça, náusea e vômito) são mediados, em parte, pelos efeitos diretos ou indiretos dos elevados níveis de acetaldeído.

A toxicidade atribuída ao acetaldeído ocorre devido a sua capacidade de ligar-se covalentemente a vários grupos funcionais. Reage com proteínas, resultando na produção de anticorpos, inativação de enzimas e diminuição no reparo do DNA (Israel et al., 1986; Espina et al., 1988; Niemelä 2001; Anni et al., 2003).

Outras complicações como depleção da glutatona mitocondrial, dano na β -oxidação dos ácidos graxos e produção de espécies reativas de oxigênio que causam a peroxidação de lipídios de membrana são também atribuídas a esta molécula (Lieber, 1988).

2.4.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio químico que ocorre nas células e tecidos. Este fato ocorre por haver um aumento na produção de radicais livres (substâncias oxidantes) e/ou uma diminuição do sistema de defesa antioxidante existente (Halliwell e Gutteridge, 1989; McCord, 1993). Neste contexto, o metabolismo do etanol parece gerar excesso destes radicais livres (Reinke et al., 1991; Bondy e Orozco., 1994).

A formação de radicais livres é um processo fisiológico que ocorre durante o metabolismo celular normal e as células dispõem de defesas para combater as ações nocivas do excesso destes radicais. Entretanto, algumas destas defesas são diretamente atingidas em casos de abuso de etanol (Lieber, 1997).

Dentre esses radicais livres, estão as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e peróxidos lipídicos, e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o peroxinitrito, ambos envolvidos nas manifestações clínicas das doenças hepáticas provocadas pelo abuso da ingestão do etanol (Halliwell, 1987; Lieber, 1988; Ashak et al., 1999; Fernandez-Checa et al., 1993; Taeres et al., 1994).

Para combater as ações prejudiciais desses radicais livres, o organismo conta com dois tipos de defesas, os enzimáticos e os não enzimáticos, presentes nos diferentes tecidos. Os mecanismos enzimáticos incluem a proteína superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), uma metaloenzima que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Krishna et al., 1996). Esta enzima é encontrada no citoplasma, onde necessita de cobre e zinco para reagir e a na mitocôndria onde necessita de manganês. Alguns estudos demonstram elevação na sua atividade em decorrência de uma excessiva administração de etanol (Campos et al., 2005). A catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, necessita de ferro para agir (Puntarulo et al., 1999). A glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) e a glutathiona redutase (GSH-R, E.C. 1.6.4.2) são enzimas envolvidas no metabolismo da glutathiona.

Dentre os mecanismos não enzimáticos, destaca-se a glutathiona (GSH), um tripeptídeo contendo cisteína que representa o tiol não protéico mais abundante nos mamíferos. Além disso, destacam-se as vitaminas A, C e E, sendo que esta última representa a principal defesa contra a lesão oxidativa das membranas celulares (reação de peroxidação lipídica) por ser lipossolúvel (Lamarche et al., 2004; Yang et al., 2004; Masalkar e Abhang, 2005).

Os radicais livres se tornam tão prejudiciais devido ao fato de serem muito instáveis e reativos. Estes reagem com biomoléculas como o DNA e o RNA, proteínas e lipídios, desestabilizando a fisiologia celular (Aleynik et al., 1998; Meager et al., 1999). Entretanto, salienta-se que alguns radicais livres podem ter efeitos fisiológicos benéficos, como nos casos de infecção, quando

ocorre sua produção por células fagocitárias para matar microorganismos invasores.

Capítulo 3

INTERAÇÃO ENTRE ETANOL E COMPOSTOS SULFIDRÍLICOS

3.1. Etanol, GSH e δ -ALA-D

As alterações provocadas pela ingestão em excesso de bebidas alcoólicas afetam moléculas de extrema importância para o funcionamento do organismo. A seguir, será abordado brevemente o efeito do etanol na principal defesa antioxidante intracelular de baixo peso molecular do organismo, a glutathiona, e nas enzimas participantes da sua rota, bem como na atividade da enzima δ -ALA-D.

3.1.2 Glutathiona (GSH)

A glutathiona (GSH), um tripeptídeo composto por L-glutamato, L-cisteína e L-glicina, é considerada a mais importante e prevalente molécula tiólica não-protéica das células de mamíferos (Meister, 1988). Apresenta papel essencial na neutralização de radicais livres, particularmente o radical hidroxila. A glutathiona é sintetizada e degradada na maioria dos tipos de células por uma série de reações enzimáticas bem caracterizadas. Ela existe nas formas reduzida (usualmente abreviada como GSH) e oxidada (usualmente abreviada como GSSG).

A GSH e GSSG são interconvertidas pela ação de duas enzimas, a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a glutathiona redutase (GSH-R) como demonstrado na Figura 3. A GSSG é reduzida para regenerar GSH em uma reação

catalisada pela enzima GSH-R - esta reação necessita de NADPH, como doador de hidrogênio (Deneke e Fanborg, 1989; Toborek e Henning, 1994).

Além da sua função antioxidante, a glutatona desempenha outras atividades de extrema importância, como por exemplo, a síntese e reparo do DNA, síntese protéica, transporte de aminoácidos, ativação enzimática e aumento da função imune (Lomaestro e Malone, 1995).

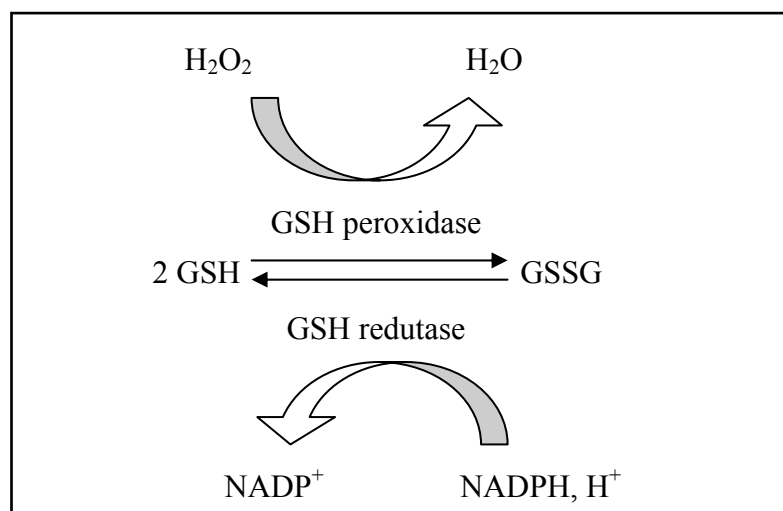


FIGURA 3: Rota de oxidação-redução, relação entre glutatona reduzida e glutatona oxidada.

A modificação do metabolismo e do estado redox de compostos sulfidrílicos endógenos está envolvida em vários mecanismos de dano hepático durante o metabolismo de compostos tóxicos (Anderson et al., 1990; Sood e O' Brien, 1993). Neste contexto, dentre os efeitos tóxicos provocados pelo álcool, está a depleção de compostos tiólicos, sendo este um fator muito importante a ser considerado no quadro de estresse oxidativo gerado pelo excesso de ingestão de bebidas alcoólicas (Lieber, 1997). Estas alterações no estado redox protéico e no conteúdo de tióis provocadas pelo etanol parecem ser diretamente dependentes do acetaldeído (Vendemiale et al., 1998).

Considerando o exposto acima, estudos que demonstram a relação entre alterações nos compostos tiólicos e danos hepáticos decorrentes do abuso de etanol são de importante relevância para a compreensão da toxicidade dessa substância.

3.1.3 δ -Aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D)

A enzima citosólica δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), ou porfobilinogênio sintase, é uma enzima de natureza sulfidrídica (Bevan et al., 1980), inibida por metais pesados como o chumbo e o mercúrio (Hasan e Seth, 1981; Perotoni et al., 2004) e pelo etanol (Sieg et al., 1991).

Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico com perda de duas moléculas de água. Esta reação faz parte da rota biossintética de compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofila e hemes) (Jaffe, 1995).

A grande importância destes compostos está na sua função como grupo prostético de proteínas. O grupamento heme (ferroprotoporfirina) faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina, mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), reações de transformação de xenobióticos (citocromo P 450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalase e peroxidases) - Figura 4.

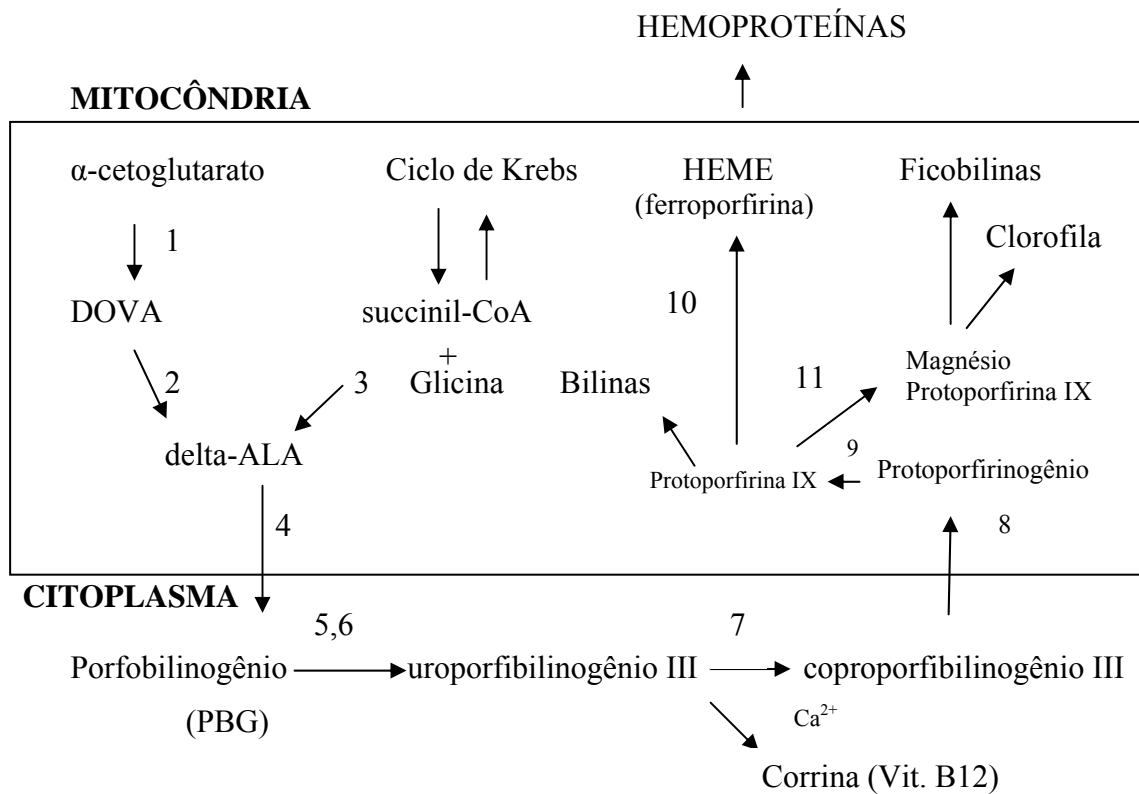


FIGURA 4: Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos compartimentalizada na mitocôndria e no citoplasma celular. Os números juntos às flechas indicam as reações catalisadas pelas seguintes enzimas: 1) Redutase; 2) DOVA-transaminase; 3) δ -ALA sintetase; 4) δ -ALA-desidratase; 5) Uroporfirinogênio I sintetase; 6) Uroporfirinogênio III cosintase; 7) Uroporfirinogênio descarboxilase; 8) Coproporfirinogênio oxidase; 9) Protoporfirinogênio oxidase; 10) Ferro-quelatase; 11) Magnésio-quelatase.

A ingestão excessiva de etanol altera a atividade de várias enzimas que participam da rota do heme (Mccall et al., 1981), dentre elas, estão a enzima δ -ALA-D e a uroporfirinogênio descarboxilase (Flora e Seth, 1999), as quais podem ser visualizadas na figura acima. Entretanto, os mecanismos pelos quais ocorre essa inibição não estão completamente esclarecidos.

Capítulo 4

COMPOSTOS ANTIOXIDANTES: EBSLEN E NAC

4.1 Introdução

Como mencionado no Capítulo 2 (item 2.4.3), as defesas contra os radicais livres são de extrema importância em situações de estresse oxidativo, podendo ser endógenas ou exógenas. Entre as defesas de fontes exógenas, estão os compostos antioxidantes sintéticos que direta ou indiretamente protegem os sistemas celulares dos efeitos tóxicos produzidos por espécies pró-oxidantes (Halliwell, 1995).

A seguir serão apresentados os dois compostos antioxidantes, NAC e o ebselen, testados neste trabalho frente à intoxicação com etanol.

4.1.2 N-Acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína (NAC) é uma droga que apresenta certa diversidade em relação ao seu uso. Essa diversidade ocorre devido à presença de um grupo tiol em sua estrutura química. Em intoxicações hepáticas por paracetamol, geralmente há a utilização dessa substância como antídoto. Intracelularmente, há a desacetilação desta molécula resultando em cisteína, a qual é utilizada pela célula para a produção de glutatona, um importante antioxidante (Birrel S., 2000).

Devido a isso, têm-se utilizado a NAC em situações de estresse oxidativo, onde a mesma parece atuar como antioxidante por ser precursora da glutatona

(Lauterburg et al., 1983; Bruck et al., 1999). A estrutura molecular da NAC está representada na Figura 5.

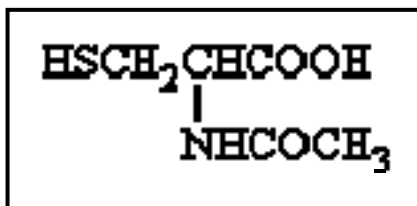


FIGURA 5: Estrutura molecular da N-acetilcisteína.

Devido ao fato do acetaldeído poder reagir com o grupamento tiólico da GSH (Shaw et al., 1979), estudos experimentais demonstram a capacidade da NAC exercer efeito protetor contra os danos oxidativos gerados pelo abuso da ingestão do etanol (Ozaras et al, 2003).

4.1.3 Ebselen (2-fenil-1,2-benzoselenazol-3(2H)-ona)

O ebselen, também conhecido como PZ 51, é um composto seleno-orgânico (Figura 6) que apresenta uma grande atividade mimética da glutathione peroxidase (Muller et al., 1984). O ebselen foi o primeiro composto sugerido a reduzir hidroperóxidos na presença da glutathione (Parnham e Kindt, 1984).

Entre os efeitos benéficos já comprovados da administração de ebselen, está a proteção exercida no fígado contra os danos causados pelo excesso de etanol administrado em ratos (Kono et al., 2001), além de possuir ação antiinflamatória (Parnham et al., 1987), proteção contra lipoperoxidação hepática (Hayashi e Slatter, 1986), entre outros efeitos antioxidantes comprovados.

A presença de um grupo nucleofílico⁹ (grupo selenol do metabólico ebselen selenol) é apontada como essencial para suas atividades antioxidantes.

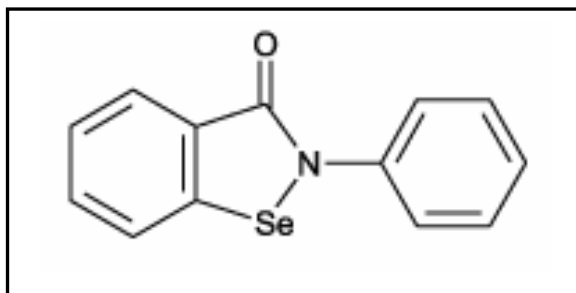


FIGURA 6: Estrutura molecular do ebselen.

O ebselen é um composto solúvel em lipídios e sua especificidade para substratos varia desde o peróxido de hidrogênio até pequenos hidroperóxidos orgânicos e inclui fosfolipídios ligados à membrana (Zhao et al., 2002), assim, fornece proteção às biomembranas contra a degradação peroxidativa.

⁹ Grupamentos, agentes ou substâncias nucleofílicas possuem elétrons disponíveis para realização de ligações químicas.

Capítulo 5

MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os materiais e as metodologias aplicadas na realização prática deste trabalho.

5.1 Reagentes químicos

5.1.1 Trabalho *in vivo* e *in vitro*

Reagentes adquiridos da empresa Belga Química (Santa Maria, RS):

- Álcool Etilico;
- Azida sódica;
- N-acetilcisteína;
- Fosfato de Potássio Monobásico;
- Fosfato de Potássio Dibásico;

Reagente adquirido da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha):

- Acetaldeído;

Reagente adquirido da empresa Reagen:

- Albumina bovina;

Reagentes adquiridos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA):

- Ácido 5-aminolevulínico, ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico);

- Ácido acético;
- Ácido Tricloroacético;
- *p*-dimetilaminobenzaldeído;
- Ácido perclórico;
- Tween 90%;
- Glutathione Redutase;
- Glutathione;
- NADPH;
- Peróxido de Hidrogênio;
- Ácido-5-5'-ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB);
- β - nicotinamida dinucleotídeo (sal de fosfato de sódio - forma reduzida)
- Peróxido de ter-butila;
- Ácido-5-5'-ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB);
- 2,4-ditioeritritol;
- Glutathione S-transferase de fígado bovino;
- Glutathione reduzida;

Reagentes adquiridos da empresa Vetec (Rio de Janeiro)

- Sacarose;
- Álcool Etilico;

O composto antioxidante testado ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)ona) foi sintetizado baseado em Engman e Hallberg (1989);

Todos os demais reagentes empregados foram de pureza analítica e o preparo das soluções foi realizado com água destilada.

5.2 Modelo Experimental

5.2.1 Estudo *in vivo*

5.2.2 Animais

Na realização dos experimentos, foram utilizados camundongos machos da espécie *Swiss albino*, adultos (com a média de dois meses de idade e pesando 30 gramas). Estes animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria e foram mantidos no Biotério do Departamento de Química desta mesma Instituição. Neste local, houve o controle da temperatura entre 20 e 25 °C sob o ciclo de luz natural, e com acesso livre a água e ração (Supra, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número de processo 23081.013917/2004-97.

5.2.3 Tratamento

Os camundongos foram divididos em dois grandes grupos de 24 animais cada. Os animais de um dos grupos foram tratados com etanol (grupo-etanol) e os animais do grupo controle foram tratados com uma solução isocalórica contendo glicose.

(i) **Grupo-etanol:** administrou-se, aos camundongos, através de gavagem¹⁰, uma solução de etanol e água (1:3 volume/volume), 11 mL/kg. A dose foi 3 g/kg, baseada em Schoedel et al., 2001 (Tabela 1).

(ii) **Grupo controle:** administrou-se, aos camundongos, através de gavagem, uma solução isocalórica de glicose (Tabela 2).

Administração de ebselen: administrou-se, aos camundongos, o composto através de injeção subcutânea. O ebselen foi dissolvido em tween 10% permitindo assim uma única injeção diária de 5 mL/kg na dose de 5 mg/kg, baseado em estudos prévios do nosso grupo (Farina et al.; 2003 a, b).

¹⁰ Gavagem é a administração de uma substância por via oral diretamente no estômago.

Administração da NAC: administrou-se, aos camundongos, este composto através de injeção intraperitoneal. A NAC foi dissolvida em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) permitindo uma única injeção diária de 5ml/kg na dose de 300mg/kg, baseado em Salminem et al.; 1998.

As soluções a serem injetadas foram preparadas diariamente em um período de 10 a 30 minutos antes da administração com o objetivo de evitar alterações químicas.

Os dois grandes grupos (etanol e controle) foram divididos em quatro subgrupos com seis animais cada. A visão geral do tratamento está representada nas Tabelas 1 e 2. O período de tratamento foi de 30 dias.

TABELA 1: Grupo dos camundongos tratados com etanol 3 g/kg; 11 mL/kg.

Subgrupos	NAC 60 mg/mL, i.p.	Ebselen 1 mg/mL, s.c.	Tween 10%, s.c.	TFK 50 mM, pH 7,0, i.p.
I	-----	-----	5 mL/kg	5 mL/kg
II	5 mL/kg	-----	5 mL/kg	-----
III	-----	5 mL/kg	-----	5 mL/kg
IV	5 mL/kg	5 mL/kg	-----	-----

TABELA 2: Grupo dos camundongos controle (glicose), 11 mL/kg.

Subgrupos	NAC 60 mg/mL, i.p.	Ebselen 1 mg/mL, s.c.	Tween 10%, s.c.	TFK 50 mM, pH 7,0, i.p.
I	-----	-----	5 mL/kg	5 mL/kg
II	5 mL/kg	-----	5 mL/kg	-----
III	-----	5 mL/kg	-----	5 mL/kg
IV	5 mL/kg	5 mL/kg	-----	-----

5.3 Preparação tecidual

Os camundongos submetidos ao tratamento foram sacrificados, 24 horas após a última injeção, por decapitação. O fígado foi rapidamente removido, pesado e homogeneizado em 8 volumes de uma solução de cloreto de sódio 150 mM. Todo este procedimento foi realizado em gelo. O homogenato obtido foi centrifugado a $4000 \times g$ em uma temperatura de 4 °C por 10 minutos. Com este procedimento obtiveram-se duas fases, sendo a mais leve, (sobrenadante), utilizada para os ensaios bioquímicos (atividade das enzimas δ -ALA-D e GSH-Px, e níveis de SHNP).

5.4 Determinações enzimáticas

5.4.1 Estudo da atividade da enzima δ -ALA-D

A atividade da enzima δ -ALA-D foi investigada baseando-se na metodologia desenvolvida por Sassa em 1982, onde, mede-se a taxa da formação do produto da catálise desta enzima, o porfobilinogênio. O substrato, δ -ALA-D, foi utilizado em uma concentração de 2,5 mM juntamente com TFK 100 mM, pH 6,4. O produto de reação foi determinado utilizando-se o reagente de Ehrlich modificado e a leitura foi feita em 555 nm, com o coeficiente de absorção molar de $6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o sal formado da interação entre o reagente de Ehrlich e o porfobilinogênio.

5.4.2 Estudo da atividade da enzima GSH-Px

A atividade da enzima GSH-Px foi medida baseando-se no método de Paglia e Valentine (1967). Neste método, uma alíquota (200-250 μg de proteína) do sobrenadante do homogenato de fígado é adicionada à mistura reacional com um volume total de 1 mL, iniciando-se a reação com pela adição de 0.1 mL de peróxido de hidrogênio 4 mM, sendo que a sua concentração final é de 0,4 mM. A oxidação de NADPH para NADP^+ foi continuamente monitorada em 340 nm por cinco minutos. A atividade da GSH-Px foi expressa como nmol de NADPH

oxidado para NADP^+ por minuto por mg de proteína do sobrenadante hepático. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o NADPH.

5.5 Verificação dos níveis de tióis não-protéicos

Esta determinação foi realizada com base em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Farina et al., 2004). A uma alíquota de 500 μL do sobrenadante hepático, foram adicionados 500 μL de TCA 10%. Após este procedimento, centrifugou-se esta mistura a 4000 x g em uma temperatura de 4 °C por dez minutos. Utiliza-se o sobrenadante para verificar-se a presença de grupamentos sulfidrílicos livres (-SH), o qual foi previamente neutralizado com hidróxido de sódio na concentração de 0,1 M, através do método de Ellman, 1959.

5.6 Determinação protéica

A determinação de proteínas nos diferentes ensaios foi realizada através do método de Lowry et al., 1951, utilizando-se albumina bovina como padrão.

5.7 Estudo *in vitro*

5.7.1 Animais

Utilizaram-se camundongos machos da espécie *Swiss albino*, pesando em média 30 gramas com aproximadamente dois meses de idade. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (20-25°C), sob condições naturais de luminosidade e com acesso livre a água e ração (Supra, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os procedimentos técnicos com os camundongos ocorreram de acordo com o Guia de Princípios de Animais em Toxicologia, adotado pela sociedade de toxicologia em julho de 1989.

5.7.2 Preparação Tecidual

O sobrenadante hepático foi utilizado para a análise da atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase e determinação de tióis. Para isso, os camundongos foram decapitados e o fígado foi rapidamente removido, armazenado em gelo e homogeneizado em 8 volumes de uma solução tamponada

de HEPES 25 mM, pH 7,0. Este homogenato foi centrifugado na velocidade de $4.000 \times g$, na temperatura de 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante obtido foi utilizado para medir-se a atividade das enzimas GSH-Px e GSH-R e o estado tiólico.

5.7.3 Determinação da atividade das enzimas GSH-R e GSH-Px

A dosagem da atividade destas enzimas foi baseada na metodologia desenvolvida por Carlberg e Mannervik, 1985 e Wendel, 1981, respectivamente. A verificação da atividade da enzima glutathione redutase ocorre no momento em que esta enzima reduz a glutathione oxidada à custa de NADPH, que é monitorado em um comprimento de onda igual a 340 nm. A atividade da enzima glutathione redutase é proporcional ao decaimento de NADPH (Carlberg e Mannervik, 1985). No ensaio da enzima glutathione peroxidase, acompanha-se indiretamente a atividade desta enzima também pelo decaimento de NADPH. O peróxido de *ter*-butila é decomposto gerando glutathione oxidada a partir do consumo de glutathione reduzida. Dessa forma, a glutathione oxidada é reduzida novamente pela atividade da enzima glutathione redutase presente no meio à custa de NADPH (Wendel, 1981).

5.7.4 Determinação da atividade tiol-peroxidase do ebselen

Esta atividade foi verificada de acordo com o método de Wilson et al.; 1989. A reação foi conduzida na temperatura de 25 °C em uma solução de 1 mL contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 1 mM de ácido dietilaminotetraacético (EDTA), 1 mM de glutathione reduzida, 1 unidade de glutathione redutase e 50 µM de ebselen. A mistura foi pré-incubada com concentrações diferentes de acetaldeído (0, 30, 100 e 300 µM) por 30 minutos. Após este tempo, foi adicionado ao meio 0.25 mM de uma solução de NADPH e incubou-se por 3 minutos em 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mM de peróxido de *ter*-butila. A atividade foi monitorada pelo decaimento da absorção do NADPH no comprimento de onda de 340 nm. Foram feitos controles com e sem ebselen e após subtraiu-se da atividade das amostras.

5.7.5 Estudos de espectroscopia

Estes estudos foram realizados com a finalidade de detectar-se um possível efeito do acetaldeído na interação entre glutatona reduzida e o ebselen. Através da espectroscopia em comprimentos de onda variando entre 250-450 nm (espectrofotômetro Varian Cary UV), foi analisado o espectro de absorção do ebselen e dos produtos da sua interação com a glutatona reduzida e/ou o acetaldeído. Estas reações foram feitas à temperatura ambiente (25 °C) em 50 mM de tampão fosfato, pH 7,4, em cubeta de quartzo.

5.7.6 Determinação de grupamentos sulfidrílicos

Os grupamentos sulfidrílicos totais e não-proteicos provindos do sobrenadante hepático e a quantidade de grupos sulfidrílicos da glutatona reduzida e do ditioeritritol foram realizados utilizando DTNB, baseando-se na metodologia de Ellman, 1959.

5.7.7 Determinação protéica

A determinação protéica foi realizada baseada na metodologia de Lowry et al.; 1951, utilizando albumina bovina como padrão.

5.8 Análise Estatística

Todos os valores são representativos da média \pm erro padrão da média, (considerando o número de animais igual a seis). As diferenças entre os grupos foram analisadas através da análise de variância de uma via, seguida pelo teste de Duncan quando o valor de p foi menor que 0,05. A correlação de Pearson (two-tailed) foi realizada para identificar a possível correlação entre alguns parâmetros analisados. Realizou-se também uma análise de variância de três vias para detectar uma possível existência de interação entre ebselen x NAC x etanol.

Capítulo 6

RESULTADOS OBTIDOS

6.1 Estudo *in vivo*

Após a realização do tratamento crônico com etanol (3 g/kg), N-acetilcisteína (300 mg/kg) e ebselen (5 mg/kg), administrados simultânea ou individualmente, durante trinta dias, nenhuma alteração em relação ao ganho de peso foi observada nos camundongos (dados não mostrados).

Os níveis de SHNP hepáticos foram significativamente diminuídos com a administração de etanol (FIGURA 7). O ebselen e a N-acetilcisteína foram individualmente capazes de restabelecer os níveis de SHNP para os níveis do controle. No entanto, o tratamento simultâneo com o ebselen e a N-acetilcisteína não apresentou efeito benéfico aditivo em relação aos níveis de SHNP hepáticos quando comparado com os efeitos das administrações individuais das drogas. A administração de etanol inibiu a atividade das enzimas δ -aminolevulinato desidratase (FIGURA 8) e glutaciona peroxidase (FIGURA 9) hepáticas. O ebselen e a N-acetilcisteína, sozinhos, restabeleceram suas atividades para os níveis do controle. O tratamento simultâneo com o ebselen e a N-acetilcisteína não apresentou efeito benéfico aditivo em relação às atividades das enzimas δ -aminolevulinato desidratase e glutaciona peroxidase quando comparado com os efeitos das administrações individuais das drogas.

Através da correlação de Pearson, a atividade da glutaciona peroxidase hepática e os níveis de SHNP foram positivamente correlacionados (Coeficiente de Pearson = 0,365; $p = 0,02$). Além disso, houve correlação positiva entre a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase e os níveis de SHNP hepáticos (Coeficiente de Pearson = 0,568, $p < 0,01$).

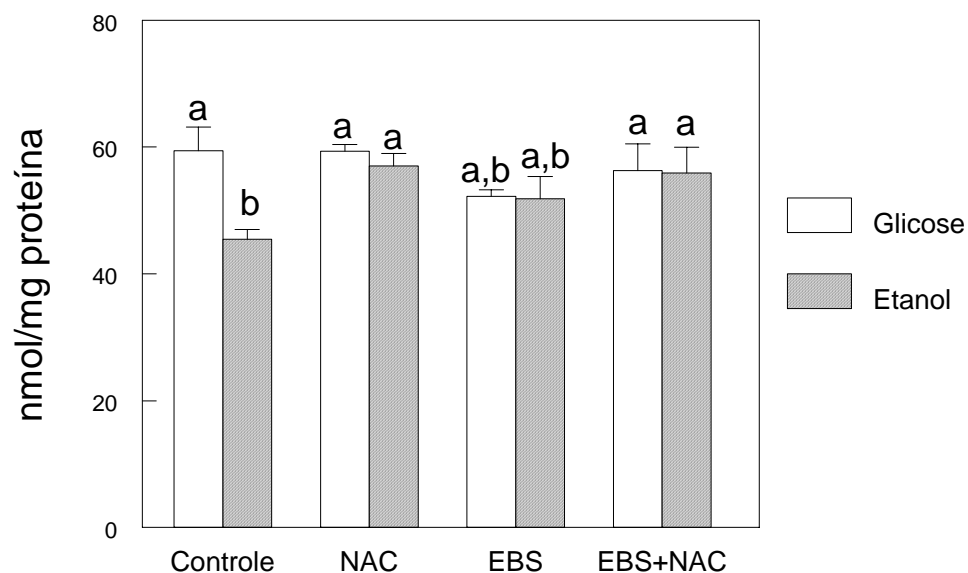


FIGURA 7: Efeito da administração de N-acetilcisteína (NAC) e/ou ebselen nos níveis hepáticos de tióis não-protéicos (SHNP) dos camundongos controle e expostos ao etanol. Os dados são expressos como nmol/mg de proteína e representam a média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. Letras diferentes expressam diferença significativa ($p < 0,05$) através da análise de variância de uma via, seguida pelo teste de Duncan quando o valor de F foi significativo.

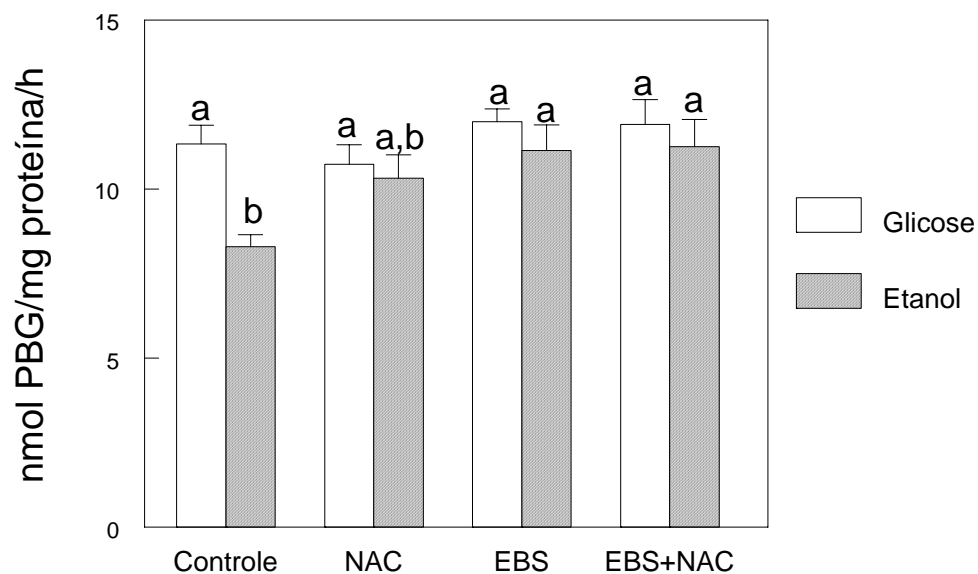


FIGURA 8: Efeito da administração de N-acetilcisteína (NAC) e/ou do ebselen sobre a atividade da enzima δ -ALA-D hepática dos camundongos controle e expostos ao etanol. Os dados são expressos como nmol de porfobilinogênio formado (PBG)/mg de proteína e representam a média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. Letras diferentes expressam diferença significativa ($p < 0,05$) através da análise de variância de uma via, seguida pelo teste de Duncan quando o valor de F foi significativo.

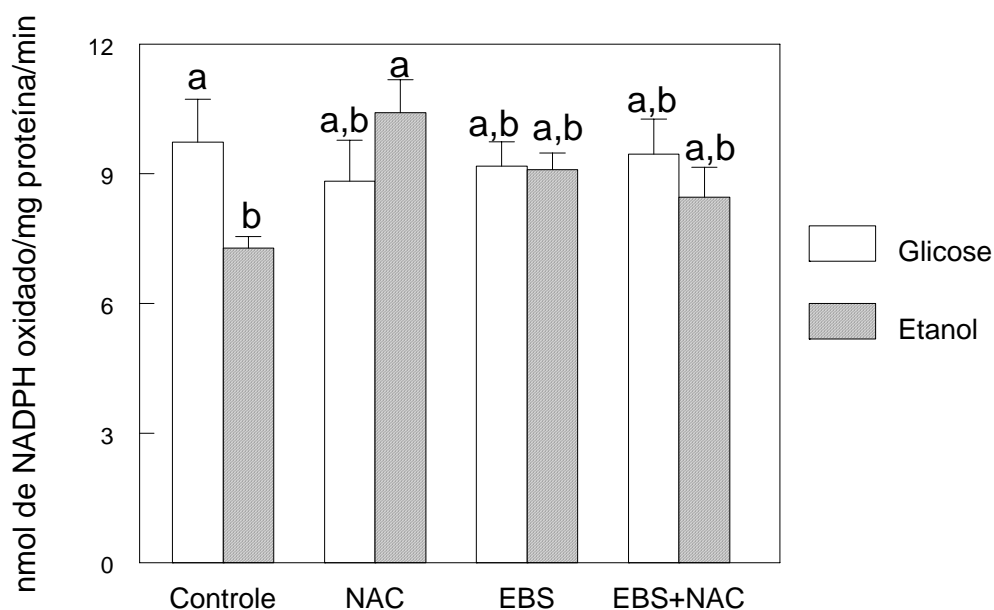


FIGURA 9: Efeito da administração de N-acetilcisteína (NAC) e/ou do ebselen sobre a atividade da enzima GSH-Px hepática dos camundongos controle e dos camundongos expostos ao etanol. Os dados são expressos como nmol de NADPH oxidado/mg de proteína/min e representam a média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. Letras diferentes expressam diferença significativa ($p < 0,05$) através da análise de variância de uma via, seguida pelo teste de Duncan quando o valor de F foi significativo.

6.2 Estudo *in vitro*

Os efeitos *in vitro* do acetaldeído na atividade das enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-R) e na atividade tiol peroxidase do ebselen estão demonstrados na tabela 3. Após trinta minutos de pré-incubação, o acetaldeído não afetou a atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase nas concentrações testadas. Sob as mesmas condições de pH e temperatura comparadas ao estudo das enzimas hepáticas, o acetaldeído também não modificou a atividade tiol-peroxidase do ebselen.

Sabe-se que a atividade tiol-peroxidase do ebselen depende da sua conversão a ebselen selenol e este fenômeno ocorre pela reação do ebselen com a glutathione reduzida (Cotgreave et al., 1992). Tendo em vista o fato de o acetaldeído ser uma molécula eletrofílica, estudos espectroscópicos foram realizados para detectar um possível efeito do acetaldeído na formação/estabilidade do composto ebselen selenol após a interação entre glutathione e ebselen. A figura 10 demonstra que o ebselen (50 μM) e a glutathione (100 μM) reagem rapidamente na proporção 1:2 produzindo uma molécula intermediária, a qual se acredita ser o ebselen selenol (Figura 10, espectro B, Hanzel et al., 2005). A adição prévia de acetaldeído, nas concentrações de 100 e 300 μM , não afetou a formação deste produto (Figura 10, espectro C e D, respectivamente). A figura 11 demonstra o tempo de interação entre o ebselen (50 μM) e a glutathione (100 μM) na ausência (Figura 11 A) ou presença (Figura 11 B) de acetaldeído (300 μM). Neste protocolo, a presença de acetaldeído também não afetou a interação ebselen/glutathione e a formação do ebselen selenol foi imediatamente observada após a adição de glutathione ao meio contendo ebselen. Considerando que o intermediário ebselen selenol é uma molécula nucleofílica instável e parece reagir com o ebselen para produzir o ebselen disseleneto (Zhao e Holmgren, 2002), a formação de uma molécula estável evidenciou-se aos 30 minutos após o início da reação. Notavelmente, este produto apresenta um espectro semelhante ao do ebselen disseleneto quando comparado ao composto

autêntico (Zhao e Holmgren, 2002), demonstrando duas fortes e amplas bandas de absorção (de 250 a 300 nm e de 300 a 420 nm) sobrepondo-se uma a outra. Este perfil espectrofotométrico desaparece com o tempo (após 6 horas) devido à precipitação, confirmando com a baixa solubilidade do ebselen disseleneto em água.

As figuras 12 e 13 demonstram os efeitos do acetaldeído na oxidação de um monotiol (GSH) e um ditiol (ditiotreitól) em condições *in vitro*, respectivamente. Após 30 minutos do início da reação, o acetaldeído não foi capaz de oxidar a glutathiona e o ditiotreitól nas concentrações testadas. Entretanto, utilizando-se o sobrenadante hepático, o acetaldeído significativamente oxidou os tióis totais (Figura 14) e não-protéicos (Figura 15), sugerindo que a oxidação de tióis dependente do acetaldeído parece ser influenciada por alguns constituintes hepáticos.

Baseado nos resultados demonstrados pela Figura 14 e em estudos anteriores que demonstram o papel da enzima glutathiona-S-transferase (GST), no processo de detoxificação de aldeídos endógenos (Chen et al., 2002; Sidell et al., 2003), o possível efeito estimulador da GST purificada sobre a oxidação da glutathiona induzida pelo acetaldeído foi avaliado. A tabela 4 demonstra que o acetaldeído não foi um bom substrato para a GST (extraída de fígado bovino), conseqüentemente, a oxidação da glutathiona não foi observada na presença de acetaldeído e GST.

TABELA 3: Efeito *in vitro* do acetaldeído na atividade das enzimas hepáticas de camundongo glutathiona redutase (GSH-R), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e na atividade tiol-peroxidase do ebselen. Os sobrenadantes de fígado (aproximadamente 3mg de proteína) e ebselen (50 nmol) foram pré-incubados a 37 °C, durante 30 minutos, com concentrações diferentes de acetaldeído (0, 30, 100 e 300 μ M) em um meio contendo 50 mM de tampão fosfato, pH 7.0, com o volume final da reação de 1 mL). Após o tempo de pré-incubação, uma alíquota de 25 μ L de cada meio foi utilizada para se determinar as atividades catalíticas. As atividades das enzimas glutathiona redutase (GSH-R) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) são expressas como nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína. A atividade tiol-peroxidase do ebselen é expressa como nmol de NADPH oxidado/minuto/ μ mol. Os dados são expressos como média \pm E.P.M., de três estudos repetições independentes.

	GSH-R	GSH-Px	Ebselen
Controle	18,6 \pm 0,59	9,3 \pm 0,18	340 \pm 71,0
Acetaldeído (30 μ M)	18,4 \pm 0,22	9,3 \pm 0,23	340 \pm 22,3
Acetaldeído (100 μ M)	17,5 \pm 0,39	8,7 \pm 0,15	323 \pm 34,7
Acetaldeído (300 μ M)	17,9 \pm 0,62	8,9 \pm 0,25	316 \pm 22,7

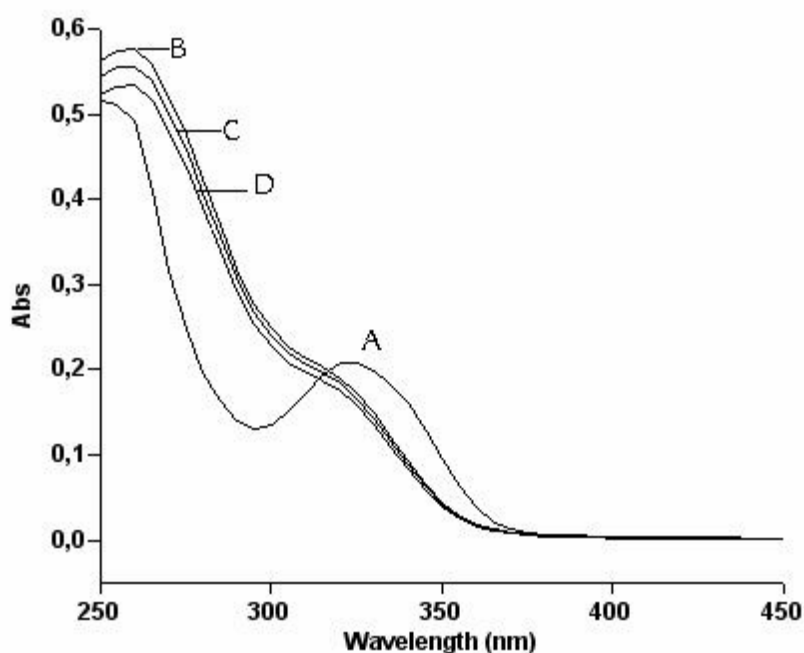


FIGURA 10: Espectro de absorção do ebselen e os produtos da sua interação com glutatona e/ou acetaldeído. As reações ocorreram em temperatura ambiente (25 °C) em um meio contendo 50 mM de tampão fosfato, pH 7.4, em uma cubeta de quartzo. Estas reações foram monitoradas pelo espectrofotômetro com comprimento de onda variando de 250-450 nm, utilizando o espectrofotômetro Varian Cary UV. A linha **A** demonstra o espectro de absorção do ebselen (50 μ M). A linha **B** demonstra o espectro de absorção do ebselen (50 μ M) + glutatona (100 μ M) + 1 minuto de incubação. As linhas **C** e **D** são semelhantes à linha **B**, diferem apenas pelo fato das incubações ocorrerem na presença de acetaldeído 100 e 300 μ M, respectivamente. Acetaldeído (300 μ M), glutatona (100 μ M) e acetaldeído (300 μ M + glutatona 100 μ M) não demonstraram absorvâncias perceptíveis nestes comprimentos de onda. Aliado a isto, o acetaldeído (300 μ M) não apresentou efeito no espectro do ebselen (dados não demonstrados).

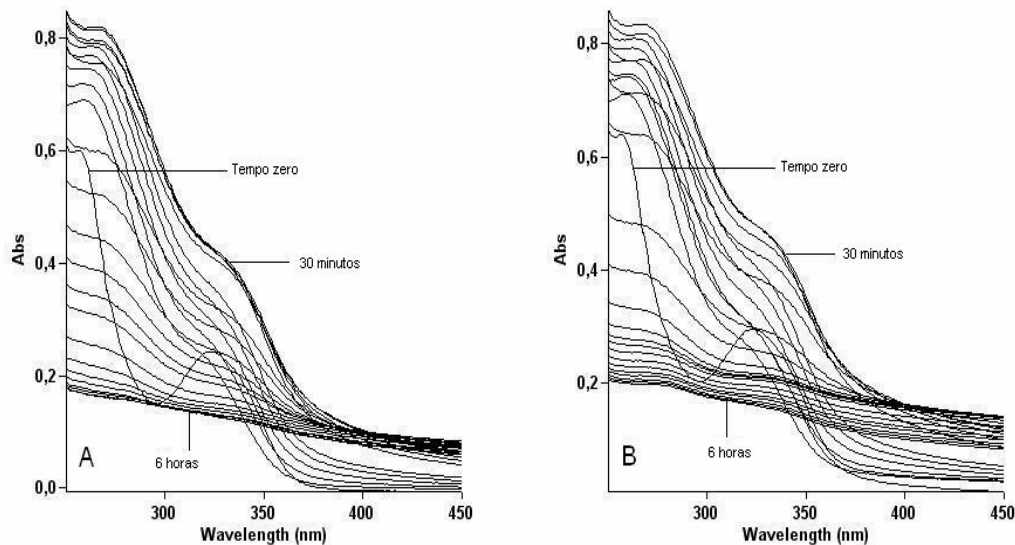


FIGURA 11: Espectro de absorção do ebselen e os produtos da sua interação com glutatona e/ou acetaldeído. Incubou-se o ebselen ($50 \mu\text{M}$) com glutatona ($100 \mu\text{M}$) na ausência (A) ou presença (B) de acetaldeído ($300 \mu\text{M}$). A reação ocorreu em temperatura ambiente (25°C) em um meio contendo 50 mM de tampão fosfato ($\text{pH } 7,4$), em uma cubeta de quartzo. A formação dos produtos foi monitorada durante 6 horas e o tempo marcado foi o seguinte: zero a 5 minutos (1 em 1 minuto); 5-60 minutos (10 em 10 minutos); 60-720 minutos (30 em 30 minutos).

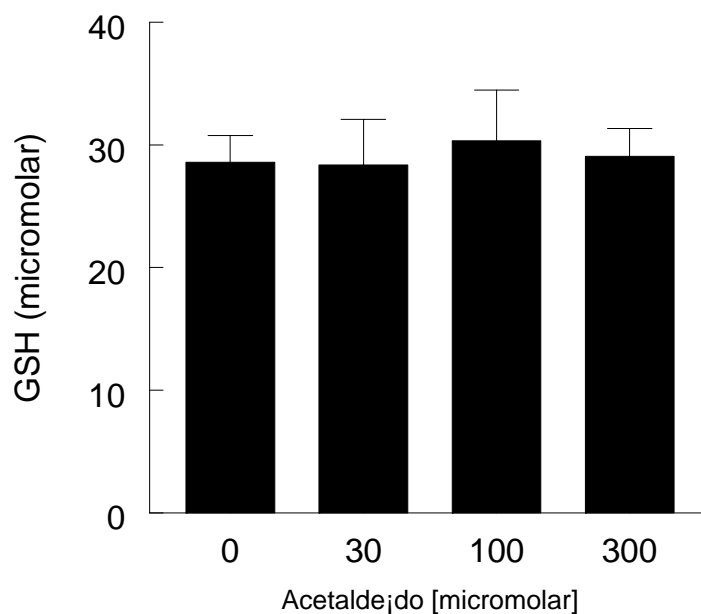


FIGURA 12: Efeito *in vitro* do acetaldeído sob a oxidação da glutathione. O composto sulfidrílico (30 nmol) foi incubado a 37 °C, durante 30 minutos, com concentrações crescentes de acetaldeído (0, 30, 100 e 300 μM), em um meio contendo 50 mM de tampão fosfato, pH 7.0, com 1 mL de volume final da reação. Após a incubação, determinou-se a quantidade de grupamentos sulfidrílicos com DTNB. Os grupos sulfidrílicos são expressos como μM e representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

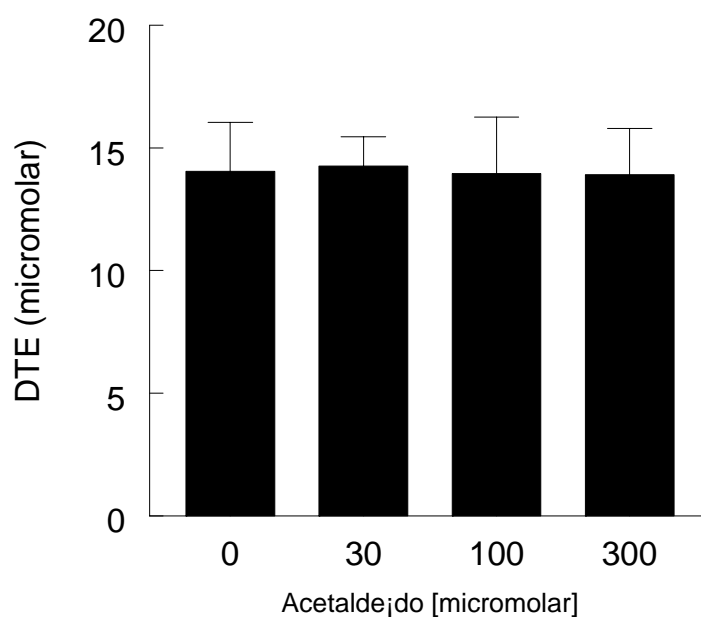


FIGURA 13: Efeito *in vitro* do acetaldeído sob a oxidação do ditieritritol (DTE). O composto sulfidrílico (15 nmol) foi incubado a 37 °C, durante 30 minutos, com concentrações crescentes de acetaldeído (0, 30, 100 e 300 μM), em um meio contendo 50 mM de tampão fosfato, pH 7.0, com 1 mL de volume final da reação. Após a incubação, determinou-se a quantidade de grupamentos sulfidrílicos com 5-5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico). Os grupos sulfidrílicos são expressos como μM e representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

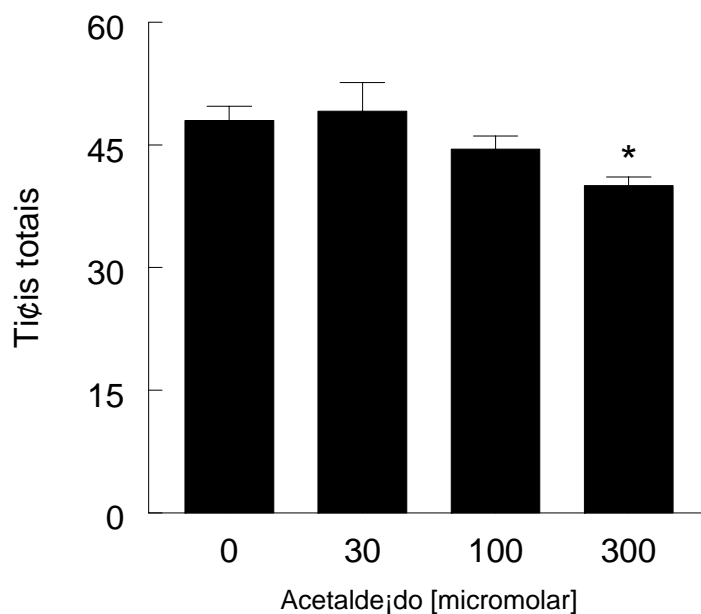


FIGURA 14: Efeito *in vitro* do acetaldeído na oxidação de grupamentos sulfidrílicos totais de fígado de camundongo. O sobrenadante hepático, com aproximadamente 3 mg de proteína, foi incubado a 37 °C, durante 30 minutos, com concentrações crescentes de acetaldeído (0, 30, 100 e 300 μM) em um meio contendo 50 mM de tampão fosfato, pH 7,0, com 1 mL de volume final da reação. Após a incubação, determinou-se a quantidade de grupamentos sulfidrílicos com DTNB. Os grupos sulfidrílicos totais são expressos como μM e representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

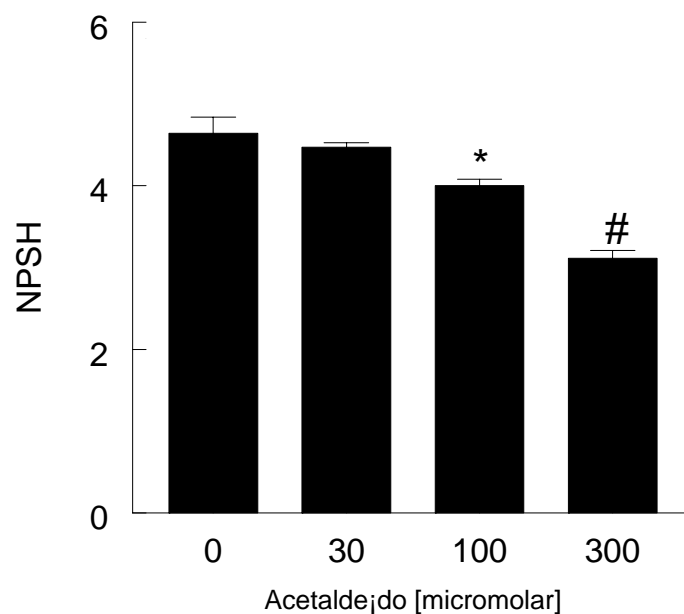


FIGURA 15: Efeito *in vitro* do acetaldeído na oxidação grupamentos sulfidrílicos não protéicos de fígado de camundongo. O sobrenadante hepático, com aproximadamente 3 mg de proteína, foi incubado a 37 °C, durante 30 minutos, com concentrações crescentes de acetaldeído (0, 30, 100 e 300 μ M) em um meio contendo 50 mM de tampão fosfato, pH 7,0, com 1 mL de volume final da reação. Após a incubação, determinou-se a quantidade de grupamentos sulfidrílicos com 5-5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB. Os grupos sulfidrílicos não protéicos são expressos como μ M e representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * Representa a diferença entre a concentração de 100 μ M e o controle, e # representa a diferença entre a concentração de 300 μ M e o controle.

TABELA 4: Efeitos *in vitro* do acetaldeído sob a oxidação da glutationa na presença da glutationa-S-transferase (GST). Incubou-se glutationa (1 μmol) com acetaldeído (1 μmol) a 37 °C, na presença ou ausência da glutationa-S-transferase, em um meio de reação contendo 50 mM de tampão fosfato, pH 7,0, em um volume final da reação de 1 mL. Nos tempos 1, 5, e 30 minutos de incubação, alíquotas de 25 μL foram retiradas para a determinação da quantidade de grupamentos sulfidrílicos utilizando o ácido 5-5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB. Os grupos sulfidrílicos são expressos como μM e a média \pm desvio padrão representa 3 experimentos independentes.

Condições experimentais ↓	Tempo de incubação		
	1 minuto	5 minutos	30 minutos
Controle	1,03 \pm 0,15	0,98 \pm 0,14	1,09 \pm 0,19
GST (0,1 unidades)	1,05 \pm 0,18	1,00 \pm 0,21	1,00 \pm 0,17
GST (0,3 unidades)	0,97 \pm 0,11	0,99 \pm 0,14	0,98 \pm 0,09
GST (1,0 unidades)	0,99 \pm 0,20	0,98 \pm 0,19	1,02 \pm 0,16

Capítulo 7

DISCUSSÃO

As interpretações acerca dos efeitos prejudiciais do consumo excessivo de etanol, a nível fisiológico e bioquímico, passaram por mudanças ao longo das últimas três décadas. Inicialmente, os sintomas de doenças hepáticas decorrentes da ingestão abusiva de etanol eram atribuídos exclusivamente a deficiências nutricionais (inadequada ingestão e absorção de nutrientes essenciais) (Lieber, 1993; Borini, 1996). No entanto, esta visão passou a mudar com a publicação de trabalhos que apontavam à ação pró-oxidativa do etanol nas células hepáticas (Di Luzio, 1963), sugerindo que, além da indução a deficiências nutricionais, mecanismos diretos de injúria celular também estavam envolvidos na toxicidade do etanol.

Atualmente, sabe-se que os danos provocados pela ingestão excessiva de bebidas contendo etanol estão associados, ao menos em parte, com o estresse oxidativo decorrente da produção de espécies reativas durante o metabolismo do etanol, o que acaba alterando a homeostase redox e causando alterações nas estruturas e funções celulares (Bailey et al., 2001; Pushpakiran et al., 2004).

O fato de o estresse oxidativo estar diretamente relacionado com a toxicidade induzida pelo etanol foi demonstrado em trabalhos como o de Boveris e colaboradores (1983), onde se evidenciou uma relação significativa entre o consumo excessivo de etanol, a diminuição de defesas antioxidantes e, conseqüentemente, o aumento na peroxidação dos lipídeos hepáticos. Entretanto, embora esta relação entre etanol e estresse oxidativo já esteja bem evidenciada, o conhecimento acerca das moléculas envolvidas neste processo ainda não está completamente elucidado.

Muitos trabalhos apontam para o acetaldeído, o principal produto do metabolismo do etanol, como uma molécula altamente reativa e importante no que se refere aos danos oxidativos decorrentes da ingestão excessiva de etanol. Neste contexto, o acetaldeído parece reagir rapidamente com grupos nucleofílicos de proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos produzindo aductos, os quais têm sido detectados em indivíduos etilistas (Niemelã et al., 1987; Lin et al., 1988; Fang & Vaca, 1997). Entretanto, além do acetaldeído, o metabolismo do etanol gera outras moléculas importantes do ponto de vista toxicológico, dentre as quais se destacam alguns radicais livres (Kuthan & Ulbrich, 1982), como o radical 1-hidroxietil, que vêm recebendo grande atenção devido às suas capacidades pró-oxidantes (Albano et al., 1988; Rashba-Step, 1993). Deste modo, parecem ser vários os fatores relacionados com o estresse oxidativo causado pelo consumo excessivo de etanol.

As investigações acerca do fato de o etanol ou seus metabólitos favorecerem a oxidação de biomoléculas, agindo diretamente como oxidantes, reduzindo os níveis de antioxidantes, ou pela combinação de ambos os fenômenos, fazem com que moléculas com propriedades antioxidantes como o ácido ascórbico (Sivaram et al., 2003), a vitamina E (Siler-Marsiglio et al., 2004) e os flavonóides (Molina et al., 2003), sejam cada vez mais investigados como possíveis agentes terapêuticos para os processos de injúria tecidual decorrentes da ingestão excessiva de etanol. Tais estudos têm demonstrado o efeito protetor destas substâncias frente ao estresse oxidativo provocado pelo excesso de etanol consumido.

Compostos tiólicos, como a glutathiona, têm demonstrado uma boa capacidade de neutralizar radicais livres gerados pelo metabolismo do etanol, fato que leva à sua oxidação (Vina et al., 1980, Speisky et al., 1985; Gonzales et al., 1988). Neste contexto, compostos contendo grupamentos sulfidrílicos, como a N-acetilcisteína (NAC), têm demonstrado efeitos benéficos contra os danos hepáticos provocados pela ingestão de etanol (Ozaras et al., 2003).

Demonstrou-se, neste trabalho, que os compostos antioxidantes NAC e ebselen apresentaram, individualmente, as capacidades de prevenir a diminuição de tióis não protéicos do fígado decorrente da intoxicação crônica por etanol em

camundongos. O mecanismo protetor da NAC parece estar relacionado com a sua capacidade de fornecer precursores para a síntese intracelular de glutatona. Entretanto, um efeito redutor direto da NAC frente a espécies eletrofílicas não deve ser descartado.

A identificação do mecanismo molecular pelo qual o ebselen preveniu a diminuição de tióis hepáticos induzida pelo etanol é um tanto quanto complexa, uma vez que este organocalcogênio apresenta vários mecanismos de ação antioxidante. De fato, além de atuar como um agente mimético da enzima glutatona peroxidase (Müller et al., 1984), detoxificando vários peróxidos gerados endogenamente, o ebselen também parece inibir a enzima pró-oxidante NADPH-oxidase (Cotgreave et al., 1989), diminuindo, assim, a formação de radicais livres reativos. Além disso, Wang e colaboradores (1992) demonstraram que o ebselen inibe a liberação de óxido nítrico e superóxido *in vitro* após a estimulação das células de Kupffer (envolvidas na progressão de danos hepáticos ocasionados pelo etanol) com endotoxinas.

O ebselen também protegeu contra os efeitos inibitórios causados pelo etanol nas atividades das enzimas glutatona peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase hepáticas. As funções catalíticas destas enzimas dependem da integridade dos seus grupos tióis, no caso da enzima δ -aminolevulinato desidratase, e um grupo selenol, no caso da enzima glutatona peroxidase. Tendo em vista que o acetaldeído, o principal produto do metabolismo do etanol, é uma molécula altamente reativa e eletrofílica, seria possível sugerir a sua participação nos fenômenos de inibição das enzimas glutatona peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase hepáticas decorrentes da exposição crônica ao etanol em nosso modelo experimental.

Nos organismos vivos, existe um poderoso sistema intracelular redutor de proteínas dissulfeto, o sistema tioredoxina. Este sistema é composto pela tioredoxina, pela enzima tioredoxina redutase e pelo nucleotídeo NADPH, e sua função é manter a homeostase do estado redox das células. O ebselen funciona como substrato para este sistema em mamíferos (Zhao et al., 2002; Zhao e Holmgren, 2002), sendo reduzido pelo NADPH e formando o composto ebselen

selenol, um ótimo agente nucleofílico que pode catalisar a redução de dissulfetos. Considerando este fato, é plausível sugerir que o papel redutor direto do ebselen selenol contribua para a proteção contra os efeitos inibitórios provocados pela ingestão de etanol nas atividades das enzimas glutathione peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase hepáticas. De fato, o ebselen selenol parece ter a capacidade de contribuir para a manutenção dos grupos selenol e tióis das enzimas glutathione peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase hepáticas nos seus estados reduzidos.

Alguns trabalhos têm reportado os efeitos benéficos aditivos da administração simultânea de ebselen e NAC contra o dano oxidativo quando comparados com os efeitos das administrações individuais (Pritsos et al., 1992). Neste contexto, a NAC parece atuar diretamente como molécula doadora de elétrons no ciclo catalítico de redução de peróxidos pelo ebselen (Cotgreave et al., 1989). Em nosso estudo *in vivo*, a administração simultânea de ebselen e NAC não apresentou efeitos benéficos aditivos contra a depleção de grupos tióis de fonte não protéica no fígado dos camundongos intoxicados com etanol quando comparados com os efeitos das administrações individuais. Além disso, a administração simultânea de ebselen e NAC também não apresentou efeitos benéficos aditivos contra a inibição das enzimas hepáticas glutathione peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase induzida pelo tratamento crônico com etanol quando comparados com os efeitos das administrações individuais. Tendo em vista a completa reversão destas variáveis bioquímicas a níveis basais após os tratamentos individuais com NAC ou ebselen, somada ao rígido controle da homeostase tiol/dissulfeto celular, a ausência de possíveis efeitos benéficos aditivos após as administrações simultâneas de NAC e ebselen era um fenômeno esperado.

Como mencionado anteriormente, a ligação entre o estresse oxidativo e doenças decorrentes do consumo abusivo de etanol é um fato apontado por vários estudos. Entretanto, o mecanismo pelo qual o etanol induz o dano celular é um tópico que ainda necessita de maiores esclarecimentos. A inibição de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e a glutathione reductase pelo etanol,

seus metabólitos ou radicais gerados a partir do seu metabolismo tem recebido notável atenção nos últimos anos (Puntarulo et al., 1999; Ostrowska et al., 2004). Considerando que as enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona redutase possuem grupamentos nucleofílicos (selenol e sulfidrílicos, respectivamente), essenciais para sua atividade antioxidante e que o acetaldeído é uma molécula bastante eletrofílica, é plausível supor que a inibição da atividade de ambas as enzimas, observada após o consumo de etanol (Puntarulo et al., 1999; Ostrowska et al., 2004), poderia estar relacionada, pelo menos em parte, com um efeito inibitório direto do acetaldeído. Entretanto, os resultados apresentados demonstraram que o acetaldeído não inibe diretamente estas enzimas em condições *in vitro*, sugerindo que este fenômeno também pode ocorrer *in vivo*. Além disso, a atividade tiol-peroxidase do composto ebselen também não foi modificada pelo acetaldeído, mesmo em concentrações cerca de seis vezes maiores que aquelas encontradas no fígado de indivíduos etilistas. Considerando que o ebselen catalisa a reação tiol-peroxidase com um mecanismo similar ao da enzima glutathiona peroxidase (Maiorino et al., 1988) e que a inativação das propriedades catalíticas do ebselen pelos inibidores da glutathiona peroxidase, aurotioglicose e D-penicilamina HCl, tem sido relatada (Mercurio et al., 1986), este estudo definitivamente finaliza a questão da possibilidade de o acetaldeído ser ou não o inibidor direto das glutathiona peroxidase e glutathiona redutase. De acordo com esta idéia, os estudos espectroscópicos demonstraram que o acetaldeído não afeta a cinética de formação do ebselen selenol após a interação química entre a GSH e o ebselen.

Os resultados apresentados não demonstram um efeito oxidativo direto do acetaldeído na GSH em condições *in vitro*, mesmo quando as concentrações de acetaldeído foram dez vezes superiores as de GSH no meio de reação. Além disso, o composto ditioeritritol (DTE) também não foi oxidado pelo acetaldeído sob as mesmas condições acima mencionadas. Baseando-se nestes resultados apresentados, poder-se-ia concluir que a oxidação de tióis observada após o consumo de etanol não está relacionada aos efeitos oxidativos direto do seu metabólito - o acetaldeído. No entanto, de um modo interessante, quando se incubou o acetaldeído com o sobrenadante hepático de camundongos, um notável

efeito oxidativo do acetaldeído em relação ao tióis totais e não-protéicos foi observado. Considerando que a glutatona é a principal molécula sulfidrílica não-protéica no fígado, sua oxidação pelo acetaldeído parece depender dos constituintes hepáticos.

A glutatona-S-transferase (GST) é uma enzima que catalisa a conjugação entre a GSH com compostos xenobióticos, transformando-os em produtos menos tóxicos e mais hidrofílicos os quais podem ser parcialmente metabolizados e excretados (Salinas e Wong, 1999). Esta enzima tem sido apontada como uma importante proteína envolvida na detoxificação de aldeídos endógenos (Chen et al., 2002; Sidell et al., 2003). Considerando a possível importância dos constituintes hepáticos na oxidação da glutatona pelo acetaldeído (ver Figura 12), a contribuição da GST purificada na ocorrência deste fenômeno foi avaliada. A partir dos resultados obtidos, demonstrou-se que o acetaldeído não oxidou a glutatona, tanto na-presença quanto na ausência da GST purificada, sugerindo que o acetaldeído não é um bom substrato para esta enzima.

Algumas questões sem respostas relacionadas a estes dados são: Como o consumo de etanol pode causar a inibição das enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase? Como o metabolismo do acetaldeído pode levar a oxidação da glutatona? Infelizmente, essas questões permanecem parcialmente sem resolução. Entretanto, baseando-se nos resultados apresentados, é adequado excluir a possibilidade de um efeito inibitório direto do acetaldeído sobre as enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase hepáticas.

Um recente trabalho (Anni et al., 2003) demonstrou que o acetaldeído é capaz de reagir com o dipeptídeo sulfidrílico cisteinil-glicina (um produto do metabolismo da glutatona) em condições *in vitro*. Através de estudos de espectroscopia de massa, estes autores observaram que o acetaldeído é capaz de reagir com cisteinil-glicina em uma proporção 1:1, gerando o complexo 2-metil-tiazolidina-4-carbonil-glicina. Além disso, estes autores observaram a presença deste complexo em altas concentrações na bile de ratos tratados com etanol. Tendo em vista que os dados *in vitro* do presente estudo demonstram a necessidade de constituintes hepáticos para o processo de oxidação de tióis não

protéicos pelo acetaldeído, juntamente com os resultados de Anni e colaboradores (2003), é viável apontar para a enzima gama-glutamil-transpeptidase como uma molécula importante para o processo de depleção de tióis induzida pelo acetaldeído. Neste contexto, esta enzima catalisa a clivagem de GSH em cisteinil-glicina, a qual é avidamente conjugada com acetaldeído.

Embora que a maior parte do etanol ingerido seja convertido em acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase no hepatócito (Lieber, 1993), existem outras rotas metabólicas disponíveis para o etanol. Por exemplo, a oxidação do etanol pelas enzimas do sistema microsomal P450 hepático torna-se mais acentuada após grandes ingestões deste composto (Krikun et al., 1984) e esta rota associa-se a uma grande produção de radicais livres (Kuthan e Ulbrich, 1982). Neste sentido, tem-se demonstrado a produção de um radical livre, o radical 1-hidroxietil (HER), a partir da oxidação do etanol pelo sistema microsomal (Albano et al., 1988; Rashba-Step, 1993). Considerando dados que demonstram que o HER inibe a atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase *in vitro* (Puntarulo et al., 1999), o efeito inibitório do HER *in vivo* na atividade destas enzimas antioxidantes não pode ser excluído. Entretanto, estudos adicionais são necessários para a confirmação desta hipótese.

Capítulo 8

CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem apresentar as seguintes conclusões:

- O tratamento diário realizado durante 30 dias com 3 g/kg de etanol causou a diminuição na atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase no fígado de camundongos;
- O tratamento diário realizado durante 30 dias com 3 g/kg de etanol causou a diminuição na atividade da enzima glutathiona peroxidase no fígado de camundongos;
- O tratamento diário realizado durante 30 dias com 3 g/kg de etanol causou a diminuição da concentração de tióis não protéicos;
- O tratamento com o composto antioxidante N-acetilcisteína na dose de 300 mg/kg, administrado uma vez ao dia através de injeções intraperitoneais, foi capaz de reverter os efeitos inibitórios do etanol sobre as atividades das enzimas hepáticas δ -aminolevulinato desidratase e glutathiona peroxidase;
- O tratamento com o composto antioxidante N-acetilcisteína na dose de 300 mg/kg, administrado uma vez ao dia através de injeções intraperitoneais, foi capaz de reverter os efeitos oxidativos do etanol sobre os níveis de tióis não-protéicos hepáticos;

- O tratamento com o composto antioxidante ebselen na dose de 5 mg/kg, administrado uma vez ao dia através de injeções subcutâneas, foi capaz de reverter os efeitos inibitórios do etanol sobre as atividades das enzimas hepáticas δ -aminolevulinato desidratase e glutathione peroxidase;

- O tratamento com o composto antioxidante ebselen na dose de 5 mg/kg, administrado uma vez ao dia através de injeções subcutâneas, foi capaz de reverter os efeitos oxidativos do etanol sobre os níveis de tióis não-protéicos hepáticos;

- O tratamento simultâneo com ambos os compostos antioxidantes, N-acetilcisteína (300 mg/kg, i.p.) e ebselen (5 mg/kg, s.b.), não apresentou efeito aditivo benéfico nos parâmetros bioquímicos analisados;

- Os níveis de tióis hepáticos não protéicos foram positivamente correlacionados com as atividades das enzimas glutathione peroxidase e δ -aminolevulinato desidratase hepáticas;

- As atividades de enzimas cujas funções catalíticas são dependentes da integridade de seus grupamentos selenol (glutathione peroxidase) e tiól (δ -aminolevulinato desidratase) foram regeneradas pelos compostos antioxidantes N-acetilcisteína e ebselen após a intoxicação crônica com etanol;

- Concentrações crescentes de acetaldeído (30, 100 e 300 μ M) não diminuíram a atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase de sobrenadantes hepáticos de camundongos em condições *in vitro*;

- Concentrações crescentes de acetaldeído (30, 100 e 300 μ M) não diminuíram a atividade tiol-peroxidase do ebselen em condições *in vitro*;

- O acetaldeído, na concentração de 300 μM , diminuiu a quantidade de grupamentos sulfidrílicos totais de sobrenadantes hepáticos de camundongos em condições *in vitro*;

- O acetaldeído, nas concentrações de 100 e 300 μM , diminuiu a quantidade de grupamentos sulfidrílicos de fonte não-protéica de sobrenadantes hepáticos de camundongos em condições *in vitro*;

- O efeito oxidativo do acetaldeído em tióis não-protéicos depende de um metabolismo prévio realizado por constituintes hepáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, E.; TOMASI, A.; GORIA-GATTI, L. DIANZANI, M.U. Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. **Chemico-Biological Interactions**, 65, 223-234, 1988.

ALEYNIK, S.I.; LEO, M.A.; ALEYNIC, M.K; LIEBER, C.S. Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 22, 192-196, 1998.

ANDERSON, M.E.; NAGANUMA, A.; MEISTER A.; Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester. **FASEB Journal**, 4, 3251-3255, 1990.

ANNI, H.; PRISTATSKY, P.; ISRAEL, Y. Binding of acetaldehyde to a glutathione metabolite: mass spectrometric characterization of an acetaldehyde-cysteinyglycine conjugate. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 27(10), 1613-21, 2003.

ARTEEL, G.; MARSANO L.; MENDEZ, C.; BENTLEY, F.; MCCLAIN, C. Advances in alcoholic liver disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, vol. 17, nº 4, pp. 625-647, 2003.

ASHAK, K.G.; ZIMMERMAM H.J.; RAY, M.B. Alcoholic liver disease: pathologic, pathogenic, and clinical aspects. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 15, 45-66, 1999.

BAILEY, S.M.; PATEL, V.B.; YOUNG, T.A.; ASAYAMA, K.; CUNNINGHAM, C.C. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 25(5), 726-33, 2001.

BAU, C.H.D. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.7, n.1, p. 183-190, 2002.

BECKER U.; DEIS A.; SORENSEN T.I. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. **Hepatology**, 23, 1025-1029, 1996.

BERMOND II, D.M.; TOSE, H. Consumo de bebidas alcoólicas: interações com o benzeno e outras substâncias de uso ocupacional. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.27, n.2, 2000.

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

BEVAN, D.R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. **Journal of Biological Chemistry**, 225, 2030-2035, 1980.

BIRREL, S. **Compostos antioxidantes**. Disponível em: <www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/.../group31/drugs.htm>. Acesso em 15 jun. 2005.

BOLEDA, M.D.; SAUBI, N.; FARRES, J.; PARES, X. Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 307, 85-90, 1993.

BONDY, S.C.; OROZCO, J. Treatment upon sources of reactive oxygen species in brain and liver. **Alcohol and Alcoholism**, 29, 4, 375-383, 1994.

BORINI, P. Metabolismo de carboidratos, lipídios e purinas em alcoolistas crônicos assintomáticos ou oligossintomáticos. Correlação entre as alterações metabólicas e os testes avaliadores de agressão e disfunção hepática. **Revista de Metabolismo e Nutrição**, 3, 152-160, 1996.

BOSRON, W.F.; EHRIG, T.; LI, T.K. Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. **Seminars of liver disease**, 13, 126-135, 1993.

BOUNEVA, I.; ABOU-ASSI, S.; HEUMAN, D.M.; MIHAS, A.A. Alcoholic liver disease. **Hospital Physicians**, 31-38, 2003.

BOVERIS, A.F.; FRAGA, C.G.; VARSARSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increases chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 277, 534-541, 1983.

BRUCK R.; AEED H.; SHIRIN H.; MATAS, Z.; ZAIDEL, L.; AVNI Y.; HALPERN Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rat against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. **Journal of Hepatology**, 31, 27-38, 1999.

CAMPOS, S.C.; MOREIRA, D.A.; NUNES, T.D.; COLEPICOLO, P.; BRIGAGAO, M.R. Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. **Archives of Oral Biology**, 50 (7), 661-668, 2005.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. Methods in **Enzimology**, 113, 484-499, 1985.

CARNEIRO, H.S. **História da alimentação.** Disponível em: <<http://www.historiadoreletronico.com.br/secoes/faces/html>>. Acesso em 10 jun.2005.

CASCUDO, L.C. **Prelúdio da cachaça. Etnologia, história e sociologia da aguardente no Brasil.** Belo Horizonte, Itatiaia, 1986.

COTGREAVE, I.A.; DUDDY, S.K.; KASS, G.E.; THOMPSON, D.; MOLDEUS, P. Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C. **Biochemical Pharmacology**, 38, 649-656, 1989.

COTGREAVE, I.A.; MORGENSTERN, R.; ENGMAN, L.; AHOKAS, J. Characterization and quantitation of a selenol intermediate in the reaction of ebselen with thiols. **Chemico-Biological Interactions**, 84, 70-77, 1992.

CHEN, J.; SCHENKER, S.; HENDERSON, G.I. 4-hydroxynonenal detoxification by mitochondrial glutathione S-transferase is compromised by

short-term ethanol consumption in rats. **Alcohol and Clinical Experimental Research**, 26, 1252-1258, 2002.

DENEKE, S.M.; FANBURG, E.L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology**, 257, 163-173, 1989.

DI LUZIO, N.R. Prevention for the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants. **Physiologist**, 6, 619-673, 1963.

DUESTER, G.; FARRES, J.; FELDER, M.; HOLMES, S.; HOOG, J.O.; PARES, X. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. **Biochemical Pharmacology**, 58, 389-95, 1999.

DUPONT, I.; LUCAS, D.; CLOT, P.; MÉNEZ, C.; ALBANO, E. Cytochrome P450E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. **Journal of Hepatology**, 28, 564-571, 1988.

EDENBERG, H.J. Regulation of the mamalian alcohol dehydrogenase genes. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology** 64, 295-341, 2000.

EDENBERG, H.J.; BOSRON, W.F. Alcohol dehydrogenase. In: Guenrich FP, editor. **Biotransformation**, New York: Pergamon, p.119-31, 1997.

ELLMAN, G.L. Tissue suphydryl groups. **Archives of Biochemical and Biophysics**, 82, 70-77, 1959.

ENGMAN, L.; HALLBERG, A. Expedient synthesis of ebselen and related-compounds. **Journal of Organic Chemistry**, 54, 2964-2966, 1989.

ENOMOTO, N.; IKEJIMA, K.; BRADFORD, B.U. Role of kupfer cells and gut-derived endotoxins in alcoholic liver injury. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 15, 20-25, 2000.

ESPINA, N.; LIMA, V.; LIEBER, C.S.; GARRO, A.J. In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on methylguanine transferase. **Carcinogenesis**, 9, 761-766, 1998.

FAMY, C.; STREISSGUTH, A.P.; UNIS, A.S. Mental illness in adults with fetal alcohol syndrome or fetal alcohol effects. **American Journal of Psychiatry**, 155, 552-554, 1998.

FANG, J.L.; VACA, C.E. Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. **Carcinogenesis**, 18, 627-632, 1997.

FARINA, M.; FRIZZO, M.E.S.; SOARES, F.A.A.; SCHAWALM, F.D.; DIETRICH, M.O.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slice from adult mice. **Toxicology Letters**, 144, 351-357, 2003a.

FARINA, M.; OAHM, K.C.S.; SCHAWALM, F.D.; BRUSQUE, A.M.; FRIZZO, M.E.S.; ZENI, G.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. Methylmercury increase glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by

cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. **Toxicological Sciences**, 73, 135-140, 2003b.

FARINA, M.; SOARES, F.A.; ZENI, G.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. **Toxicology Letters**, 146, 227-235, 2004.

FERNANDEZ-CHECA, J.C.; HIRANO, T.; TSUKAMOTO, H.; KAPLOWITS, N. Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. **Alcohol**, 10 (6), 469-475, 1993.

FLORA, G.J.S.; SETH, P.K. Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead-ethanol administration in mice. **Alcohol**, 18, 103-108, 1999.

FRAENKEL-KONRAD, J.; SINGER, G. Nucleoside adducts are formed by cooperative reaction of acetaldehyde and alcohols: a possible mechanism in carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, 85, 3959-3961, 1988.

GALLY A.; PRICE, D.; CRABB, D. High-level expression of rat class I alcohol dehydrogenase is sufficient for ethanol-induced fat accumulation in transduced HeLa cells. **Hepatology**, 29, 1164-1170, 1999.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W. **Goodman & Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996, p. 1436.

GONZALES, J.; MUNOZ, M.E.; COLLADO, P.S.; FERMOSO, J.; ESTELLER, A. Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione metabolism in the rat. **Alcohol**, 5, 103-106, 1988.

GREGHI, M.; GREGHI, C. **Interações medicamentos e etanol**. Disponível em: <<http://www.hurnp.uel.br/farmacologia/IntMed/medalc.html>>. Acesso em 03 jun. 2005.

HALLIWEL, B. Oxidants and human disease, some new concepts. **FASEB Journal**. 1, 358-364, 1987.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, 49, 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and Medicine**, 2° ed. Oxford university, Oxford, 1989.

HANZEL, C.E.; VILLAVERDE, M.S.; VERSTRAETEN, S.V. Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium (III) hydroxide. **Toxicology**, 207, 501-510, 2005.

HASA, M.Z.; SETH, T.D. Effect of lead and zinc administration on liver, kidney and brain levels of copper, lead, manganese and zinc on erythrocyte ALA-D activity in rats. **Toxicology Letters**, 7, 353-358, 1981.

HAYASHI, M.; SLATTER, T.F. Inhibitory effect of ebselen on lipid peroxidation in rat liver microsomes. **Free Radical Research Communication**, 2, 179-185, 1986.

HOLFORD, N.H.G. Clinical pharmacokinetics of ethanol. **Clinical Pharmacokinetics**, 13, 273-92, 1987.

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

ISRAEL, Y.; HURWITZ, E.; NIEMELA, O.; ARNON, R. Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, 83, 7923-7927, 1986.

JAFFE, E.K. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. **Journal of Bioenergetic Biomembranes**, 27, 169-179, 1995.

JARVELAINEN, H.A.; FANG, C.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; LINDROS, K.O. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. **Hepatology**, 29, 1503-1510, 1999.

JOKELAINEN, K.; PARKKILA, S.; SALASPURO, M.; NIEMELÄ, O. Covalent adducts of proteins with acetaldehyde in the liver as a result of

acetaldehyde administration in drinking water. **Journal of Hepatology**, 33, 926-912, 2000.

KELLY, S.J.; DAY, N.; STREISSGUTH A.P. Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. **Neurotoxicology Teratology**, 22, 143-149, 2000.

KOCH, O.R.; PANI, G.; BORRELLO, S.; COLAVITTI, R.; CRAVERO, A.; FARRÈ, S.; GALEOTTI, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. **Molecular Aspects of Medicine**, 25, 191-198, 2004.

KONO, H.; ARTEEL, G.E.; RUSYN, I.; SIES, H.; THURMAN, R.G. Ebselen prevents early alcoholic-induced liver injury in rats. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 30, 403-411, 2001.

KRIKUN, G.; LIEBER, C.S.; CEDERBAUM, A.I. Increased microsomal oxidation of ethanol by cytochrome P-450 and hydroxyl radical-dependent pathways after chronic ethanol consumption. **Biochemical Pharmacology**, 33, 3306-3309, 1984.

KUTHAN, H.; ULBRICH, V. Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P-450 monooxygenase system. **European Journal of Biochemistry**, 126, 583-588, 1982.

KRISHNA, M.C.; RUSSO, A.; MITCHELL, J.B.; GOLDSTEIN, S. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of superoxide or as superoxide dismutase mimics? **Journal of Biological Chemistry**, 271, 26026-26031, 1996.

LAMARCHE, F.; SIGNORINI-ALLIBE, N.; GONTHIER, B.; BARRET L. Influence of vitamin E, sodium selenite, and astrocyte-conditioned medium on neuronal survival after chronic exposure to ethanol. **Alcohol**, 33, 127-138, 2004.

LAUTERBERG, B.H.; DAVIES, S.; MITCHELL, J.R. Ethanol supresses hepatic glutathione synthesis in rats *in vivo*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, 230, 7-11, 1984.

LAUTERBURG, B.H.; CORCORAN G.B.; MITCHELL J.R. Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats *in vivo*. **Journal of Clinical Investigation**, 71, 980-991, 1983.

LI, T.K.; YIN, S.J.; CRABB, D.W. Genetic and environmental influences on alcohol metabolism in human. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 25, 136-144, 2001.

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

LIEBER, C. Metabolism and Metabolic Effects of alcohol. **Seminars in Hematology**, vol. 17, n° 2, 1980.

LIEBER, C.S. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. **Baillieres Clinical Gastroenterology**, 7(3), 581-608, 1993.

LIEBER, C.S. Alcohol and the liver. **Gastroenterology**, 106, 1085-1105, 1994.

LIEBER, C.S. Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients, **Annals Review Nutrition**, 20, 395-430, 2000.

LIEBER, C.S. Biochemical and molecular basis of alcohol induced injury to liver and other tissues. **New England Journal of Medicine**, 319, 25, 1639-1650, 1988.

LIEBER, C.S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. **Clinical Chemical Acta**, 257, 59-84, 1997.

LIEBER, C.S. Hepatic, metabolic, and nutritional disorders of alcoholism: from pathogenesis to therapy. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 37, 551-584, 2000.

LIEBER, C.S. Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanisms and management. New York: Plenum Press, p.579, 1992.

LIEBER, C.S. Metabolic effects of acetaldehyde. **Biochemical Society Transactions**, 16 (3), 241-247, 1998.

LIEBER, C.S.; DECARLI L.M. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: in vitro characteristics and adaptative properties in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, 245, 2505-2512, 1970.

LIMURO, Y.; GALLUCCI, R.M.; LUSTER, M.; KONO, H.; THURMAN, R.G. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. **Hepatology**, 26, 1530-1537, 1997.

LIN, R.C.; SMITH, R.S.; LUMENG, L. Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically. **Journal of Clinical Investigation**, 81,615-619, 1988.

LIN, R.; LUMENG, L.; SHAHIDI, S.; KELLY, T.; POUND, D.C. Protein-acetaldehyde adducts in serum of alcoholic patients. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 14, 438-443, 1990.

LOMAESTRO, B.M.; MALONE, M. Glutathione in health and disease pharmacotherapeutic issues. **American Pharmacotherapeutic**, 29, 1263-1273, 1995.

LOPES, C.S.; SICHIERI, R. Estudo caso-controle sobre distúrbios psiquiátricos e com álcool como fatores de risco para padrão de abuso de drogas. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n.6, p. 1571-1575, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, 1955.

MAIORINO, M.; ROVERI, A.; COASSIN, M.; URSINI, F. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). **Biochemical and Pharmacology**, 37, 2267-2271, 1988.

MERCURIO, S.D.; COMBS, G.F. JR. Synthetic seleno-organic compound with glutathione peroxidase-like activity in the chick. **Biochemical Pharmacology**, 35, 4505-4509, 1986.

MASALKAR, P.D.; ABHANG, S.A. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. **Clinical Chemical Acta**, 355, 61-65, 2005.

MCCALL, K.E.L.; MOORE, M.R.; THOMPSON, G.G.; GOLDEBERG, A. Abnormal haem biosynthesis in chronic alcoholics. **European Journal of Clinical Investigation II**, 461-468, 1981.

McCORD, J.M. Human disease, free radical, and the oxidant/antioxidant balance. **Clinical Biochemistry**, 26, 351-357, 1993.

MEAGER, E. A.; BARRY, O.P.; BURKE, A.; LUCEY, M.R.; LAWSON, J.A.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G.A. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. **Journal of Clinical Medicine**, 133, 451-460, 1999.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biological Chemistry**, 263, 17205-17208, 1988.

MINAYO, M.C.S.; DESLANDES, S.F. A complexidade das relações entre drogas, álcool e violência. **Caderno de Saúde Pública**, v.14, n.1, p.35-42, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. A política do Ministério da Saúde para a Atenção Integral a Usuários de Álcool e outras Drogas, Brasília, p.55, 2003.

MOLINA, M.F.; SANCHEZ-REUS, I.; IGLESIAS, I.; BENEDI, J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. **Biological and Pharmacology Bulletin**, 26, 1398-1402, 2003.

MULLER, A.; CADENAS, E.; GRAF P.; SIES, H. A novel biologically active seleno-organic compound glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochemical Pharmacology**, 33, 3235-3239, 1984.

NIEMELÄ, O.; KLAJNER, F.; ORREGO, H.; VIDINS, E.; BLENDIS, L.; ISRAEL, Y. Antibodies against acetaldehyde-modified protein epitopes in human alcoholics. **Hepatology**, 7, 1210-1214, 1987.

NIEMELÄ, O. Aldehyde-protein adducts in the liver as a result of ethanol-induced oxidative stress. **Frontiers in Biosciences**, 4, 506-513, 1999.

NIEMELÄ, O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, 31, 1533-1538, 2001.

NORBERG, A.; JONES, A.W.; HAHN, R.G.; GABRIELSSON, J.L. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics. **Clinical of Pharmacokinetics**, 42 (1), 1-31, 2003.

OSTROWSKA, J.; LUCZAJ, W.; KASACKA, I.; ROZANSKI, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. **Alcohol**, 32, 25-32, 2004,

OZARAS, R.; TAHAN, V.; AYDIN, S.; UZUN H.; KAYA, S.; SENTURK, H. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rat. **World Journal of Gastroenterology**, 9, 791-794, 2003.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, 70, 158-169, 1967.

PARNHAM, M.J.; KINDT, S. A novel biologically active seleno-organic compound III. Effect of PZ 51 (Ebselen) on glutathione peroxidase and secretory activities of mouse macrophages. **Biochemical Pharmacology**, 33, 3247-3250, 1984.

PARNHAM, M.J.; LEYCK, S.; KUHL, P.; SCHALKEWIJK, J.; VAN DEN BERG, W.B. Ebselen: a new approach to the inhibition of peroxide dependent inflammation, **International Journal of Tissue Reactions**, 9, 45-50, 1987.

PEROTTONI, J.; LOBATO, L.P.; SILVEIRA, A.; ROCHA, J.B.; EMANUELLI, T. Effects of mercury and selenite on delta-aminolevulinate

dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. **Environmental Research**, 95 (2), 166-173, 2004.

PÖSCHL, G.; SEITZ, H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol & Alcoholism**, v.39, n.3, p.155-165, 2004.

PUNTARULO, S.; STOYANOVSKY, D.A.; CEDERBAUM, A.I. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 15, 372, 355-359, 1999.

PUSHPAKIRAN G.; MAHALAKSHMI, K.; ANURADHA, C.V. Protective effects of taurine on glutathione and glutathione-dependent enzymes in ethanol-fed rats. **Pharmazie**, 59 (11), 869-72, 2004.

PRITSOS, C.A.; SOKOLOFF, M.; GUSTAFSON, D.L. PZ 51 (Ebselen) in vivo protection against adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. **Biochemical Pharmacology**, 44, 839-841, 1992.

RAMCHANDANI, V.A.; BOSRON, W.F.; LI, T.K. Research advances in ethanol metabolism. **Pathologie- Biologie**, 49, 676-82, 2001.

RASHBA-STEP, J.; TURRO, N.J.; CEDERBAUN, A.I. Increased NADPH e NADPH-dependent production of superoxide and hydroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 300, 401-408, 1993.

REINKE, L.A.; KOTAKE Y.; McCOY, P.B.; JANZEN, E.G. Spin trapping studies of hepatic free radicals formed following acute administration of

ethanol to rats: in vivo detection of 1-hydroxyethyl radicals with PBN. **Free Radical Biology and Medicine**, 11, 31-39, 1991.

ROTH, J.L. Histórico do álcool. Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/drogas/alcool.php>>. Acesso em 13 jun.2005.

SALINAS, A.E.; WONG, M.G. Glutathione S-transferases - a review. **Current Medicine Chemistry**, 6, 279-309, 1999.

SALMINEN, W.F. Jr.; VOELLMY, R.; ROBERTS, S.M. Effect of N-acetylcysteine on heat shock protein induction by acetaminophen in mouse liver. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, 286, 519-524, 1998.

SANCHIS-SEGURA, C.; MIQUEL, M.; CORREA, M.; ARAGON, C.M.G. The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity. **Alcohol**, v.19, n.1, p.37-42, 1999.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, 28, 133-145, 1982.

SCHOEDEL, K.A.; SELLERS E.M.; TYNDALE, R.F. Induction of CYP 2B1/2 and nicotine metabolism by ethanol in rat liver but not rat brain. **Biochemical Pharmacology**, 62, 1025-1036, 2001.

SHAW, S. Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p. 541-547, 1989.

SIEG, I.; DOSS, M.O.; KANDELS, H.; SCHNEIDER, J. Effect of alcohol on δ -aminolevulinic acid dehydratase and porphyrin metabolism in man. **Clinica Chimica Acta**, 202, 211-218, 1991.

SIES, H. **Antioxidant in Disease Mechanism and therapy- advances in pharmacology**. v.38. California: Academic Press, p.707, 1997.

SIDELL, K.R.; MONTINE, K.S.; PICKLO, M.J.S.R.; OLSEN, S.J.; AMARNATH, V.; MONTINE, T.J. Mercapturate metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal in rat and human cerebrum. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 62, 146-153, 2003.

SILER-MARSIGLIO, K.I.; SHAW, G.; HEATON, M.B. Pycnogenol and vitamin E inhibit ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. **Journal of Neurobiology**, 59, 261-271, 2004.

SILVA, L. **O antigo costume de beber.** Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/material/tis/curr-bio/trab99/alcool/hist.html>>. Acesso em 12 abr.2005.

SIVARAM, A.G.; SURESH, M.V.; INDIRA, M. Combined effect of ascorbic acid and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 134, 397-401, 2003.

SOOD, C.; O'BRIEN, P.J.; Molecular mechanisms of chloroacetaldehyde-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, 46, 1621-1626, 1993.

SORELL, M.F.; TUMA, D.J. The functional implications of acetaldehyde binding to cell constituents. **Annual New York Academic Sciences USA**, 492, 50-62, 1987.

SPEISKY, H.; McCDONALD, A.; GILES, G.; ORREGO, H.; ISRAEL, Y. Increased loss and decrease synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. **Biochemical Journal**, 225, 565-573, 1985.

TAERES, J.P.; GREENFIELD, S.M.; WATSON, D.; PUNCHARD, N.A.; MILLER, C.A. Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol. **Gut**, 35, 1644-1647, 1994.

TOBOREK, M.; HENNIG B. Fatty acid-mediated effect on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cell. **American Journal of Clinical Nutrition**, 59, 60-65, 1994.

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

VENDEMIALE, G.; GRATAGLIANO, L.; SIGNOLE, A.; ALLOMARE, E. Ethanol-induced changes of intracellular thiol compartmentation and protein redox status in the rat liver: effect of tauroursodeoxycholate. **Journal of Hepatology**, 28, 46-53, 1998.

VINA, J.; ESTRELA, J.M.; GUERRI, C.; ROMERO, F.J. Effects of ethanol on glutathione concentrations in isolated hepatocytes. **Biochemical Journal**, 88, 549-552, 1980.

WANG, J.F.; KOMAROV, P.; SIES, H. DE GROOT, H. Inhibition of superoxide and nitric oxide release and protection from reoxygenation injury by Ebselen in rat Kupffer cells. **Hepatology**, 15, 1112-1116, 1992.

WILSON, S. R.; ZUCKER, P. A.; HUANG, R. R. C.; SPECTOR, A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. **Journal of the American Chemical Society**. **111**, 5936–5939, 1989.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods enzymology**, 77, 325-333, 1981.

WILKINSON, P.K.; SEDMAN, A.J.; SAKMAR, E.; KAY, D.R.; WAGNER, J.G. Pharmacokinetics of ethanol after oral administration in the fasting state. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, 5, 207-214, 1977.

YANG, S.C.; HUANG, C.C.; CHU, J.S.; CHEN, J.R. Effects of beta-carotene on cell viability and antioxidant status of hepatocytes from chronically ethanol-fed rats. **Brasilian Journal of Nutrition**, 92, 209-215, 2004.

ZHAO, R.; HOLMEGREN, A. A novel antioxidant mechanism of ebselene involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Journal of Biological Chemistry**, 277, 39456-39462, 2002.

ZHAO, R.; MASAYASU, H.; HOLMEGREN, A. Ebselen a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase

activity and superfast thioredoxin oxidant. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, 99, 8579-8584, 2002.

ZIMATKIN, S.M.; LIOPO, A.V.; DIETRISCH, R.A. Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 22, 1623-1627, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1**Ethanol inhibits δ -aminolevulinate dehydratase and glutathione peroxidase activities in mice liver: protective effects of ebselen and N-acetylcysteine**

Lucinéia A. Pivetta¹; Romaiana P. Pereira¹; Marcelo Farinon¹; Andreza F. de Bem¹; Juliano Perottoni¹; Júlio C. Soares¹; Marta M.F. Duarte¹; Gilson Zeni¹; João B.T. Rocha¹; Marcelo Farina^{1,2*}

¹ Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil.

* Corresponding author: Farina, M.

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail: marcelofarina@zipmail.com.br

Telephone: + 55 48 331 6919

FAX: + 55 48 331 9672

Abstract

Changes in sulfhydryl status have been shown to be involved with the ethanol-induced hepatotoxicity. In addition, evidence shows the importance of replenishing thiols in patients with alcoholic liver disease. This study was undertaken to examine the possible beneficial effects of the individual and simultaneous treatments with two antioxidant drugs (N-acetylcysteine and ebselen) against ethanol-induced changes in thiol status, as well as on the activities of δ -aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) and glutathione peroxidase (GPx) in mice liver. Daily ethanol administrations (3 g ethanol/kg, by gavage) decreased liver nonprotein thiols (NPSH) concentration after 30 days of treatment and N-acetylcysteine (300 mg/kg once a day, i.p.) or ebselen (5 mg/kg once a day, subcutaneously) treatment restored this variable to control levels. However, additive beneficial effects concerning NPSH levels were not observed after the simultaneous administration with both drugs. While liver GPx and δ -ALA-D activities were inhibited by ethanol exposure and these inhibitions were significantly blunted by N-acetylcysteine or ebselen treatment, the simultaneous administration with both drugs did not show additive beneficial effects in relation to the enzymes' activities. NPSH levels were positively correlated with GPx and δ -ALA-D activities. The results presented herein show that ebselen and N-acetylcysteine alone are able to restore ethanol-induced thiols as well as the inhibition of hepatic enzymes whose catalytic functions depend on their thiol (δ -ALA-D) and selenol (GPx) groups.

Key words: Ethanol, mice, ebselen, N-acetylcysteine, thiol status.

1. Introduction

Chronic ethanol consumption is associated with increased incidence of a great variety of diseases (Chari and Gupta, 2003). Of particular importance, liver is an important target organ for the toxic effects of ethanol (Kono et al., 2001; Nagy, 2004). Although the pathogenesis of ethanol-induced liver damage is not completely understood, it is well known that oxidative stress represents an imperative issue contributing to ethanol hepatotoxicity (Boveris et al., 1983; Jaeschke et al., 2002).

Thiol depletion has been pointed as a key phenomenon in ethanol-induced oxidative stress (Lieber, 1997). Indeed, ethanol impairs thiol and protein redox status and these alterations seem to depend on acetaldehyde, a highly reactive ethanol metabolite (Vendemiale et al., 1998). In this regard, it has been evidenced that chronic ethanol intake causes inhibition of liver thiol-containing enzymes, such as δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) (Flora and Seth, 1999). Moreover, although the details of the underlying mechanism remain unclear, ethanol also inhibits the activity of glutathione peroxidase (GPx) (Ozaras et al., 2003), an enzyme whose ionized selenol of a selenocysteine residue is crucial for its catalytic function.

N-acetylcysteine (NAC) is an important antioxidant drug that acts as precursor of glutathione (GSH), the most important thiol compound involved in the cellular detoxification (Meister and Anderson, 1983). Since acetaldehyde can react with thiol groups from GSH (Shaw et al., 1979), experimental studies have shown the ability of NAC to protect against ethanol-induced toxicity (Ozaras et al., 2003).

Ebselen, 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one, is a seleno-organic compound that mimics the GSH-dependent, hydroperoxide reducing activity of GPx (Müller et al., 1984). It protects rat liver against ischemia-reperfusion, and alcohol-induced injuries (Ozaki et al., 1997; Kono et al., 2001). Although ebselen have been shown to possess several different protective mechanisms against oxidative injury (Cotgreave et al., 1989; Parnhan and Sies, 2000; Kono et al.,

2001), the presence of a nucleophilic group (selenol group of ebselen selenol metabolite) seems to be essential for its antioxidant properties.

Taking into account the pro-oxidative properties of ethanol and acetaldehyde toward thiol groups, we tested whether NAC and/or ebselen attenuate ethanol-induced changes in thiol status (nonprotein thiol levels) and in the activities of enzymes whose thiol (δ -ALA-D) and selenol (GPx) groups are critical for their catalytic functions. The chosen drugs' combination was due to the fact that the individual uses of NAC (Lopez et al., 1991; Ozaras et al., 2003) or ebselen (Oshita et al., 1994; Kono et al., 2001) have been shown to possess beneficial effects against ethanol-induced toxicity. In addition, studies on the simultaneous administration of NAC and ebselen against oxidative damage have pointed to additive beneficial effects when compared to the individual administrations (Pritsos et al., 1992).

2. Material and Methods

2.1. *Chemicals*: 5-aminolevulinic acid, 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic) acid, zinc chloride and p-dimethylaminobenzaldehyd were obtained from Sigma (St. Louis, Mo., USA). Ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazole-3(2H)-one) was synthesized based on Engman and Hallberg (1989). All other chemicals were of the highest grade available commercially.

2.2. *Animals*: Male *Swiss albino* mice, 2 months old, from our breeding colony and weighing about 30 g were maintained in an air-conditioned room (20-25°C) under natural lighting conditions with water and food (Supra, Ribeirão Preto, SP, Brazil) *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the guiding principles in the use of animals in toxicology, adopted by the Society of Toxicology in July 1989.

2.3. *Treatment*: Mice were divided into two groups (control and ethanol-treated groups) with 24 animals each. Ethanol-treated mice were given an ethanol:water solution (1:3 v/v) allowing for a single daily administration (by gavage) of 11.0 mL/kg and its dose (3 g ethanol/kg) was based on Schoedel et al., 2001. Control group received an isocaloric solution by the same administration route, except that ethanol was substituted by equally caloric amounts of glucose. For ebselen administration, the compound was dissolved in 10% tween to allow for a single daily subcutaneous injection, 5 mL/kg and its dose (5 mg/kg) was based on previous studies from our group (Farina et al., 2003a,b). For NAC administration, the compound was dissolved in phosphate potassium buffer (50mM, pH 7.0) to allow for a single daily intraperitoneal injection, 5 mL/kg and its dose (300 mg/kg) was based on Salminen et al., 1998. The injected solutions were prepared daily, 10 to 30 minutes before the administration in order to avoid chemical alterations. Each group (control and ethanol) was divided into 4 subgroups (I-IV) with 6 animals each. Subgroup I (control) received a single daily subcutaneous injection of 10% tween (5 mL/kg) plus a single intraperitoneal injection of phosphate potassium buffer – 50 mM, pH 7.0 (5 mL/kg); subgroup II (NAC) received a single daily subcutaneous injection of 10% tween (5 mL/kg) plus a

single intraperitoneal injection of NAC (300 mg/kg) dissolved in phosphate potassium buffer – 50 mM, pH 7.0 (5 mL/kg); subgroup III (ebselen) received a single daily subcutaneous injection of ebselen (5 mg/kg) dissolved in 10% tween (5 mL/kg) plus a single intraperitoneal injection of phosphate potassium buffer – 50 mM, pH 7.0 (5 mL/kg); and subgroup IV (ebselen + NAC) received a single daily subcutaneous injection of ebselen (5 mg/kg) dissolved in 10% tween (5 mL/kg) plus a single intraperitoneal injection of NAC (300 mg/kg) dissolved in phosphate potassium buffer – 50 mM, pH 7.0 (5 mL/kg). Treatment period was thirty days. For additional treatment details, see Table 1.

2.4. Tissue preparation: Twenty four hours after the last administration, mice were killed by decapitation and livers were quickly removed, placed on ice and homogenized in 8 volumes of a 150 mM NaCl solution. The obtained homogenates were centrifuged at 4000 x g at 4°C for 10 min to yield a low speed supernatant, which was used for the measurements of nonprotein thiols (NPSH) and for δ -ALA-D and GPx activities.

2.5. δ -ALA-D assay: δ -ALA-D activity was assayed by the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation. δ -ALA (2.5 mM) and 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4 were used. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

2.6. GPx activity: GPx activity was measured by the method of Paglia and Valentine (1967). In short, an aliquot of liver homogenate supernatants (200–250 μg protein) was added to the assay mixture (total volume=1 ml) and the reaction started by the addition of 0.1 ml of 4 mM H_2O_2 to give a final concentration of 0.4 mM. Conversion of NADPH to NADP^+ was monitored continuously at 340 nm for 5 min. GPx activity was expressed as nmol of NADPH oxidized to NADP^+ per minute per mg protein of tissue homogenate supernatant, using an extinction coefficient 6.22×10^6 for NADPH.

2.7. Nonprotein thiols levels: Nonprotein thiols (NPSH) determination was based on a previous study from our group (Farina et al., 2004). In short, 500 μ l of 10% trichloroacetic acid were added to 500 μ l of hepatic supernatants. After centrifugation ($4000 \times g$ at 4°C for 10 min), the protein pellet was discarded and free sulfhydryl groups (-SH) were determined in the clear supernatant (which was previously neutralized with 0.1 M NaOH) by the method of Ellman, 1959.

2.8. Protein determination: Protein was measured by the method of Lowry (1951) using serum albumin as standard.

2.9. Statistical analysis: All data are represented as mean \pm SEM (n = 6 animals per group). Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Duncan's Multiple Range Test when *p* value was less than 0.05. Two-tailed Pearson's correlations were performed to identify possible correlations between some analyzed parameters. In addition, a three-way analysis of variance was performed to detect the possible existence of ebselen x NAC x ethanol interactions.

3. Results

The individual and simultaneous treatments with ethanol, ebselen and/or NAC did not change mice body weight gains (data not shown). Ethanol administration caused a significant decrease in hepatic NPSH levels (Fig 1). However, ebselen or NAC alone restored this parameter to control levels and the simultaneous treatment with NAC and ebselen did not present additive beneficial effects toward liver NPSH when compared to the individual administration with both drugs.

Figure 2 and 3 depict the effects of ethanol, ebselen and/or NAC on the activities of hepatic δ -ALA-D and GPx, respectively. Ethanol intake inhibited the activities of both enzymes and ebselen or NAC alone restored their activities to control levels. However, the simultaneous treatment with NAC and ebselen did not present additive beneficial effects toward liver δ -ALA-D and GPx activities when compared to their individual administrations. In addition, Pearson's correlation showed significant correlations between liver NPSH and GPx activity (Pearson coefficient = 0.365; $p = 0.02$) and between liver NPSH and δ -ALA-D activity (Pearson coefficient = 0.568; $p < 0.01$).

4. Discussion

There is a growing body of evidence indicating that oxidative stress is a central phenomenon linked to ethanol-induced toxicity (Boveris et al., 1983; Jaeschke et al., 2002). In this regard, molecules with antioxidant properties such as flavonoids (Molina et al., 2003), vitamin E (Siler-Marsiglio et al., 2004), and ascorbic acid (Sivaram et al., 2003) have been shown to be protective against the deleterious effects of ethanol. Since ethanol intake leads to the oxidation of endogenous thiols, sulfhydryl-containing compounds have also presented beneficial effects in alcoholic damage (Ozaras et al., 2003). Our results showed that both NAC and ebselen alone prevents against ethanol-induced depletion of liver nonprotein thiols (NPSH) levels, as well as ethanol-induced inhibition of liver GPx and δ -ALA-D activities.

From a molecular point of view, these are interesting data. In fact, it has been reported that δ -ALA-D inhibition is due to the oxidation of sulfhydryl groups located at its active center (Rocha et al., 1995; Farina et al., 2001; Farina et al., 2003c; Nogueira et al., 2003). Since acetaldehyde (a highly reactive ethanol metabolite) reacts with thiol groups (Shaw et al., 1979, Anni et al., 2003), ethanol administration exposure led to liver δ -ALA-D inhibition in our protocol of intoxication, suggesting oxidation of enzyme's sulfhydryl groups. In addition, ethanol decreased liver NPSH levels and a positive significant correlation was observed between liver NPSH and δ -ALA-D activity, reinforcing the idea that ethanol-induced liver δ -ALA-D inhibition is related to thiol oxidation. Considering that NAC is a precursor of GSH (the major intracellular nonprotein thiol) and that GSH prevents δ -ALA-D inhibition under pro-oxidative conditions (Barbosa et al., 1998), the protective effect of NAC against ethanol-induced liver δ -ALA-D inhibition was a predictable phenomenon.

Liver GPx was also inhibited by ethanol intake and this inhibitory effect was blunted by NAC co-exposure. Our results cannot explain the molecular mechanism by which NAC prevents ethanol-induced GPx inhibition. Anyway,

one could assume a direct chemical interaction between sulfhydryl groups (from either NAC, GSH or a possible GSH metabolite) with acetaldehyde, avoiding its interaction with nucleophilic groups from proteins. In this regard, thiol compounds have been evaluated as sequestering agents for metabolic generated acetaldehyde during the oxidation of ethanol *in vivo* (Nagasawa et al 1978). In addition, an elegant study of Anni and collaborators (2003) was able to characterize the formation of an acetaldehyde-cysteinylglycine conjugate, which is formed by the direct interaction between acetaldehyde and cysteinylglycine, a GSH metabolite.

Another important observed phenomenon was the ability of ebselen to protect against the above-mentioned effects of ethanol on liver NPSH levels and GPx and δ -ALA-D activities. As already mentioned, the catalytic functions of δ -ALA-D and GPx depend on their thiols and selenols groups, respectively; and ethanol (or metabolic generated acetaldehyde) seems to inhibit these enzymes by interacting with their nucleophilic groups. A not-answered question about these data is: How can ebselen (a non-thiol-containing compound) to protect against ethanol induced inhibition of liver GPx and δ -ALA-D activities? To the best of our knowledge, there is not data in the literature showing the direct effect of ebselen as a reducing agent. In fact, conversely to NAC and GSH, ebselen does not possess a direct reductive role in the redox cycling of oxidizable endogenous nucleophilic (thiol or selenol) groups. However, the antioxidant action of ebselen involves ebselen selenol formation and evidence show that this phenomenon depends on the thioredoxin system rather than glutathione as the predominant effector and target (Zhao et al., 2002; Zhao and Holmgren, 2002). In addition, selenols have been shown to be good nucleophiles (Sugiura et al., 1978) and the reduction of a disulfide to thiols is catalyzed by selenols (Singh and Kats, 1995). So, the protective role of ebselen in preventing ethanol-induced liver GPx and δ -ALA-D inhibitions could be linked, at least in part, to a direct reductive role of ebselen selenol.

It has been reported the additive beneficial effect of the simultaneous administrations of NAC and ebselen against oxidative damage when compared to

their individual administrations (Pritsos et al., 1992). In this regard, NAC can act as an electrons donor in the catalytic cycle for the reduction of peroxides by ebselen (Cotgreave et al., 1987). In our study, the concomitant administration of ebselen and NAC had no additive beneficial effects against ethanol-induced NPSH depletion and inhibition of GPx and δ -ALA-D activities when compared to the individual treatment with both drugs. Taking into account the complete restoration of these variables to control levels after the individual treatments and the rigid control of cellular thiol/disulfide homeostasis, the absence of the above-mentioned additive beneficial effects was expected.

In summary, the present results reinforce the idea that depletion of endogenous thiols is an important mechanism of ethanol-induced hepatotoxicity. In addition, they show that ebselen and NAC alone are able to restore ethanol-induced depletion of thiols and inhibition of GPx and δ -ALA-D activities in mice liver. To the best of our knowledge, this is the first study showing the ability of ebselen to restore the activity of partially inhibited enzymes whose catalytic functions depend on their thiol (δ -ALA-D) and selenol (GPx) groups.

Acknowledgements: M. Farinon was recipient of a FAPERGS fellowship (N° 03/51042.6). R.P. Pereira was recipient of a FIPE fellowship (N° 15896).

References

- Anni, H., Pristatsky, P., Israel, Y., 2003. Binding of acetaldehyde to a glutathione metabolite: mass spectrometric characterization of an acetaldehyde-cysteinylglycine conjugate. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 27, 1613-1621.
- Barbosa, N.B., Rocha, J.B., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A.L., 1998. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 243-253.
- Boveries, A.F., Fraga, C.G., Varsarsky, A.I., Koch, O.R., 1983. Increases in chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227, 534-541.
- Chari, S., Gupta, M., 2003. Status of blood antioxidant enzymes in alcoholic cirrhosis. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 47, 343-346.
- Cotgreave, I.A., Duddy, S.K., Kass, G.E., Thompson, D., Moldeus, P., 1989. Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen. Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C. *Biochem. Pharmacol.* 38, 649-656.
- Cotgreave, I.A., Sandy, M.S., Berggren, M., Moldeus, P.W., Smith, M.T., 1987. N-acetylcysteine and glutathione-dependent protective effect of PZ51 (Ebselen) against diquat-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2899-2904.
- Ellman, G. L., 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Engman, L., Hallberg, A., 1989. Expedient synthesis of ebselen and related-compounds. *J. Org. Chem.* 54, 2964-2966.
- Farina, M., Folmer, V., Bolzan, R.C., Andrade, L.H., Zeni, G., Braga, A.L., Rocha, J.B., 2001. Selenoxides inhibit delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol. Lett.* 119, 27-37.
- Farina, M., Frizzo, M.E.S., Soares, F.A.A., Schwalm, F.D., Dietrich, M.O., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Souza, D.O., 2003a. Ebselen protects against

- methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol. Lett.* 144, 351-357.
- Farina, M., Dahm, K.C.S., Schwalm, F.D., Brusque, A.M., Frizzo, M.E.S., Zeni, G., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2003b. Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. *Toxicol. Sci.* 73, 135-140.
- Farina, M., Brandão, R., Lara, F.S., Soares, F.A., Souza, D.O., Rocha, J.B., 2003c. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol. Lett.* 139, 55-66.
- Farina, M., Soares, F.A., Zeni, G., Souza, D.O., Rocha, J.B., 2004. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. *Toxicol. Lett.* 146, 227-235.
- Flora, G.J.S., Seth, P.K., 1999. Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead-ethanol administration in mice. *Alcohol.* 18, 103-108.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65,166-176.
- Kono, H., Arteel, G.E., Rusyn, I., Sies, H., Thurman, R.G., 2001. Ebselen prevents early alcohol-induced injury in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 403-411.
- Lieber, C.S., 1997. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta.* 257, 59-84
- Lopez, R.A., Tornwall, M.S., Henagan, J.M., Smith, G.S., Miller, T.A., 1991. N-acetyl-cysteine: protective agent or promoter of gastric damage? *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 197, 273-278.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1955. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711-760.

- Molina, M.F., Sanchez-Reus, I., Iglesias, I., Benedi, J., 2003. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* 26,1398-1402.
- Muller, A., Cadenas, E., Graf, P., Sies H., 1984. A novel biologically active seleno organic compound glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* 33, 3235-3239.
- Nagasawa, H.T., Goon, D.J.W., DeMaster E., 1978. 2,5,5-Trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a D(-)-penicillamine-directed pseudometabolite of ethanol. Detoxication mechanism for acetaldehyde. *J. Med. Chem.* 21, 1274-1279.
- Nagy, L.E., 2004. Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 55-78.
- Nogueira, C.W., Soares, F.A., Nascimento, P.C.,Muller, D., Rocha, J.B.T., 2003. 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury-and cadmium-induced inhibition of delta-aminolevulinate dehydratase. *Toxicology* 184, 85-95.
- Oshita, M., Takei, Y., Kawano, S., Fusamoto, H., Kamada, T., 1994. Protective effect of ebselen on constrictive hepatic vasculature: prevention of alcohol-induced effects on portal pressure in perfused livers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 20-24.
- Ozaki, M., Nakamura, M., Teraoka, S., Ota, K., 1997. Ebselen, a novel antioxidant-compound, protects the rat liver from ischemia reperfusion injury. *Transpl. Int.* 10, 96-102.
- Ozaras, R., Tahan, V., Aydin, S., Uzun, H., Kaya, S., Senturk, H., 2003. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats. *World J. Gastroenterol.* 9, 791-794.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-169.

- Parnham, M.J., Sies, H., 2000. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischemia. *Exp. Opin. Investig. Drugs* 9, 607–619.
- Pritsos, C.A., Sokoloff, M., Gustafson, D.L., 1992. PZ-51 (Ebselen) in vivo protection against adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 44, 839-841.
- Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Emanuelli, T., Christofari, R.S., Sousa, D.O., 1995. Effect of treatment with mercury-chloride and lead acetate during the 2nd stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic-acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology.* 100, 27-37.
- Salminen, W.F. Jr., Voellmy, R., Roberts, S.M., 1998. Effect of N-acetylcysteine on heat shock protein induction by acetaminophen in mouse liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 519-524.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 28, 133-145.
- Schoedel, K.A., Sellers, E.M., Tyndale, R.F., 2001. Induction of CYP2B1/2 and nicotine metabolism by ethanol in rat liver but not rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 62, 1025-1036.
- Shaw, S., Jayatilleke, E., Ross, W.A., 1979. Hepatic lipid peroxidation and glutathione depression after alcohol. *Gastroenterology.* 77, A41-A41.
- Siler-Marsiglio, K.I., Shaw, G., Heaton, M.B., 2004. Pycnogenol and vitamin E inhibit ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J. Neurobiol.* 59, 261-271.
- Singh R, Kats L., 1995. Catalysis of reduction of disulfide by selenol. *Anal. Biochem.* 232, 86-91.
- Sivaram, A.G., Suresh, M.V., Indira, M., 2003. Combined effect of ascorbic acid and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 134, 397-401.
- Sugiura, Y., Tamai, Y., Tanaka, H., 1978. Selenium protection against mercury toxicity: high binding affinity of methylmercury by selenium-containing

ligands in comparison with sulfur-containing ligands. *Bioinorg. Chem.* 9, 167-180.

Vendemiale, G., Grattagliano, I., Signorile, A., Altomare, E., 1998. Ethanol-induced changes of intracellular thiol compartmentation and protein redox status in the rat liver: effect of tauroursodeoxycholate. *J. Hepatol.* 28, 46-53.

Zhao, R., Holmgren, A., 2002. A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 277, 39456-39462.

Zhao, R., Masayasu, H., Holmgren, A., 2002. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 8579-8584.

Legends

Figure 1: Effects of N-acetylcysteine (NAC) and/or Ebselen administrations on the hepatic levels of nonprotein thiols (NPSH) from control and ethanol-exposed mice. Data are expressed as nmol/mg protein and represented as mean \pm SEM from 6 animals per group. For treatment details, see table 1. Different letters mean significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance, followed by the Duncan multiple range tests when F was significant.

Figure 2: Effects of N-acetylcysteine (NAC) and/or Ebselen administrations on the activity of hepatic δ -ALA-D from control and ethanol-exposed mice. Data are expressed as nmol of formed porphobilinogen (PBG)/mg protein/h and represented as mean \pm SEM from 6 animals per group. For treatment details, see table 1. Different letters mean significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance, followed by the Duncan multiple range tests when F was significant.

Figure 3: Effects of N-acetylcysteine (NAC) and/or Ebselen administrations on the activity of hepatic GPx from control and ethanol-exposed mice. Data are expressed as nmol of NADPH oxidized/mg protein/min and represented as mean \pm SEM from 6 animals per group. For treatment details, see table 1. Different letters mean significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance, followed by the Duncan multiple range tests when F was significant.

Figures

Figure 1

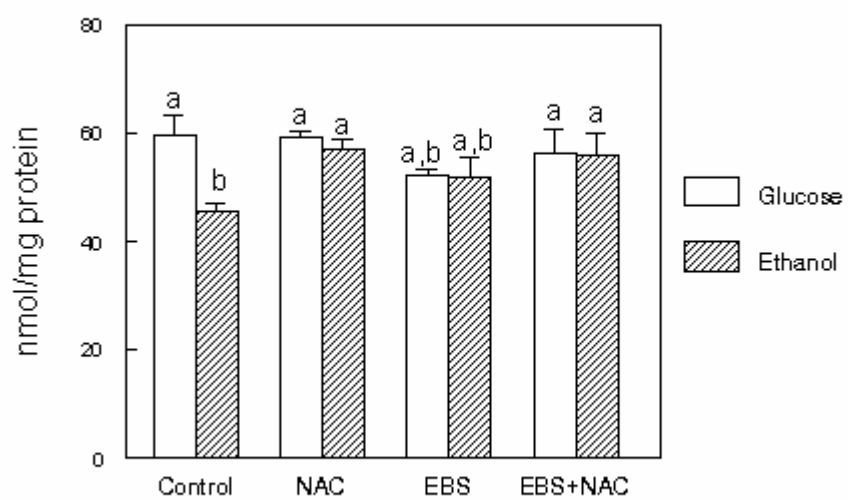


Figure 2

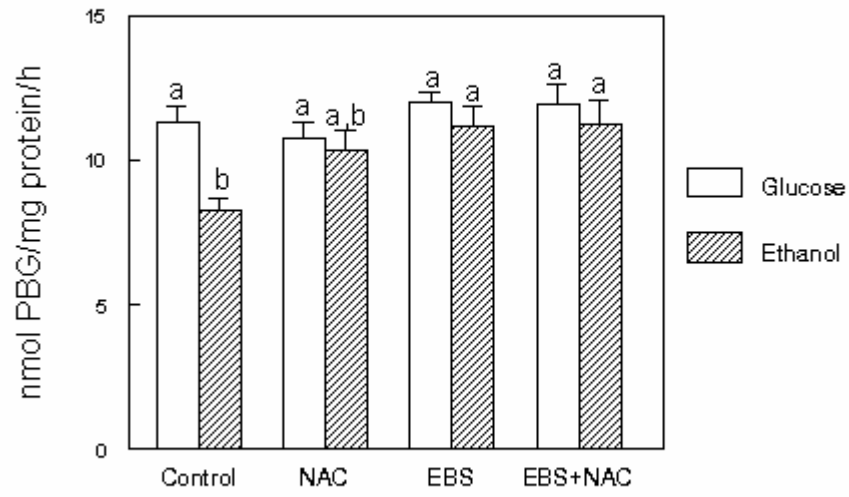
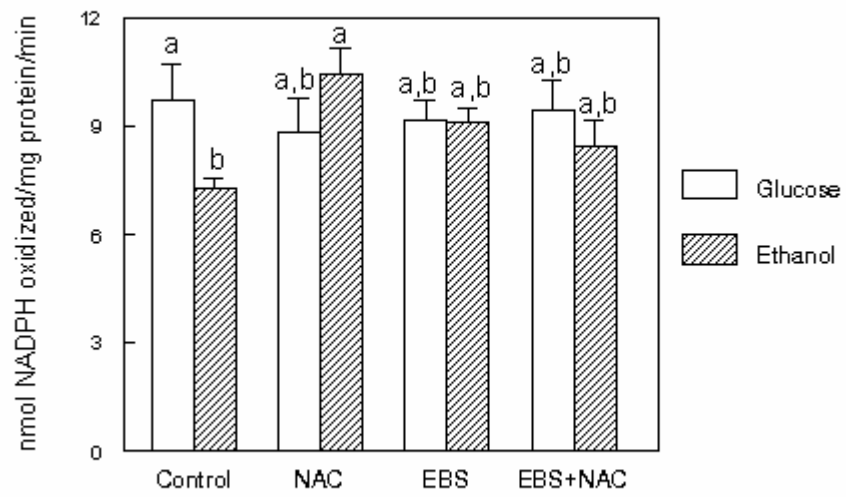


Figure 3



ANEXO 2**Absence of direct inhibitory effects of acetaldehyde on liver glutathione peroxidase and reductase activities**

Lucinéia A. Pivetta¹; Alcir L. Dafré³; Gilson Zeni¹;
João B.T. Rocha¹; Marcelo Farina^{1,2*}

¹ Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil.

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil.

* Corresponding author: Marcelo Farina.

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail: marcelofarina@zipmail.com.br

Telephone: + 55 48 331 6919

FAX: + 55 48 331 9672

Abstract

Acetaldehyde, the primary ethanol metabolite, has been implicated in the pathogenesis of alcoholic liver disease. As a potent electrophile, acetaldehyde readily reacts with nucleophiles in proteins, phospholipids, and nucleic acids to produce adducts, some of which have been detected in alcoholic patients. This study was aimed to investigate the direct *in vitro* effects of different concentration of acetaldehyde (30, 100 and 300 μM) on glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activities and on the sulfhydryl status (total and nonprotein thiols) in mice liver. In addition, the direct effects of acetaldehyde toward the thiol-peroxidase activity of ebselen, as well as the interaction between ebselen and glutathione, were also evaluated in an attempt to better understand the possible link between acetaldehyde and nucleophilic selenol groups. GPx and GR activities in mice liver supernatants were not changed after pre-incubation with acetaldehyde. Acetaldehyde, up to 300 μM , did not affect the thiol-peroxidase activity of ebselen. In addition, light/UV spectroscopy studies showed that the formation of ebselen intermediaries, which are produced during the chemical interaction between glutathione and ebselen, was also not affected by acetaldehyde. Even though acetaldehyde (up to 300 μM) had no oxidative effects toward glutathione (GSH) and dithioerythritol (DTE), the total and nonprotein thiols from mice liver were oxidized in the presence of acetaldehyde. Our results suggest no direct inhibitory effects of acetaldehyde on mice liver GR and GPx activities, as well as on the thiol-peroxidase activity of ebselen. Moreover, the acetaldehyde-dependent oxidation of glutathione seems to depend on mice liver cytosol constituents.

Key words: Acetaldehyde, ethanol, glutathione peroxidase, glutathione reductase, ebselen, mice liver, thiol status, oxidative stress.

Introduction

Ethanol related disabilities are one of the world's major public health concerns. The effects of ethanol intake include alteration of redox state, acetaldehyde and free radical production, which causes damage to cell structure and function (Varma et al., 2004). In this regard, several lines of evidence indicate that hepatic tissue damage induced by chronic ethanol consumption is mediated through acetaldehyde and associated with reactive oxygen species, which impair cellular defense mechanisms and the thiol status (Sultana et al., 2005).

Acetaldehyde, as a potent electrophile, readily reacts with nucleophiles in proteins, phospholipids, and nucleic acids to produce adducts, some of which have been detected in alcoholic patients (Niemela et al., 1987; Lin et al., 1988; Fang et al., 1997; Birt et al., 1998). Although ethanol consumption has been shown to inhibit glutathione peroxidase and glutathione reductase activities (Luczaj & Skrzydlewska, 2004; Ostrowska et al., 2004; Pushpakiran et al., 2004; Yang et al., 2004), the involvement of acetaldehyde in this events remains unclear.

Glutathione peroxidase (GPx) is an enzyme that catalyzes the reduction of hydroperoxides by glutathione (GSH) and its main function is to protect against the damaging effect of endogenously formed hydroperoxides (Flohe, 1971). In its reaction cycle, the oxidation of the ionized selenol by the hydroperoxide yields a selenenic acid that in turn is reduced back by two reactions with reduced glutathione (Ursini & Bindoli, 1987). It is noteworthy that electrophiles, such as aminoguanidine (Diez-Fernandez et al., 1998), thioacetamide (Abul et al., 2002) and heavy metals (Farina et al., 2004) are inhibitors of GPx activity.

Ebselen, 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one, is a seleno-organic compound that mimics the GSH-dependent, hydroperoxide reducing activity of GPx (Müller et al., 1984). It protects rat liver against ischemia-reperfusion and ethanol-induced injuries (Ozaki et al., 1997; Kono et al., 2001). It has been evidenced that ebselen catalyzes the thiol-peroxidase reaction with a mechanism that appears kinetically identical to the mechanism of GPx and the inactivation of the catalytic properties of ebselen by iodoacetate suggests that a selenol moiety is

involved (Maiorino et al., 1988). Interestingly, the thiol-peroxidase activity of ebselen is inhibited *in vitro* by the GPx inhibitors aurothioglucose and D-(-)penicillamine HCl (Mercurio et al., 1986).

GR is an important enzyme involved in the reduction of glutathione disulfide (GSSG, also known as oxidized glutathione) to glutathione (GSH), using NADPH as a reducing cofactor (Gul et al., 2000). Similarly to GPx, GR is also inhibited by electrophiles (Ulusu et al., 2003; Rodriguez et al., 2005). In this regard, there is evidence that GR activity is inhibited after ethanol exposure (Luczaj & Skrzydlewska, 2004).

Thiols are known to play important roles in the protection against toxic compounds, including ethanol (Biaglow et al., 1983; Sood et al., 1993). Thus, thiol depletion has been pointed as a key phenomenon in ethanol-induced oxidative stress (Lieber, 1997). In this regard, reduced glutathione, the main endogenous thiol compound (Kaplowitz et al., 1985), is also depleted by ethanol administration (Lauterburg et al., 1984; Vendemiale et al., 1984); however, the mechanism of this event remains unclear.

Taking into account that several oxidative phenomena induced by ethanol have been attributed to acetaldehyde and that GPx/GR inhibitions and thiols depletion have been observed after chronic ethanol consumption, the aim of this study was to investigate the possible direct inhibitory effects of acetaldehyde on the activities of mice liver GPx and GR, as well as on the thiol-peroxidase activity of ebselen under *in vitro* conditions. In addition, the *in vitro* effects of acetaldehyde on the liver sulfhydryl status and on the formation of ebselen intermediaries, which are produced during the chemical interaction between glutathione and ebselen, were also investigated.

2. Material and Methods

2.1. *Chemicals*: Acetaldehyde, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt - reduced form, 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic) acid, tert-Butyl peroxide, glutathione reductase from baker's yeast, 2,4-dithioerythriol, glutathione S-transferase from bovine liver and reduced glutathione were obtained from Sigma (St. Louis, Mo., USA). Ebselen (2-phenyl-1,2-benziselenazole-3(2H)-one) was synthesized based on Engman and Hallberg (1989). All other chemicals were of the highest grade available commercially.

2.2. *Animals*: Male *Swiss albino* mice, 2 months old, from our breeding colony and weighing about 30 g were maintained in an air-conditioned room (20-25°C) under natural lighting conditions with tap water and food (Supra, Ribeirão Preto, SP, Brazil) *ad libitum*. All animal procedures were conducted in accordance with the guiding principles in the use of animals in toxicology, adopted by the Society of Toxicology in July 1989.

2.3. *Tissue preparation*: For experiments using tissue supernatants (GPx and GR activities and thiol status), mice were killed by decapitation and livers were quickly removed, placed on ice and homogenized in 8 volumes of a 25 mM HEPES buffer, pH 7.0. The obtained homogenates were centrifuged at 4,000 x g at 4°C for 10 min to yield a low speed supernatant, which was used for the measurements of GPx and GR activities and thiol status.

2.4. *GR and GPx activities*: GR and GPx activities were determined based on Carlberg and Mannervik, 1985 and on Wendel, 1981, respectively. In the GR assay, oxidized glutathione (GSSG) is reduced by GR at the expenses of NADPH consumption, which is followed at 340nm. GR activity is proportional to NADPH decay (Carlberg and Mannervik, 1985). In the GPx assay, enzyme activity is measured indirectly by the NADPH decay. Tert-butyl peroxide are decomposed

generating GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by GR present in the assay media, at expenses of NADPH (Wendel, 1981).

2.5. Determination of the thiol-peroxidase activity of ebselen: The thiol-peroxidase activity of ebselen was measured according to Wilson's method (1989). The reaction was carried out at 25 °C in 1 ml of the solution containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM GSH, 1 unit of GSH reductase, and 50 µM ebselen. The mixture was pre-incubated with different concentrations of acetaldehyde (0, 30, 100 and 300 µM) for 30 min and then 0.25 mM NADPH solution was added and incubated for 3 min at 37°C. The reaction was initiated by addition of 0.5 mM tert-butyl peroxide. The activity was followed by the decrease of NADPH absorption at 340 nm. Appropriate controls were carried out without ebselen and were subtracted.

2.6. Spectroscopy studies: Spectroscopic studies were performed to detect a possible acetaldehyde effect toward the interaction between ebselen and GSH. Absorption spectra of ebselen and the products of its interaction with GSH and/or acetaldehyde were monitored by spectrophotometry (250–450 nm) using a Varian Cary UV spectrophotometer. The reactions were performed at room temperature (25 °C) in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), in quartz cuvette.

2.7. Determination of sulfhydryl groups: The total and nonprotein sulfhydryl groups from liver supernatants and the amount of sulfhydryl groups from 2,4-dithioerythritol and GSH were determined based on Ellman (1959).

2.8. Protein determination: Protein was measured by the method of Lowry (1951) using serum albumin as standard.

2.9. Statistical analysis: Differences were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Duncan's Multiple Range Test when *p* value was less than 0.05.

3. Results

The *in vitro* effects of acetaldehyde on mice liver glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx) activities and on the thiol-peroxidase activity of ebselen are depicted in Table 1. Acetaldehyde, up to 300 μM , did not affect GR and GPx activities after 30 minutes of pre-incubation. Under the same conditions of pH and temperature compared to the assays of liver enzymes, acetaldehyde also did not change the thiol peroxidase activity of ebselen.

It is well known that the thiol-peroxidase activity of ebselen depends on its conversion to ebselen selenol and this phenomenon takes place by the reaction of ebselen with reduced glutathione (Cotgreave et al., 1992). Since acetaldehyde is a highly electrophile compound, light/UV spectroscopy studies were performed to detect a possible inhibitory effect of acetaldehyde on the ebselen selenol formation/stability after GSH and ebselen interaction. Figure 1 shows that ebselen (50 μM) and GSH (100 μM) rapidly react at the 1:2 proportion to yield an intermediate molecule, which is believed to be ebselen selenol (Figure 1; spectrum B; Hanzel et al., 2005). The previous addition of acetaldehyde (100 and 300 μM) to the reaction medium did not affect the formation of this product (Figure 1; spectrum C and D, respectively). Figure 2 shows the time-course interaction of ebselen (50 μM) and GSH (100 μM) in the absence (Figure 2A) or in the presence (Figure 2B) of acetaldehyde (300 μM). In this protocol, acetaldehyde also did not affect ebselen/GSH interaction and the formation of ebselen selenol was instantly observed after GSH addition to the ebselen-containing medium. Since ebselen selenol is an unstable nucleophile molecule and seems to react with ebselen to yield ebselen diselenide (Zhao and Holmgren, 2002), the formation of a stable molecule was evidenced at 30 minutes of reaction. Interestingly, this product has a similar spectrum of ebselen diselenide when compared to the authentic compound (Zhao and Holmgren, 2002), showing two strong and broad absorption bands (from 250 to 300 nm and from 300 to 420 nm) overlapping each other. In addition, it is noteworthy that this spectrophotometric

profile disappeared within time (after 6 hours) due to precipitation, corroborating with the low water solubility of ebselen diselenide.

Figure 4 shows the *in vitro* effects of acetaldehyde on the oxidation of a monothiol (GSH - A) and a dithiol (dithioerythritol - B). Acetaldehyde, up to 300 μ M, did not oxidize GSH and dithioerythritol after 30 minutes of reaction. However, using liver low speed supernatant, acetaldehyde significantly oxidized the total (Figure 5A) and nonprotein (Figure 5 B) thiols, indicating that the acetaldehyde-dependent oxidation of thiols seems to depend on mice liver cytosol constituents.

Based on the results of Figure 5 and on previous studies that show the role of the enzyme glutathione-S-transferase (GST) in the detoxification of endogenous aldehydes (Chen et al., 2002; Sidell et al., 2003), the possible stimulatory effect of purified GST on acetaldehyde-induced GSH oxidation was evaluated. Table 2 shows that acetaldehyde was not a good substrate for bovine liver GST; consequently, GSH oxidation was not observed in the presence of acetaldehyde and GST.

4. Discussion

Although several studies have pointed to oxidative stress as an important issue linked to the pathophysiology of ethanol-induced diseases, the exact molecular mechanism(s) whereby it induces cellular damage remains unclear. In this regard, the inhibition of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) by ethanol, ethanol metabolites or radicals generated from ethanol metabolism has received notable attention in the last years (Puntarulo et al., 1999; Luczaj & Skrzydlewska, 2004; Ostrowska et al., 2004; Pushpakiran et al., 2004). Taking into account that GPx and GR possess nucleophilic groups (selenol and sulfhydryl, respectively) that are vital for their antioxidant properties, and that acetaldehyde (the main ethanol metabolite) is a potent electrophile, one could assume that the inhibition of GPx and GR activities observed after ethanol consumption is related, at least in part, to a direct inhibitory effect of acetaldehyde. However, the results of the present study show that acetaldehyde does not inhibit these enzymes under *in vitro* conditions, suggesting that a similar phenomenon occurs *in vivo*. In addition, the thiol-peroxidase activity of ebselen, a GPx mimic, was also not changed by acetaldehyde. Taking into account that ebselen catalyzes the thiol-peroxidase reaction with a mechanism that appears kinetically identical to the mechanism of GPx (Maiorino et al., 1988) and that the inactivation of the catalytic properties of ebselen by the GPx inhibitors aurothioglucose and D-penicillamine HCl has been reported (Mercurio et al., 1986), this study definitively bring to an end the question if whether or not acetaldehyde is a direct inhibitor of GPx and GR. In agreement with this idea, light/UV spectroscopy studies showed that acetaldehyde does not affect the kinetics of ebselen selenol formation after the chemical interaction between GSH and ebselen.

Thiol depletion has been pointed as a key phenomenon in ethanol-induced oxidative stress (Lieber, 1997). In this regard, reduced glutathione (GSH), the main endogenous thiol compound (Kaplowitz et al., 1985), is also depleted by ethanol administration (Lauterburg et al., 1984; Vendemiale et al.; 1984). It is

noteworthy that, even though acetaldehyde readily reacts with endogenous nucleophiles (Niemela et al., 1987; Lin et al., 1988; Fang et al., 1997), the results presented herein show no direct oxidative effects of acetaldehyde toward GSH even when acetaldehyde concentration was ten fold the GSH concentration in the reaction medium. In addition, the dithiol compound dithioerythritol (DTE) was also not oxidized by acetaldehyde under the same above-mentioned conditions.

Based on the present results, one could assume that the thiol oxidation observed after ethanol consumption is not related to the oxidative effects of its metabolite - acetaldehyde. Interestingly, when acetaldehyde was incubated with the supernatants of mice liver, an evident oxidative effect of acetaldehyde toward total and nonprotein thiols was observed. Taking account that GSH represents the majority of nonprotein thiols in liver, the acetaldehyde-dependent oxidation of GSH seems to depend on liver constituents. This evidence points to the metabolism of acetaldehyde as a key phenomenon linked to the thiol depletion observed after ethanol consumption.

Glutathione-S-transferase (GST) catalyzes the conjugation of GSH with both xenobiotic and endobiotic electrophile compounds, and the less toxic and more hydrophilic products can then be partially metabolized and excreted (Salinas & Wong, 1999). This enzyme has been pointed as an important protein involved in the detoxification of endogenous aldehydes (Chen et al., 2002; Sidell et al., 2003). Taking into account that mice liver constituents seem to play a crucial role in the acetaldehyde-dependent oxidation of GSH (see Figure 4B), the contribution of purified GST to the occurrence of this phenomenon was evaluated. Our results showed that acetaldehyde did not oxidized GSH in either absence or presence of purified liver GST, suggesting that it is not a good substrate for this enzyme.

The not-answered questions about these data are: How can ethanol consumption to cause inhibition of GPx and GR? How can the acetaldehyde metabolism lead to liver GSH oxidation? Unfortunately, these questions remain partially unsolved. Anyway, based on the present results, it is adequate to exclude a possible direct inhibitory effect of acetaldehyde toward liver GPx and GR. In

addition, GST seems to be a unlike protein responsible for acetaldehyde-induced liver thiol depletion.

Although most of the ingested ethanol is converted to acetaldehyde by the action of alcohol dehydrogenase in hepatocytes (Lieber, 1993), there are other metabolic routes available to ethanol. For instance, ethanol oxidation by hepatic microsomal P450 enzymes becomes more pronounced after chronic ethanol consumption or after a high acute dose of the compound (Krikun et al., 1984) and such a route has been associated with the production of free radicals (Kuthan & Ulbrich, 1982). In this regard, ethanol has been shown to be oxidized to a free radical metabolite, the 1-hydroxyethyl radical (HER) by liver microsomal systems (Albano et al., 1988; Rashba-Step, 1993). Taking into account that HER inhibits GR and GPx activities under *in vitro* conditions (Puntarulo et al., 1999), the *in vivo* inhibitory effect of HER in the activities of these antioxidant enzymes should not be excluded. Anyway, additional studies are necessary to confirm this hypothesis.

Acknowledgements: This study was supported by grants from CNPq to M. Farina (475329/2004-0).

References

- Abul H, Mathew TC, Dashti HM, Al-Bader A. Level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and uric acid in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *Anat Histol Embryol.* 2002, 31: 66-71.
- Albano E, Tomasi A, Gorla-Gatti L, Dianzani MU. Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. *Chem Biol Interact.* 1988, 65: 223-234.
- Biaglow JE, Varnes ME, Clark EP, Epp ER. The role of thiols in cellular responses to radiation and drugs. *Radiat Res.* 1983, 95: 437-455.
- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985, 113: 484-490.
- Chen J, Schenker S, Henderson GI. 4-hydroxynonenal detoxification by mitochondrial glutathione S-transferase is compromised by short-term ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002, 26: 1252-1258.
- Cotgreave IA, Morgenstern R, Engman L, Ahokas J. Characterisation and quantitation of a selenol intermediate in the reaction of ebselen with thiols. *Chem Biol Interact.* 1992, 84: 69-76.
- Diez-Fernandez C, Sanz N, Alvarez AM, Zaragoza A, Cascales M. Influence of aminoguanidine on parameters of liver injury and regeneration induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol.* 1998, 125: 102-108.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959, 82: 70-77.
- Engman L, Hallberg A. Expedient synthesis of ebselen and related-compounds. *J. Org. Chem.* 1989, 54: 2964-2966.
- Fang JL, Vaca CE. Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. *Carcinogenesis.* 1997, 18: 627-632.
- Farina M, Soares FA, Zeni G, Souza DO, Rocha JB. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. *Toxicol Lett.* 2004, 146: 227-235.
- Flohe L. Glutathione peroxidase: enzymology and biological aspects. *Klin Wochenschr.* 1971, 49: 669-683.

- Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol.* 2000, 38: 625-634.
- Hanzel CE, Villaverde MS, Verstraeten SV. Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium(III) hydroxide. *Toxicology.* 2005, 207: 501-510.
- Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985, 25: 715-744.
- Kono H, Arteel GE, Rusyn I, Sies H, Thurman RG. Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *Free Radic Biol Med.* 2001, 30: 403-411.
- Krikun G, Lieber CS, Cederbaum AI. Increased microsomal oxidation of ethanol by cytochrome P-450 and hydroxyl radical-dependent pathways after chronic ethanol consumption. *Biochem Pharmacol.* 1984, 33: 3306-3309.
- Kuthan H, Ulbrich V. Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P-450 monooxygenase system. *Eur. J. Biochem.* 1982, 126: 583-588.
- Lauterburg BH, Davies S, Mitchell JR. Ethanol suppresses hepatic glutathione synthesis in rats in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984, 230: 7-11.
- Lieber CS. Herman Award Lecture, 1993: a personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr.* 1993, 58: 430-442.
- Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol.* 1997, 38: 601-628.
- Lin RC, Smith RS, Lumeng L. Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically. *J Clin Invest.* 1988, 81: 615-619.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193: 265-275.
- Luczaj W, Skrzydlewska E. Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food Chem Toxicol.* 2004, 42: 2045-2051.
- Maiorino M, Roveri A, Coassin M, Ursini F. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). *Biochem Pharmacol.* 1988, 37: 2267-2271.

- Mercurio SD, Combs GF Jr. Synthetic seleno-organic compound with glutathione peroxidase-like activity in the chick. *Biochem Pharmacol.* 1986, 35: 4505-4509.
- Muller A, Cadenas E, Graf P, Sies H. A novel biologically active seleno-organic compound-I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem Pharmacol.* 1984, 33: 3235-3239.
- Niemela O, Klajner F, Orrego H, Vidins E, Blendis L, Israel Y. Antibodies against acetaldehyde-modified protein epitopes in human alcoholics. *Hepatology.* 1987, 7: 1210-1214.
- Ostrowska J, Luczaj W, Kasacka I, Rozanski A, Skrzydlewska E. Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol.* 2004, 32: 25-32.
- Ozaki M, Nakamura M, Teraoka S, Ota K. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int.* 1997, 10: 96-102.
- Puntarulo S, Stoyanovsky DA, Cederbaum AI. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with antioxidant enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 1999, 372: 355-359.
- Pushpakiran G, Mahalakshmi K, Anuradha CV. Protective effects of taurine on glutathione and glutathione-dependent enzymes in ethanol-fed rats. *Pharmazie.* 2004, 59: 869-872.
- Rashba-Step J, Turro NJ, Cederbaum AI. Increased NADPH- and NADH-dependent production of superoxide and hydroxyl radical by microsomes after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys.* 1993, 300: 401-408.
- Rodriguez VM, Del Razo LM, Limon-Pacheco JH, Giordano M, Sanchez-Pena LC, Uribe-Querol E, Gutierrez-Ospina G, Gonshebbatt ME. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol Sci.* 2005, 84: 157-166.
- Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases - a review. *Curr Med Chem.* 1999, 6: 279-309.

- Sidell KR, Montine KS, Picklo MJ Sr, Olsen SJ, Amarnath V, Montine TJ. Mercapturate metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal in rat and human cerebrum. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003, 62: 146-153.
- Sood PP, Vijayalakshmi K, Babu C. Ameliorative capacities of vitamins and monothiols administered alone or in combinations in methylmercury mobilisation in nervous and non-nervous tissues of mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1993, 39: 213-219.
- Sultana R, Raju BS, Sharma V, Reddanna P, Babu PP. Formation of acetaldehyde adducts of glutathione S-transferase A3 in the liver of rats administered alcohol chronically. *Alcohol*. 2005, 35: 57-66.
- Ulusu N, Acan N, Turan B, Tezcan E. Inhibition of glutathione reductase by cadmium ion in some rabbit tissues and the protective role of dietary selenium. *Biol Trace Elem Res*. 2003, 91: 151-156.
- Ursini F, Bindoli A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids*. 1987, 44: 255-276.
- Varma PS, Aruna K, Rukkumani R, Menon VP. Alcohol and thermally oxidized pufa induced oxidative stress: role of N-acetyl cysteine. *Ital J Biochem*. 2004, 53: 10-15.
- Vendemiale G, Jayatilleke E, Shaw S, Lieber CS. Depression of biliary glutathione excretion by chronic ethanol feeding in the rat. *Life Sci*. 1984, 34: 1065-1073.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981, 77: 325-333.
- Wilson SR, Zucker PA, Huang RC, Spector A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *J. Am. Chem. Soc*. 1989, 111: 5936-5939.
- Zhao R, Holmgren A. A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *J Biol Chem*. 2002, 277: 39456-39462.

Legends

Table 1: In vitro effects of acetaldehyde on mice liver glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx) activities and on the thiol-peroxidase activity of ebselen. Liver supernatants (approximately 3 mg of protein) or ebselen (50 nmol) were pre-incubated at 37 °C, during 30 minutes, with different acetaldehyde concentrations (0, 30, 100 and 300 μ M) in a medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 (volume final of reaction = 1 mL). After pre-incubation, one aliquot (25 μ L) of each medium was used to determine the catalytic activities (see Materials and Methods Section). GR and GPx activities are expressed as nmol of oxidized NADPH/min/mg protein. The thiol-peroxidase activity of ebselen is expressed as nmol of oxidized NADPH/min/ μ mol. Data are expressed as mean \pm standard deviation for three independent assays.

Table 2: In vitro effects of acetaldehyde on glutathione oxidation in the presence of glutathione-S-transferase (GST). Glutathione (1 μ mol) were incubated at 37 °C with acetaldehyde (1 μ mol), in the presence or in the absence of glutathione-S-transferase, in a medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 (volume final of reaction = 1 mL). At 1, 5 and 30 min of incubation, aliquots of 25 μ L were used to determine the amount of sulfhydryl groups using 55'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). Sulfhydryl groups are expressed as μ M and expressed as mean \pm standard deviation for three independent assays.

Figure 1: Absorption spectra of ebselen and the products of its interaction with GSH and/or acetaldehyde. The reactions were performed at room temperature (25 °C) in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), in a quartz cuvette, and monitored by spectrophotometry (250–450 nm) using a Varian Cary UV spectrophotometer. Line A shows the absorption spectra of ebselen (50 μ M). Line B shows the absorption spectra of ebselen (50 μ M) + GSH (100 μ M) + 1 min incubation. Lines C and D are similar to B, however, the incubations were performed in the presence of 100 and 300 μ M of acetaldehyde, respectively. Acetaldehyde (300

μM), GSH (100 μM) and acetaldehyde (300 μM) + GSH (100 μM) had no apparent absorbance in the studied wavelengths. In addition, acetaldehyde (300 μM) had no effects on ebselen spectra (data not shown). For details, see materials and methods.

Figure 2: Absorption spectra of ebselen and the products of its interaction with GSH and/or acetaldehyde. Ebselen (50 μM) was incubated with GSH (100 μM) in the absence (A) or in the presence (B) of acetaldehyde (300 μM). The reactions were performed at room temperature (25 °C) in a medium containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), in a quartz cuvette. The formation of products was monitored during 6 h and the time-schedule was as follows: Zero to 5 min (1 to 1 min); 5 min to 60 min (10 to 10 min); 60 min to 720 min (30 to 30 min).

Figure 3: In vitro effects of acetaldehyde on glutathione (GSH - A) and Dithioerythritol (DTE - B) oxidation. The sulfhydryl compounds (30 nmol) were incubated at 37 °C, during 30 minutes, with different acetaldehyde concentrations (0, 30, 100 and 300 μM) in a medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 (volume final of reaction = 1 mL). After incubation, the amount of sulfhydryl groups was determined with 55'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (for details, see Materials and Methods). Sulfhydryl groups are expressed as μM and expressed as mean \pm standard deviation for three independent assays.

Figure 4: In vitro effects of acetaldehyde on the oxidation of the total (A) and nonprotein (B) sulfhydryl groups from mice liver. Liver supernatants (approximately 3 mg of protein) were incubated at 37 °C, during 30 minutes, with different acetaldehyde concentrations (0, 30, 100 and 300 μM) in a medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 (volume final of reaction = 1 mL). After incubation, the amount of total and sulfhydryl groups was determined with 55'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (for details, see Materials and Methods). Total and nonprotein sulfhydryl groups are expressed as nmol/mg protein and $\mu\text{mol/mg}$

tissue. Data are expressed as mean \pm standard deviation for three independent assays.

Figures and Tables

Table 1

	GR	GPx	Ebselen
Control	18.6 ± 0.59	9.3 ± 0.18	340 ± 71.0
Acetaldehyde (30 µM)	18.4 ± 0.22	9.3 ± 0.23	340 ± 22.3
Acetaldehyde (100 µM)	17.5 ± 0.39	8.7 ± 0.15	323 ± 34.7
Acetaldehyde (300 µM)	17.9 ± 0.62	8.9 ± 0.25	316 ± 22.7

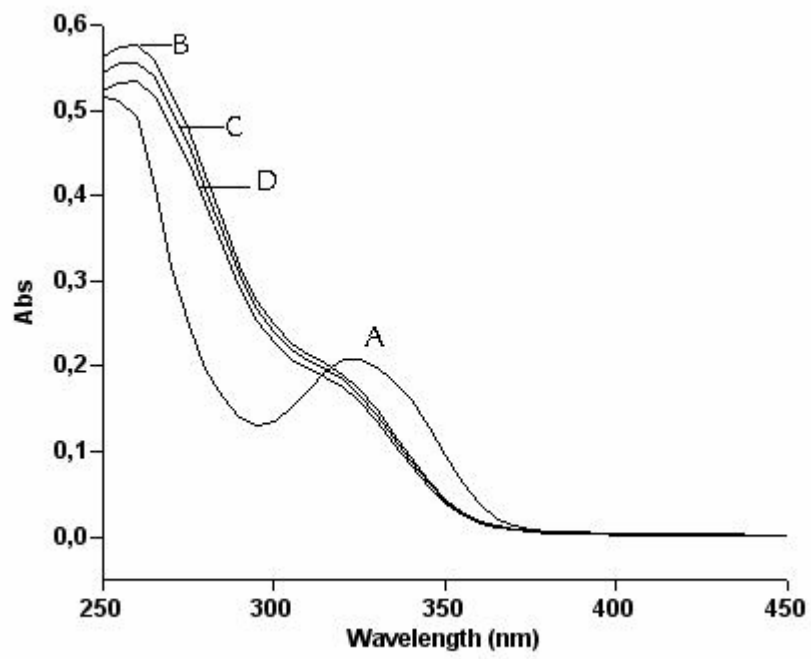


Figure 1

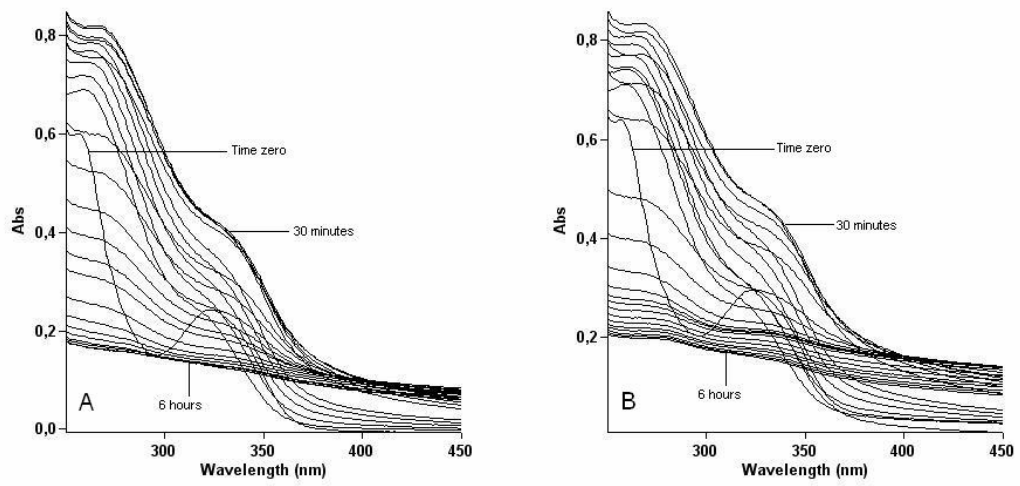


Figure 2

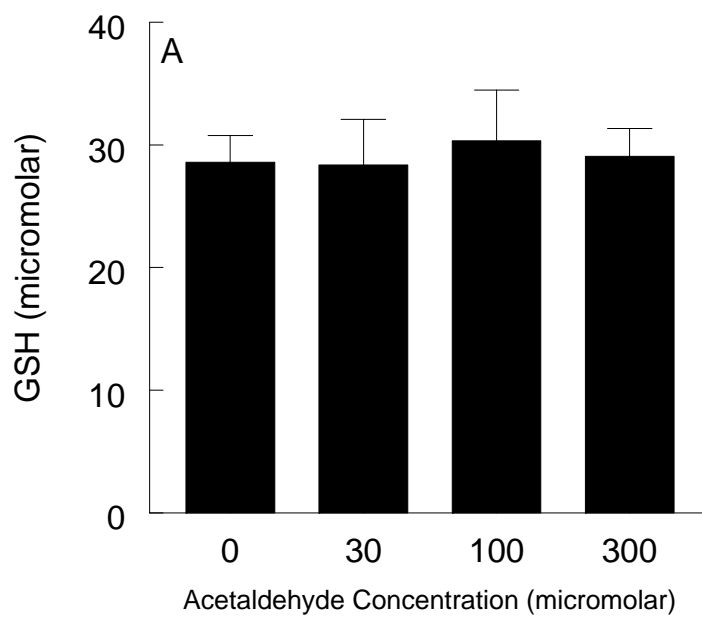


Figure 3A

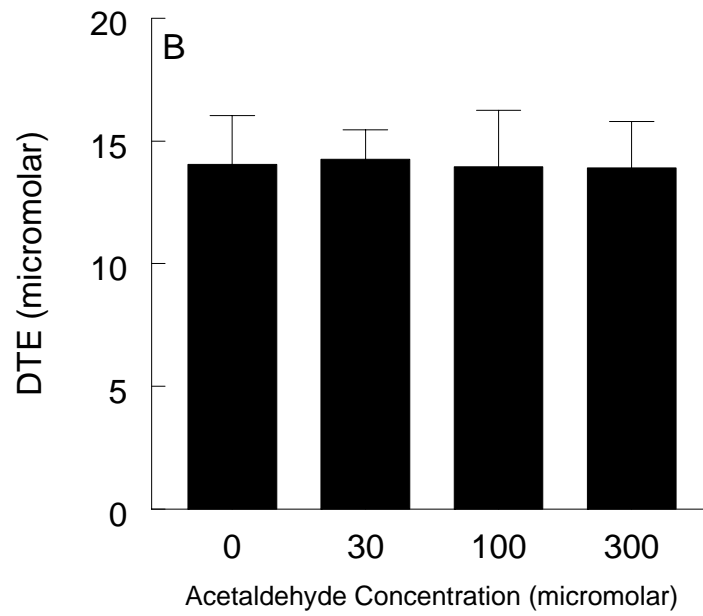


Figure 3B

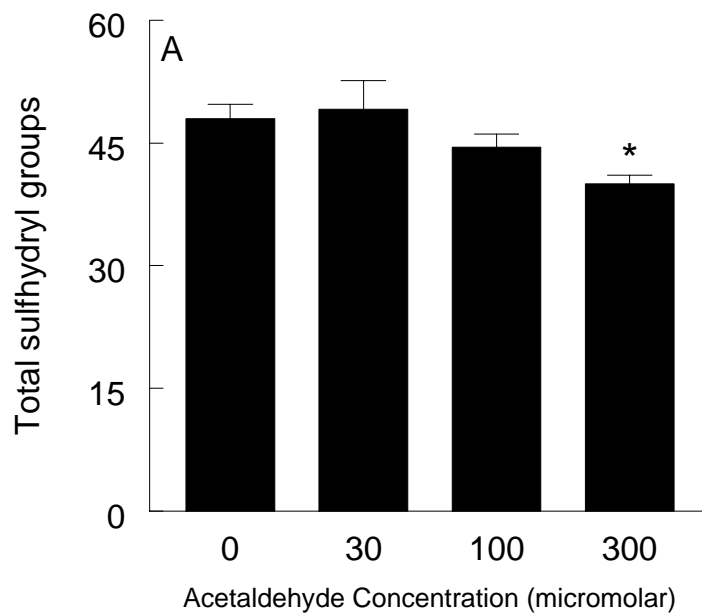


Figure 4A

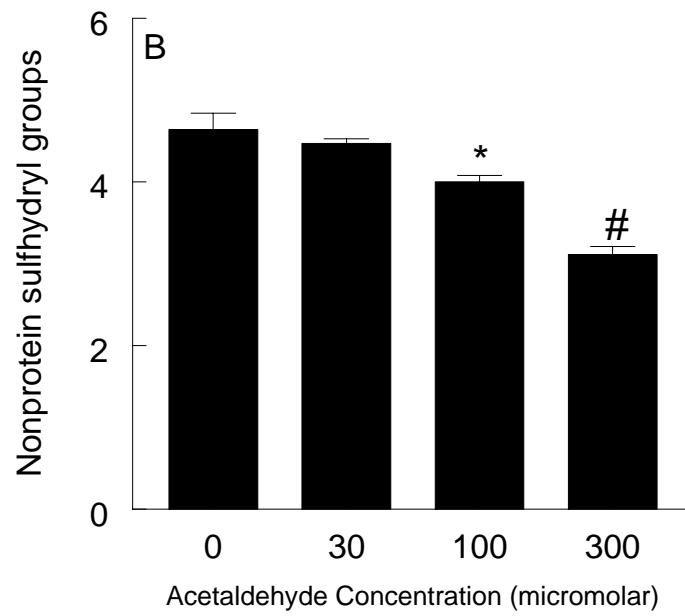


Figure 4B

Table 2

Experimental conditions ↓	Time of incubation		
	1 minute	5 minutes	30 minutes
Control	1.03 ± 0.15	0.98 ± 0.14	1.09 ± 0.19
GST (0.1 units)	1.05 ± 0.18	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.17
GST (0.3 units)	0.97 ± 0.11	0.99 ± 0.14	0.98 ± 0.09
GST (1.0 unit)	0.99 ± 0.20	0.98 ± 0.19	1.02 ± 0.16