



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

**ATIVIDADE HIPOLIPIDÊMICA DO DISSELENETO DE  
DIFENILA NA HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA POR  
TRITON WR-1339 EM CAMUNDONGOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Juliana Trevisan da Rocha**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**ATIVIDADE HIPOLIPIDÊMICA DO DISSELENETO DE DIFENILA NA  
HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA POR TRITON WR-1339 EM  
CAMUNDONGOS**

por

**Juliana Trevisan da Rocha**

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

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Zeni**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Wayne Nogueira**

Santa Maria, RS, Brasil

**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

**ATIVIDADE HIPOLIPIDÊMICA DO DISSELENETO DE DIFENILA NA  
HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA POR TRITON WR-1339 EM CAMUNDONGOS**

Elaborada por

**Juliana Trevisan da Rocha**

como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Gilson Zeni (Orientador)

---

Prof. Dr. Alexandre Mazzanti

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roselia Maria Spanevello

Santa Maria, novembro de 2009.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar.

Aos meus pais, Pedro e Maria Ignez, e ao meu irmão, Fabiano.

Ao meu namorado, André.

Ao professor Gilson e à professora Cristina.

Aos ex-colegas, Ricardo e Cristiane, e aos atuais colegas de laboratório Marina, Silvane, Ethel, Cristiano, Simone, Ana Cristina, Carmine, Bibiana, Michael, Cezar, Cristiani, Marlon, Luiz Vinicius, Pietro, Maurício e Carla.

Aos colegas do laboratório do professor Gilson e do professor João.

Aos professores Sydney Hartz Alves e Diogo Gabriel.

À Universidade Federal de Santa Maria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica bem como aos seus professores e funcionários.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que eu chegasse até, muitíssimo obrigada!

## RESUMO

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

### ATIVIDADE HIPOLIPIDÊMICA DO DISSELENETO DE DIFENILA NA HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA POR TRITON WR-1339 EM CAMUNDONGOS

AUTOR: Juliana Trevisan da Rocha  
ORIENTADOR: Gilson Zeni  
CO-ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira  
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, novembro de 2009

Nos mamíferos, o fígado desempenha um papel extremamente importante na manutenção da homeostase do metabolismo dos lipídios plasmáticos. Entretanto, problemas na regulação desses mecanismos têm sido implicados na ocorrência de dislipidemias (alterações na concentração adequada de lipídios no plasma). Nos últimos anos, tem sido evidenciada a existência de uma relação entre os níveis de selênio (Se) e o aumento nas concentrações plasmáticas de lipídios em humanos e animais. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar um possível efeito hipolipidêmico do  $(\text{PhSe})_2$ , um composto orgânico de Se, no modelo de hiperlipidemia aguda induzida por Triton WR-1339 em camundongos, bem como investigar se a hiperlipidemia aguda induzida pela administração intraperitoneal (i.p.) de Triton WR-1339 altera parâmetros relacionados à ocorrência de dano oxidativo no tecido hepático de camundongos e determinar se o efeito antioxidante do  $(\text{PhSe})_2$  está presente nesse processo. Para isso, o Triton WR-1339 foi injetado i.p. (400 mg/kg) em camundongos que estavam em jejum de 12 horas. O  $(\text{PhSe})_2$  foi administrado oralmente (10 mg/kg) 30 minutos antes do Triton WR-1339. 24 horas após a injeção do Triton WR-1339, amostras de sangue foram coletadas para dosagem das concentrações de lipídios plasmáticos. Os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ácido ascórbico, bem como a atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase foram determinados no tecido hepático. A administração de  $(\text{PhSe})_2$  foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de colesterol total, colesterol não-HDL e triglicerídeos bem como aumentar os níveis de HDL-colesterol no plasma de camundongos hiperlipidêmicos. No protocolo experimental utilizado nesse estudo não foram observadas alterações nos parâmetros hepáticos de estresse oxidativo analisados. Conseqüentemente, o efeito antioxidante do  $(\text{PhSe})_2$  não pode ser verificado. Os resultados obtidos nesse trabalho encorajam a realização de estudos posteriores no intuito de elucidar o exato mecanismo através do qual o  $(\text{PhSe})_2$  exerce seu efeito hipolipidêmico.

**Palavras-chave:** disseleneto de difenila; hipercolesterolemia; estresse oxidativo; selênio; Triton WR-1339.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Graduating Program in Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **HYPOLIPIDAEMIC ACTIVITY OF DIPHENYL DISELENIDE IN TRITON WR-1339- INDUCED HYPERLIPIDAEMIA IN MICE.**

AUTHOR: Juliana Trevisan da Rocha

ADVISOR: Gilson Zeni

CO-ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, november 2009

In mammals, the liver plays a central role in whole-body lipid metabolism. Unfortunately, dysregulation of these pathways has been implicated in hyperlipidemias. In recent years, a significant association between the trace element selenium and hypercholesterolaemia in human and animals has been reported. This study was designed to investigate a potential hypolipidaemic effect of diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>) in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. Triton was administered intraperitoneally (400 mg/kg) to overnight-fasted mice to develop acute hyperlipidaemia. (PhSe)<sub>2</sub> was administered orally (10 mg/kg) 30 min before Triton. At 24 h after Triton injection, blood samples were collected to measure plasma lipid levels. The hepatic thiobarbituric acid reactive substances and ascorbic acid levels as well as catalase and glutathione peroxidase activity were recorded. (PhSe)<sub>2</sub> administration significantly lowered total cholesterol, non-high-density lipoprotein-cholesterol and triglycerides, whilst it increased high-density lipoprotein-cholesterol levels in plasma of hyperlipidaemic mice. Neither oxidative stress nor the antioxidant effect of (PhSe)<sub>2</sub> was observed in the mouse liver in this experimental protocol. These findings indicated that (PhSe)<sub>2</sub> was able to lower plasma lipid concentrations. Further studies are needed to elucidate the exact mechanism by which (PhSe)<sub>2</sub> exerted its hypolipidaemic effect in the management of hyperlipidaemia.

**Key words:** diphenyl diselenide; hypercholesterolaemia; oxidative stress; selenium; Triton WR-1339.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1:</b> Principais etapas da biossíntese de colesterol .....	05
<b>Figura 2:</b> Visão geral do metabolismo das lipoproteínas .....	08
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do (PhSe) <sub>2</sub> .....	17

### ARTIGO 1

<b>Figure 1:</b> Effect of Triton WR-1339 and diphenyl diselenide on plasma lipid levels in mice. (a) Cholesterol total, (b) high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, (c) non-HDL-cholesterol, and (d) triglyceride levels from plasma of male adult mice .....	24
--	----

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1:** Principais classes de lipoproteínas humanas e suas características .... 07

**Tabela 2:** Valores de referência dos lipídios plasmáticos para indivíduos maiores de 20 anos de idade ..... 12

### ARTIGO 1

**Table 1:** Effect of Triton WR-1339 and diphenyl diselenide on parameters of oxidative stress from liver of male adult mice ..... 24



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT = acil-CoA-colesterol aciltransferase  
Apo = apolipoproteína  
CAT = catalase  
DHGNA = Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica  
EHNA = Esteato-Hepatite Não Alcoólica  
EROS = espécies reativas de oxigênio  
GSH = glutationa  
GPx = glutationa peroxidase  
GR = glutationa redutase  
HDL = lipoproteína de alta densidade  
HMG-CoA = 3-hidróxi 3-metilglutaril co-enzima A  
IDL = lipoproteína de densidade intermediária  
i.p. = intraperitonal  
i.v. = intravenosa  
LCAT = lecitina-colesterol aciltransferase  
LDL = lipoproteína de baixa densidade  
LDLR = receptores de LDL  
(PhSe)<sub>2</sub> = disseleneto de difenila  
ppm = partes por milhão  
ROS = reactive oxygen species  
SOD = superóxido dismutase  
SR-B1 = scavenger receptor class B, type 1  
TBARS = thiobarbituric acid reactive species  
VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>03</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>03</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>03</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>04</b>
<b>3.1 Lipídios Plasmáticos</b> .....	<b>04</b>
3.1.1 Colesterol .....	04
3.1.1.1 Fontes Endógenas de Colesterol .....	04
3.1.1.2 Fontes Exógenas de Colesterol .....	06
3.1.2 Triglicerídeos .....	06
<b>3.2 Lipoproteínas Plasmáticas</b> .....	<b>07</b>
<b>3.3 Metabolismo das Lipoproteínas Plasmáticas</b> .....	<b>08</b>
3.3.1 Quilomícron .....	09
3.3.2 VLDL .....	09
3.3.3 IDL .....	09
3.3.4 LDL .....	10
3.3.5 HDL .....	10
<b>3.4 Dislipidemias</b> .....	<b>11</b>
3.4.1 Classificação das Dislipidemias .....	11
3.4.1.1 Classificação Laboratorial .....	11
3.4.1.2 Classificação Etiológica .....	12
<b>3.5 Dislipidemias e Dano Hepático</b> .....	<b>13</b>
<b>3.6 O Papel do Estresse Oxidativo</b> .....	<b>14</b>
<b>3.7 Selênio e Hipercolesterolemia</b> .....	<b>15</b>

3.7.1 Disseleneto de Difenila .....	17
<b>3.8 Modelos Empregados para o Estudo da Hiperlipidemia .....</b>	<b>18</b>
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Atividade hipolipidêmica da administração oral de disseleneto de difenila na hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 em camundongos .....</b>	<b>20</b>
4.1.1 Artigo 1: Hypolipidaemic Activity of Orally Administrated Diphenyl Diselenide in Triton WR-1339-induced Hyperlipidaemia in Mice .....	21
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>31</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>32</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item ARTIGO CIENTÍFICO. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no ARTIGO CIENTÍFICO e representam a íntegra deste estudo. Os itens, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES, encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico neste trabalho. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, o fígado desempenha um papel extremamente importante na manutenção da homeostase do metabolismo lipídico (Lee & Glimcher, 2009).

O colesterol é um dos constituintes essenciais da maioria das membranas biológicas, além de atuar como precursor para a síntese de ácidos biliares, hormônios e vitaminas (Repa & Mangelsdorf, 2000). Os níveis plasmáticos de colesterol são regulados através da sua absorção pela dieta, excreção via esteróides fecais ou ácidos biliares, síntese endógena de colesterol e remoção do colesterol presente na circulação sanguínea (Byington et al., 1995).

Em situações normais, estes mecanismos de absorção, biossíntese e excreção funcionam de maneira coordenada para manter o funcionamento adequado do metabolismo dos lipídios plasmáticos. Entretanto, problemas na regulação desses mecanismos têm sido implicados na ocorrência de dislipidemias, em outras palavras, alterações na concentração adequada de lipídios no plasma (Repa & Mangelsdorf, 2000).

Estudos recentes têm demonstrado a existência de uma associação entre o aumento na concentração plasmática de lipídios (hiperlipidemia) e a ocorrência de dano hepático de origem oxidativa, uma vez que a hiperlipidemia afeta negativamente os sistemas de defesa antioxidantes (Oh et al., 2006; Kumar et al., 2006).

Além disso, também tem sido evidenciado que a deficiência de selênio (Se) está relacionada ao aumento nos níveis plasmáticos de colesterol em seres humanos (Stone et al., 1986; Suadicani et al., 1992) e animais (Thomas et al., 1993; Lee et al., 2003). O Se, considerado um elemento traço essencial da dieta de animais e humanos, está presente sob a forma de selenocisteína no sítio ativo de importantes enzimas biológicas (Weitzel & Wendel, 1993).

Durante as últimas décadas, o interesse nos compostos orgânicos de Se tem sido intensificado, principalmente devido ao fato de que uma variedade destes compostos possui importantes propriedades farmacológicas (Nogueira et al., 2004). Dentre esses compostos, o disseleneto de difenila ((PhSe)<sub>2</sub>) tem demonstrado um potencial bastante promissor em prevenir os efeitos tóxicos provocados pelo estresse oxidativo. Em adição ao seu efeito antioxidante, o (PhSe)<sub>2</sub> também possui outras propriedades farmacológicas, podendo-se citar

neuroprotetora (Ghisleni et al., 2003), antiinflamatória e antinociceptiva (Nogueira et al., 2003a), hepato-protetora (Borges et al., 2005a), entre outras.

Desse modo, tendo em vista a existência de uma significativa relação entre o micronutriente Se e a ocorrência de alterações nos níveis de lipídios plasmáticos, torna-se interessante a busca por compostos orgânicos de Se que apresentem atividade hipolipidêmica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo investigar um possível efeito hipolipidêmico do  $(\text{PhSe})_2$ , um composto orgânico de Se, no modelo de hiperlipidemia aguda induzida por Triton WR-1339 em camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

Considerando os aspectos já mencionados, os objetivos específicos deste trabalho compreenderam:

- Avaliar a eficácia do  $(\text{PhSe})_2$  em reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol não-HDL e triglicerídeos em camundongos com hiperlipidemia aguda induzida por Triton WR-1339, bem como aumentar os níveis de HDL-colesterol nesses animais;

- Investigar se a hiperlipidemia aguda induzida pela administração de Triton WR-1339 altera parâmetros relacionados à ocorrência de dano oxidativo no tecido hepático de camundongos;

- Determinar se o efeito antioxidante do  $(\text{PhSe})_2$  está presente nesse processo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Lipídios Plasmáticos

Os lipídios biológicos constituem um grupo de compostos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, exibem, como característica principal e comum a insolubilidade em água. Clinicamente, os lipídios plasmáticos mais importantes são o colesterol e os triglicerídeos (também chamados triacilgliceróis) (Brown & Goldstein, 1986; Oh et al., 2006).

##### 3.1.1 Colesterol

O colesterol é um lipídio que apresenta em sua estrutura química um grupo-cabeça polar hidroxila e corpo hidrocarbônico apolar (composto por um núcleo esteróide e uma cadeia lateral hidrocarbonada) (Nelson & Cox, 2006)

Dentre as numerosas funções biológicas desempenhadas pelo colesterol, pode-se destacar que ele atua como componente das membranas celulares, serve como precursor para a síntese de hormônios esteróides, vitamina D, oxisteróis e ácidos biliares, além de ser necessário para a ativação de moléculas que atuam na sinalização neuronal (Brown & Goldstein, 1986; Repa & Mangelsdorf, 2000; Hegele, 2009).

Apenas uma pequena quantidade do colesterol circulante é originada a partir da alimentação; cerca de 80% é derivada da síntese endógena que ocorre no fígado (Hegele, 2009).

##### 3.1.1.1 Fontes Endógenas de Colesterol

O fígado é considerado o principal órgão encarregado da biossíntese de colesterol, sendo responsável por produzir quase a totalidade do colesterol que circula na corrente sanguínea e aquele para ser estocado no tecido hepático sob a forma de ésteres de colesterol (Repa & Mangelsdorf, 2000). A homeostase do colesterol no organismo é mantida principalmente através da regulação da atividade da enzima 3-hidróxi 3-metilglutaril co-enzima A (HMG-CoA) redutase (Brown &



Goldstein, 1986), a qual catalisa o passo limitante na biossíntese do colesterol (Ness & Chambers, 2000) (Figura 1).

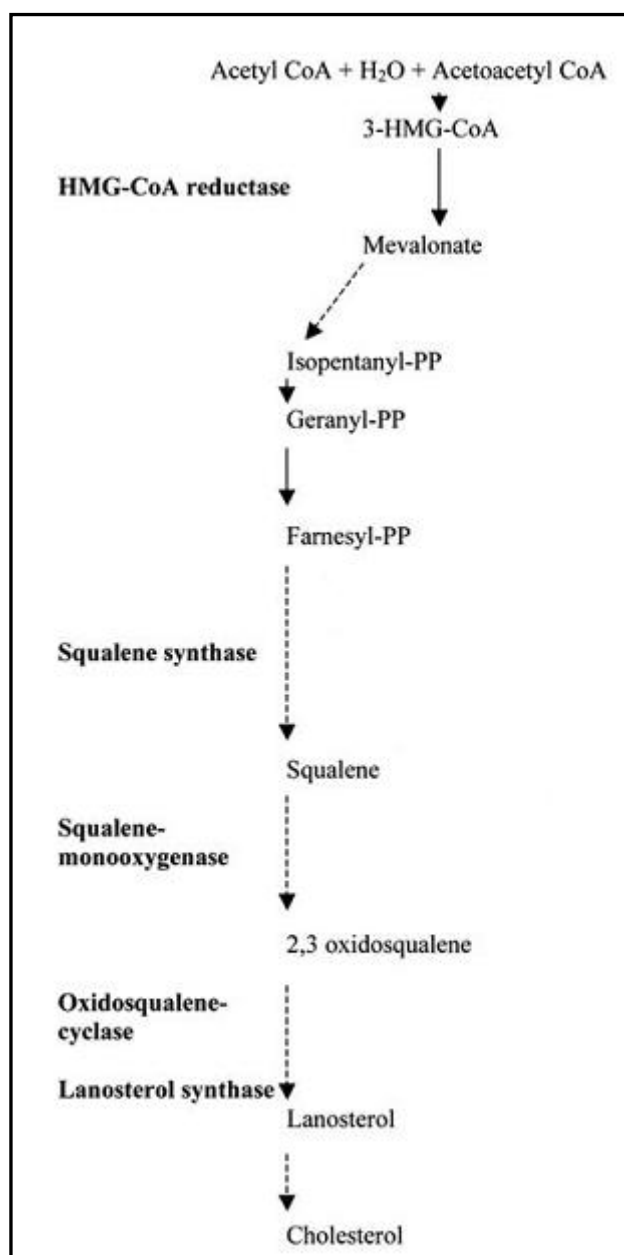


Figura 1: Principais etapas da biossíntese de colesterol (Adaptado de: Charlton-Menys V., Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol* 2007; 93: 27–42)

A maior parte do colesterol produzido no fígado é exportada na forma de colesterol biliar, ácidos biliares e ésteres de colesterol. Os ácidos biliares e seus sais são relativamente hidrofílicos e auxiliam no processo de digestão de lipídios. Os ésteres de colesterol são formados no próprio fígado por meio da ação da enzima acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT), a qual catalisa a transferência de um

ácido graxo da coenzima-A para o grupo hidroxila do colesterol, tornando-o ainda mais hidrofóbico. Os ésteres de colesterol são armazenados no fígado ou então transportados inseridos em partículas lipoprotéicas para os tecidos extra-hepáticos (Nelson & Cox, 2006).

Entretanto, a quantidade de colesterol que é sintetizada endogenamente varia de espécie para espécie. Um homem adulto que pese em torno de 70 kg produz de 600-900 mg de colesterol por dia (Gylling et al., 1994) enquanto que um camundongo produz cerca de 3 mg/dia (Schwarz et al., 1998).

### 3.1.1.2 Fontes Exógenas de Colesterol

Do ponto de vista nutricional, o colesterol não pode ser considerado um nutriente essencial, uma vez que o organismo possui meios para sintetizar as quantidades necessárias para a manutenção de suas necessidades diárias. Apesar disso, quantidades significativas de colesterol proveniente da dieta entram no lúmen intestinal todos os dias. A ingesta pela alimentação varia de 0,1 g em indivíduos que seguem uma dieta com quantidades mínimas de colesterol, até cerca de 1 g naqueles com dietas sem qualquer tipo de restrição (Vuoristo & Miettinen, 1994).

### 3.1.2 Triglicerídeos

Os triglicerídeos são moléculas que apresentam uma função chave no fornecimento de energia aos organismos vivos. Sob o ponto de vista químico, eles são constituídos pela ligação éster de três ácidos graxos livres a uma molécula de glicerol (Hegele, 2009).

As duas principais fontes de triglicerídeos no plasma são a exógena (originada a partir dos ácidos graxos ingeridos na dieta) e a endógena (resultante da biossíntese de triglicerídeos no tecido hepático) (Yuan et al., 2007). O processo de síntese de triglicerídeos no fígado recebe o nome de lipogênese e é resultante da conversão do excesso de carboidratos, ingeridos através da alimentação, em triglicerídeos (Towle et al., 1997).

Logo após as refeições, em torno de 90% dos triglicerídeos circulantes no plasma são secretados sob a forma de quilomícrons sendo oriundos do intestino;

entretanto, durante períodos de jejum, observa-se o predomínio dos triglicerídeos de origem endógena que são secretados pelo fígado (Yuan et al., 2007).

### 3.2 Lipoproteínas Plasmáticas

A insolubilidade do colesterol e dos ésteres de colesterol, como os triglicerídeos e os fosfolipídios, no plasma sanguíneo requer que eles sejam transportados dentro de moléculas esferoidais denominadas de lipoproteínas. As lipoproteínas são constituídas por um núcleo hidrofóbico contendo fosfolipídeos, ésteres de colesterol, antioxidantes e vitaminas lipossolúveis, e uma camada externa hidrofílica, a qual contém colesterol livre, fosfolipídeos e proteínas (chamadas de apolipoproteínas ou “apo”) (Hegele, 2009). As apolipoproteínas têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, dentre elas montagem da partícula (apo B100 e B48), meio ligante a receptores de membrana que captam as lipoproteínas para o interior da célula (apo B100 e E) ou co-fatores enzimáticos (apos CII, CIII e AI) (III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, 2001).

Diferentes combinações de lipídios e proteínas resultam em partículas com características diferentes. Por essa razão, as lipoproteínas podem ser distinguidas entre si pelo seu tamanho, densidade, composição, função e mobilidade eletroforética (Hegele, 2009).

As principais lipoproteínas carreadoras de triglicerídeos são os quilomícrons e as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, “very low-density lipoprotein”). Já as principais carreadoras de colesterol são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL, “low-density lipoprotein”) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL, “high-density lipoprotein”) (Hegele, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1: Principais classes de lipoproteínas humanas e suas características

Lipoproteína	Densidade (g/ml)	Composição (% em peso)				
		Proteínas	Fosfolipídios	Colesterol livre	Ésteres de colesterol	Triglicerídeos
Quilomícron	< 1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	15	4

(Adaptado de: Kritchevsky D. Atherosclerosis and Nutrition. Nutr Int 1986; 2: 290-7)

### 3.3 Metabolismo das Lipoproteínas Plasmáticas

O metabolismo das lipoproteínas plasmáticas é um processo bastante complexo, o qual envolve etapas e órgãos diferentes (Hegele, 2009) (Figura 2).

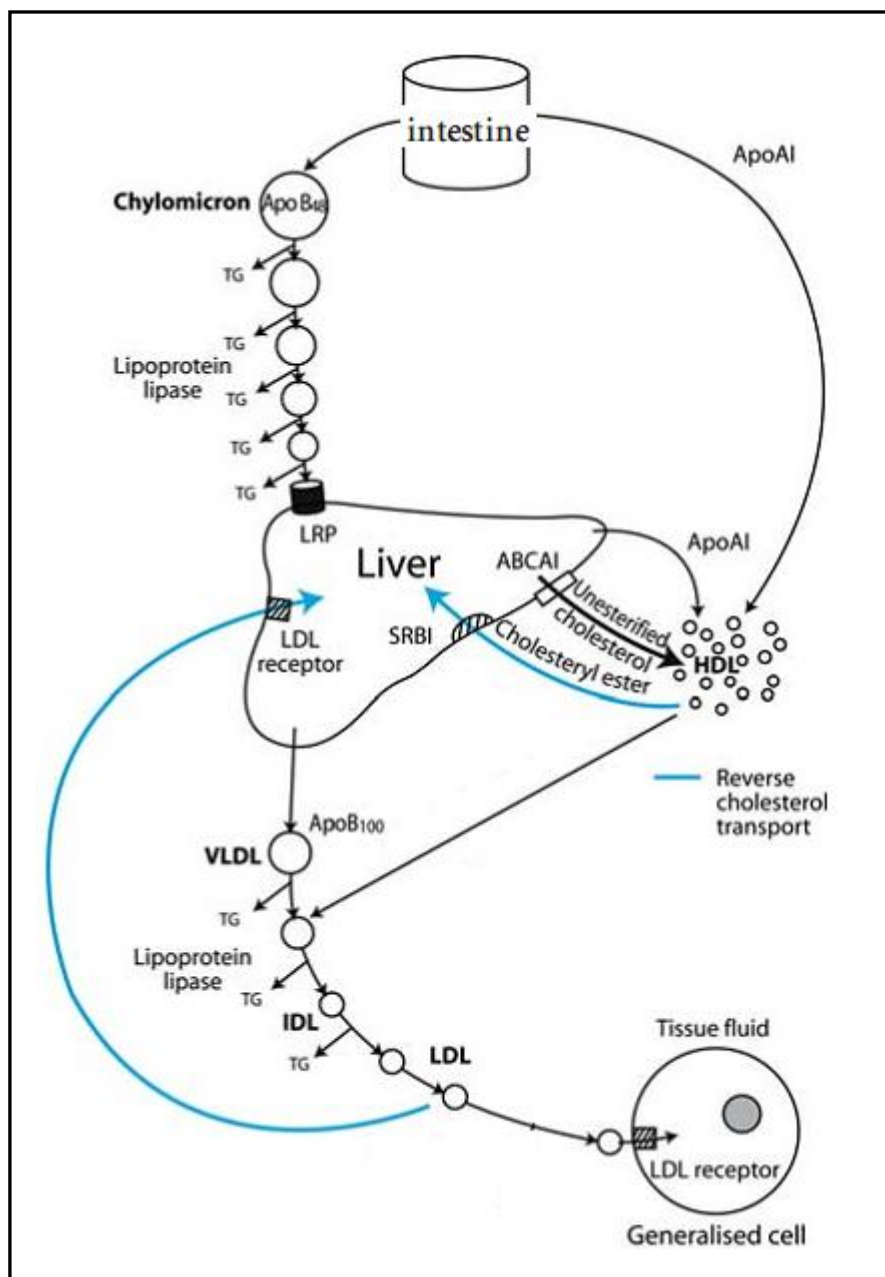


Figura 2: Visão geral do metabolismo das lipoproteínas (Adaptado de: Charlton-Menys V., Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. Exp Physiol 2007; 93: 27–42)

### 3.3.1 Quilomícron

Os quilomícrons são as maiores lipoproteínas e também as menos densas, contendo uma grande proporção de triglicerídeos. Os quilomícrons são sintetizados no retículo endoplasmático das células epiteliais que recobrem a superfície interna do intestino delgado e, então, são transportados através do sistema linfático e entram na corrente sanguínea pela veia subclávia. As apolipoproteínas presentes nos quilomícrons incluem a apoB-48, apoE e apoC-II. A apoC-II presente nos quilomícrons ativa a lipase lipoproteica presente nos capilares dos tecidos adiposo, cardíaco, músculo-esquelético e glândula mamária em lactação, de modo a permitir a liberação dos ácidos graxos livres para tais tecidos. Os remanescentes dos quilomícrons, ainda contendo colesterol, apolipoproteínas e alguns triglicerídeos, movem-se via corrente sanguínea até o fígado, onde serão absorvidos por endocitose mediante a ligação da apoE a receptores presentes nesse órgão. No fígado, os quilomícrons liberam o colesterol e posteriormente são degradados nos lisossomos (Nelson & Cox, 2006; Charlton-Menys & Durrington, 2007).

### 3.3.2 VLDL

Tanto os triglicerídeos provenientes da alimentação quanto aqueles que são sintetizados endogenamente a partir do excesso de carboidratos ingeridos na dieta são unidos, no fígado, a apolipoproteínas específicas para formar as VLDL. Essas lipoproteínas são compostas por triglicerídeos, colesterol, ésteres de colesterol, bem como apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE. As VLDL são transportadas do fígado para os músculos e para o tecido adiposo, locais nos quais a ativação de lipase lipoproteica pela apoC-II promove a liberação dos ácidos graxos livres contidos no interior das VLDL (Nelson & Cox, 2006; Charlton-Menys & Durrington, 2007).

### 3.3.3 IDL

A perda de triglicerídeos faz com que algumas VLDL sejam convertidas em remanescentes de VLDL (também chamadas de IDL, “intermediate density lipoprotein”) (Nelson & Cox, 2006; Charlton-Menys & Durrington, 2007).

### 3.3.4 LDL

Com a extração de mais lipídios das IDL, estas são gradualmente convertidas em LDL. Extremamente ricas em colesterol e ésteres de colesterol e contendo apoB-100 como principal apoproteína, as LDL transportam o colesterol para os tecidos extra-hepáticos, os quais possuem em suas células receptores de superfície específicos para a ligação da apoB-100 (LDLR, “receptores de LDL”). Nesse processo, denominado “endocitose mediada por receptores”, a ligação da apoB-100 aos LDLR inicia a formação de um endossomo. Esse endossomo se funde a lisossomos contendo enzimas que hidrolizam os ésteres de colesterol, liberando o colesterol e os ácidos graxos no interior do citosol. O colesterol liberado pode ser incorporado nas membranas ou pode ser reesterificado pela enzima ACAT para ser armazenado no interior de gotículas lipídicas citosólicas (Nelson & Cox, 2006; Charlton-Menys & Durrington, 2007).

### 3.3.5 HDL

As HDL são sintetizadas no fígado e no intestino delgado como partículas pequenas, ricas em proteína e contendo relativamente pouco colesterol e nenhum éster de colesterol. As HDL contém principalmente apoA-1, apoC-I e apoC-II. A enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) existente na superfície das HDL recém-sintetizadas (HDL nascentes) catalisa a formação de ésteres de colesterol a partir da lecitina (fosfatidilcolina) e do colesterol contidos nos remanescentes dos quilomícrons e nas VLDL. Os ésteres de colesterol formados entram no interior da HDL nascente, convertendo-a do formato de um disco chato a uma forma esférica, a chamada HDL madura. Essa HDL madura retorna ao fígado e liga-se a receptores de membrana chamados SR-B1 (scavenger receptor class B, type 1). Os SR-B1 medeiam a transferência parcial e seletiva do colesterol e outros lipídios da HDL para o hepatócito, onde o colesterol liberado será, em parte, convertido em sais biliares. Após esse processo, a HDL se dissocia para recircular na corrente sanguínea e extrair mais lipídios dos remanescentes de quilomícrons e das VLDL (Nelson & Cox, 2006; Charlton-Menys & Durrington, 2007).

Além do papel já mencionado, as HDL também podem captar o colesterol estocado nos tecidos extra-hepáticos e transportá-lo para o fígado, em um processo

conhecido como Transporte Reverso do Colesterol (Fielding e Fielding, 1995). Esse transporte reverso pode acontecer por meio de duas vias. Em uma delas, a interação das HDL nascentes com os receptores SR-B1, presentes nas células ricas em colesterol, aciona o movimento passivo do colesterol da superfície celular para a HDL. Na outra via, a apoA-1 presente nas HDL interage com um transportador ativo, a proteína ABC1, presente nas células ricas em colesterol, fazendo com que a HDL seja captada e em seguida secretada contendo uma carga de colesterol para ser transportado ao fígado (Nelson & Cox, 2006).

No fígado, o colesterol liberado pode ser reciclado na forma de lipoproteínas para ser secretado novamente no plasma ou então ser convertido em ácidos biliares, embora parte dele apareça na bile sob a forma de colesterol livre (Fielding e Fielding, 1995).

### 3.4 Dislipidemias

As desordens do colesterol e do metabolismo lipídico são denominadas de dislipidemias e podem ser associadas à incidência de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão e esteatose hepática (Muscat et al., 2002).

#### 3.4.1 Classificação das Dislipidemias

De acordo com o documento III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, publicado em 2001, as dislipidemias podem ser submetidas a dois tipos de classificação: Laboratorial e Etiológica.

##### 3.4.1.1 Classificação Laboratorial

Compreende quatro tipos principais bem definidos:

- Hipercolesterolemia isolada: Elevação isolada do colesterol total, em geral representada por aumento do LDL-colesterol .
- Hipertrigliceridemia isolada: Elevação isolada dos triglicerídeos, em geral representada por aumento das VLDL, ou dos quilomícrons, ou de ambos.

- Hiperlipidemia mista: Valores aumentados do colesterol total e dos triglicerídeos. 12
- HDL-Colesterol baixo: Isolado ou em associação com aumento de LDL-colesterol e/ou de triglicerídeos.

Os valores de referência para o diagnóstico laboratorial das dislipidemias em adultos maiores de 20 anos encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Valores de referência dos lipídios plasmáticos para indivíduos maiores de 20 anos de idade

Lipídios	Valores (mg/dl)	Categoria
Colesterol Total	< 200	Ótimo
	200-239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL-colesterol	< 100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto
HDL-colesterol	< 40	Baixo
	> 60	Alto
Triglicerídeos	< 150	Ótimo
	150-200	Limítrofe
	201-499	Alto
	≥ 500	Muito alto

(Adaptado de: III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol 2001; 77: 4-48)

#### 3.4.1.2 Classificação Etiológica

De acordo com sua etiologia, as dislipidemias são classificadas em Primárias ou Secundárias.



## A) Dislipidemias Primárias

13

São conseqüentes a causas genéticas. Algumas delas manifestam-se apenas em função da influência de fatores ambientais, devido à dieta inadequada e/ou ao sedentarismo. As dislipidemias primárias englobam as Hiperlipidemias (aumentos nos níveis plasmáticos de lipídios) e as Hipolipidemias (diminuições nos níveis plasmáticos de lipídios).

## B) Dislipidemias Secundárias

A identificação de uma possível causa secundária das dislipidemias vem se tornando mais comum em função da maior experiência acumulada na investigação etiológica das alterações lipídicas. O crescimento da população idosa é um fator que vem sendo associando à maior freqüência de dislipidemias secundárias devido à elevada incidência de co-morbidades presentes nas faixas etárias mais avançadas.

Basicamente, podem ser encontrados três grupos de etiologias secundárias:

- Dislipidemias secundárias a doenças (diabetes melito tipo II, hipotireoidismo, síndrome nefrótica, hepatopatias, entre outras);
- Dislipidemias secundárias a medicamentos (anti-hipertensivos, corticosteróides, estrógenos, entre outros);
- Dislipidemias secundárias a hábitos de vida inadequados (dieta, tabagismo e etilismo).

## 3.5 Dislipidemias e Dano Hepático

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo lipídico, uma vez que ele está intimamente envolvido nos processos de síntese, oxidação, transporte e excreção dos lipídios (Lee & Glimcher, 2009). Por esse motivo, é plausível estudar os distúrbios hepáticos relacionados às dislipidemias (Kumar et al., 2006).

O acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, principalmente sob a forma de ácidos graxos livres e triglicerídeos, é considerado o primeiro passo rumo ao desenvolvimento de Esteato-Hepatite (Marí et al., 2006).

O termo Esteato-Hepatite Não Alcoólica (EHNA) foi cunhado pela primeira vez em 1980 por Ludwig et al. para designar as alterações histológicas que mimetizavam

a hepatite alcoólica em pacientes sem história de alcoolismo. A presença de dislipidemia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ou ambas) constitui um achado bastante freqüente nos pacientes com EHNA, sendo referida em 20% a 80% dos casos (Ludwig et al., 1980).

Pode-se dizer que a designação Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) abrange um largo espectro de problemas hepáticos, dentre eles, esteatohepatite, esteatonecrose e EHNA. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de DHGNA e EHNA incluem desordens do metabolismo energético, como por exemplo, obesidade, diabetes mellitus tipo II e hiperlipidemia (Ludwig et al., 1997; Bugianesi et al., 2005). Juntas, EHNA e DHGNA figuram entre as causas de esteatose hepática mais freqüentes nos EUA (Mattos, 2005).

A grande maioria dos dados encontrados na literatura assume que a DHGNA resulta do acúmulo de triglicerídeos no citoplasma dos hepatócitos. Contudo, o potencial patogênico dos outros lipídios não pode ser desconsiderado, uma vez que há evidências sugerindo a ocorrência de danos celulares e teciduais ao fígado associados ao aumento dos níveis plasmáticos de colesterol (Tabas, 2002).

Histologicamente, tanto DHGNA quanto EHNA são caracterizadas pela presença de esteatose macrovesicular, infiltração de células inflamatórias, fibrose, necrose e, por fim, cirrose (Ludwig et al., 1997; Carmiel-Haggai et al., 2004). Em meio a esse contexto, faz-se necessário salientar que a progressão das esteatoses hepáticas é acompanhada pelo desencadeamento de eventos relacionados ao estresse oxidativo (Marí et al., 2006).

### 3.6 O Papel do Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo corresponde a uma excessiva formação endógena de radicais livres, os quais podem induzir um grande número de alterações nos constituintes celulares, incluindo inativação de enzimas, danos às bases nitrogenadas dos ácidos nucléicos e a proteínas, bem como peroxidação dos lipídios de membrana (Ha et al., 2006). O conceito formulado por Sies (1997) caracteriza estresse oxidativo como sendo um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, com potencial para ocasionar dano celular.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são importantes moléculas que funcionam como sinalizadores vasculares e mediadoras de estresse oxidativo. Elas correspondem a intermediários altamente reativos do metabolismo fisiológico do oxigênio, as quais são constantemente geradas e destruídas por sistemas biológicos endógenos. Produzidas através da redução molecular do oxigênio, as EROS incluem tanto os radicais livres instáveis (espécies químicas que apresentam elétrons não pareados na última camada orbital), como os radicais superóxido e hidroxil, quanto moléculas estáveis, a exemplo do peróxido de hidrogênio (Szasz et al., 2007).

De modo a manter a homeostase redox, as células desenvolveram sofisticados sistemas antioxidantes capazes de neutralizar o excesso de EROS (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estes sistemas são compostos por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) e por antioxidantes não-enzimáticos com a glutathione (GSH) e as vitaminas C e E (Fridovich, 1999).

Uma das formas de resposta celular mais comuns tanto a hipercolesterolemia quanto ao aumento na quantidade de colesterol intracelular corresponde a indução da produção de EROS (Lu et al., 2007). Em vista disso, o estresse oxidativo é constantemente sugerido como um dos mecanismos adjacentes a hipercolesterolemia (Penn & Chisolm, 1994). Entretanto, tem sido relatado que outras fontes de EROS também podem participar da injúria ao tecido hepático induzida pelo aumento nas concentrações de colesterol intracelular. Trabalhos publicados por Marí et al. (2006) e por Lu et al. (2007) demonstraram que o acúmulo de colesterol no interior das mitocôndrias resulta em depleção dos níveis de glutathione nessas organelas.

Como resultado do aumento na produção de EROS durante a hiperlipidemia, observa-se uma redução na eficácia dos sistemas de defesa antioxidantes. Conseqüentemente, essa condição resulta na ocorrência de danos celulares e teciduais provocados pelas EROS (Halliwell & Gutteridge, 1999).

### 3.7 Selênio e Hipercolesterolemia

Descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius, o elemento químico Se é um dos calcogênios que fazem parte do grupo 16 da tabela periódica

(Papp et al., 2007; Lu e Holmgren, 2009). No entanto, foi apenas na década de 1950 que o Se passou a ser reconhecido como um micronutriente essencial na dieta de seres humanos e animais (Schwarz et al., 1957).

Apesar de já estar reconhecido como nutriente fundamental, todas as tentativas no intuito de descobrir funções bioquímicas para o Se nos organismos de animais foram infrutíferas até 1973, quando pesquisadores demonstraram que o Se estava presente no sítio ativo da enzima GPx (Rotruck et al., 1973). A GPx é uma enzima responsável por reduzir hidroperóxidos a água e oxigênio, fazendo parte dos mecanismos de proteção antioxidante das células (Combs Jr & Gray, 1998).

Dessa forma, o papel do Se para a saúde humana tornou-se cada vez mais evidente com a descoberta de isoformas da GPx também Se-dependentes (Takahashi & Cohen, 1986; Ursini et al., 1985; Chu et al., 1993), além de outras selenoenzimas e selenoproteínas, a exemplo da iodotironina 5'-deiodinase (Arthur et al., 1990; Davey et al., 1995; Croteau et al., 1995; Larsen & Berry, 1995), tioredoxina redutase (Takashi & Stadtman, 1996), selenoproteína P plasmática (Åkesson et al., 1994), e selenoproteína W muscular (Vendeland et al., 1995) que atuam na manutenção da homeostase metabólica ou participam das defesas antioxidantes celulares (Kohrle et al. 2000, Rayman 2000).

Nos últimos anos, têm sido descrito que baixos níveis de Se podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doenças cardiovasculares, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000).

Estudos empregando roedores como modelos animais têm demonstrado que a deficiência de Se resulta em um significativo aumento nos níveis plasmáticos de colesterol (Stone et al. 1986). Mazur et al. (1996) e Nassir et al. (1997) evidenciaram que o aumento nos níveis de colesterol plasmático observado durante a deficiência de Se está associado a mudanças nas concentrações de lipoproteínas e apolipoproteínas no sangue. Além disso, Dhingra e Bansal (2006) demonstraram que ratos cuja ração foi suplementada com 1 ppm Se apresentaram, após 3 meses, um aumento tanto na expressão do mRNA quanto na atividade dos LDLR.

Neste contexto, a suplementação de dietas com selênio nas doses de 50-200 mg por dia é considerada segura e saudável para seres humanos adultos. Entretanto, sabe-se que a concentração alimentar normal requerida de selênio é muito próxima da dose que pode ser tóxica (Oldfield, 1987). De fato, estudos

demonstraram que altas doses de selênio podem ser citotóxicas, uma vez que possuem a habilidade de oxidar grupos tióis e gerar radicais livres (Barbosa et al. 1998; Nogueira et al. 2004).

### 3.7.1 Disseleneto de Difenila

Considerando as importantes funções biológicas desempenhadas pelo Se, tem sido verificado, nas últimas décadas, um crescente interesse no desenvolvimento de compostos organocalcogênicos contendo Se que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham & Graf, 1991; Nogueira et al., 2004).

Dentre tais compostos, merece especial destaque o disseleneto de difenila ( $\text{PhSe})_2$  (Figura 3). De fato, estudos em animais de laboratório têm demonstrado que este composto apresenta importantes propriedades dentre as quais se pode citar neuroprotetora (Ghisleni et al., 2003), antiinflamatória e antinociceptiva (Nogueira et al., 2003a), hepato-protetora (Borges et al., 2005a), anti-hiperglicêmica (Barbosa et al., 2006), antiúlcera (Savegnago et al., 2006), antidepressiva e ansiolítica (Savegnago et al., 2008), além de induzir a melhoras na performance cognitiva de roedores (Stangherlin et al., 2008). Além disso, o  $(\text{PhSe})_2$  apresenta efeitos antioxidantes em diversos modelos de toxicidade induzida por estresse oxidativo (Meotti et al., 2004; Santos et al., 2005; Luchese et al., 2009). Nogueira et al. (2004) sugerem que, pelo fato do  $(\text{PhSe})_2$  possuir atividades semelhantes as da enzima GPx,, este composto é um bom candidato a ser um agente antioxidante.

Nesse contexto, faz-se necessário mencionar o trabalho publicado por de Bem et al. (2009), o qual demonstra que coelhos que receberam uma ração rica em colesterol e suplementada com 10 ppm. de  $(\text{PhSe})_2$  durante um período 45 dias apresentavam níveis séricos de colesterol total diminuídos quando comparados aos coelhos cuja ração rica em colesterol não continha a suplementação com  $(\text{PhSe})_2$ .

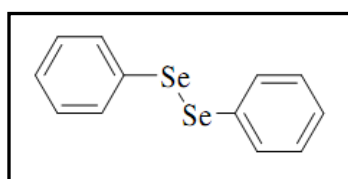


Figura 3: Estrutura química do  $(\text{PhSe})_2$

Embora o  $(\text{PhSe})_2$  apresente consideráveis propriedades farmacológicas, trabalhos também têm evidenciado a ocorrência de alguns efeitos tóxicos. Inibições nas atividades das enzimas  $\delta$ -ALA-D (Nogueira et al., 2003b) e  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (Borges et al., 2005b) são observadas e o potencial pró-oxidante do  $(\text{PhSe})_2$  parece estar envolvido nestes efeitos. Efeitos neurotóxicos do  $(\text{PhSe})_2$  também são relatados (Nogueira et al., 2003c), incluindo a indução de convulsões (Prigol et al., 2008). Entretanto, tais efeitos neurotóxicos são observados apenas quando o  $(\text{PhSe})_2$  é administrado em altas doses (Prigol et al., 2009). O  $(\text{PhSe})_2$  pode ainda afetar o sistema glutamatérgico em plaquetas humanas (Borges et al., 2004) e de ratos (Nogueira et al., 2001) e dados da literatura também indicam que o  $(\text{PhSe})_2$  pode causar toxicidade em fetos de ratas tratadas com este composto (Favero et al., 2005; Weis et al., 2007).

### 3.8 Modelos Empregados para o Estudo da Hiperlipidemia

Os estudos destinados à triagem de compostos que apresentam função hipolipidêmica freqüentemente requerem a utilização modelos animais, geralmente coelhos, ratos ou camundongos. Dentre os métodos empregados para provocar o aumento nos níveis de lipídeos plasmáticos, podem ser destacados o uso de dietas suplementadas com colesterol (Kumar et al., 2006) e o emprego de substâncias surfactantes, a exemplo do Poloxamer-407 e do Triton WR-1339 (Jung et al., 2007).

O Triton WR-1339 é um detergente não-iônico amplamente utilizado para produzir hiperlipidemia aguda em modelos animais, sendo por essa razão, empregado tanto para o estudo do metabolismo do colesterol e dos triglicerídeos bem como para a triagem de drogas hipolipemiantes (Schurr et al., 1972; Goldfarb, 1978; Oh et al., 2006; Harnafi et al., 2008).

O mecanismo pelo qual a administração intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.) do Triton WR-1339 determina a ocorrência de hiperlipidemia aguda deve-se a inibição da atividade da enzima lipase lipoproteica, o que resulta no acúmulo de triglicerídeos e VLDL no plasma (Janicki & Aron, 1962). Conseqüentemente, isso provoca um significativo aumento na biossíntese hepática de colesterol por estimular a atividade da enzima HMG-CoA redutase (Goldfarb, 1978; Kuroda et al. 1997).

#### **4 ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo, estruturados de acordo com as normas da revista *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

## **4.1 Atividade hipolipidêmica da administração oral de disseleneto de difenila na hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 em camundongos**

### **4.1.1 Artigo 1**

Hypolipidaemic Activity of Orally Administrated Diphenyl Diselenide in Triton WR-1339-induced Hyperlipidaemia in Mice

Juliana Trevisan da Rocha, Adriane Sperança, Cristina Wayne Nogueira, Gilson Zeni

*Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009; 61: 1673-1679.



## Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice

Juliana Trevisan da Rocha, Adriane Sperança,  
Cristina Wayne Nogueira and Gilson Zeni

Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios,  
Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

### Abstract

**Objectives** A significant association between the trace element selenium and hypercholesterolaemia has been reported. This study was designed to investigate a potential hypolipidaemic effect of diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>) in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice.

**Methods** Triton was administered intraperitoneally (400 mg/kg) to overnight-fasted mice to develop acute hyperlipidaemia. (PhSe)<sub>2</sub> was administered orally (10 mg/kg) 30 min before Triton. At 24 h after Triton injection, blood samples were collected to measure plasma lipid levels. The hepatic thiobarbituric acid reactive substances and ascorbic acid levels as well as catalase and glutathione peroxidase activity were recorded.

**Key findings** (PhSe)<sub>2</sub> administration significantly lowered total cholesterol, non-high-density lipoprotein-cholesterol and triglycerides, whilst it increased high-density lipoprotein-cholesterol levels in plasma of hyperlipidaemic mice. Neither oxidative stress nor the antioxidant effect of (PhSe)<sub>2</sub> was observed in the mouse liver in this experimental protocol.

**Conclusions** These findings indicated that (PhSe)<sub>2</sub> was able to lower plasma lipid concentrations. Further studies are needed to elucidate the exact mechanism by which (PhSe)<sub>2</sub> exerted its hypolipidaemic effect in the management of hyperlipidaemia and atherosclerosis.

**Keywords** diphenyl diselenide; hypercholesterolaemia; oxidative stress; selenium; Triton WR-1339

### Introduction

Plasma lipid levels are determined by exogenous lipid absorption and endogenous lipid synthesis and metabolism in the body.<sup>[1]</sup> The majority of research on hyperlipidaemia has focused on the effects of a high cholesterol diet on atherosclerosis and coronary heart disease. However, hypercholesterolaemia could also lead to the accumulation of lipid droplets in the liver, resulting in hepatic damage, such as steatosis.<sup>[2]</sup>

The liver is a key organ for lipid metabolism since hepatic cholesterol uptake from serum, coupled with intracellular processing and biliary excretion are important features in the removal of excess cholesterol from the body.<sup>[3]</sup> The transport of excessive cholesterol from the periphery to the liver by high-density lipoprotein (HDL) (reverse cholesterol transport) alleviates the accumulation of cholesterol in the arterial wall, a critical step in atherogenesis.<sup>[4]</sup>

Taking into account that the liver plays a central role in the maintenance of systemic lipid homeostasis, it is especially susceptible to damage by reactive oxygen species (ROS).<sup>[5]</sup> Studies have demonstrated that hyperlipidaemia reduces the hepatic antioxidant defence system.<sup>[6,7]</sup> Thus, there is a relationship between hyperlipidaemia and hepatic oxidative damage.

The biochemistry and pharmacology of the trace element selenium (Se) is a subject of intense current interest, particularly from the viewpoint of public health.<sup>[8]</sup> Se is largely known to develop its biological activity as an integral part of several peroxidases and redox enzyme systems, which protect cells from oxidative stress.<sup>[9,10]</sup> Some studies have related the selenium status to increased plasma cholesterol concentration.<sup>[11–13]</sup> Dhingra and Bansal<sup>[14]</sup> reported the therapeutic potential of Se supplementation in lipid metabolism, by

**Correspondence:** Gilson Zeni,  
Departamento de Química,  
Centro de Ciências Naturais e  
Exatas, Universidade Federal  
de Santa Maria, Santa Maria,  
CEP 97105-900, RS, Brazil.  
E-mail: gzeni@pq.cnpq.br

**Author Copy:** This article was published by the Pharmaceutical Press, which has granted the author permission to distribute this material for personal or professional (non-commercial) use only, subject to the terms and conditions of the Pharmaceutical Press Licence to Publish. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, sub-licensing or modification of the whole or part of the article in any form is expressly forbidden.

demonstrating that 1 ppm Se supplementation down regulated apolipoprotein B and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase expression, a rate controlling enzyme in the cholesterol biosynthesis in animals, during hypercholesterolaemia in rats.

The interest in organoselenium pharmacology has increased in the last decade due to a variety of organoselenium compounds that possess biological activity.<sup>[15]</sup> In accordance, a number of novel pharmaceutical agents which are selenium-based or which target specific aspects of Se metabolism are under development.<sup>[16]</sup> In addition to their antioxidant property, Se compounds have been found to have neuroprotective, antinociceptive and anti-inflammatory properties.<sup>[16–18]</sup>

Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, an organoselenium compound, has been reported as a potential pharmacological and antioxidant agent.<sup>[15]</sup> Of particular importance, (PhSe)<sub>2</sub> inhibits lipid peroxidation in human isolated LDL *in vitro*. The protective effect of (PhSe)<sub>2</sub> against Cu<sup>2+</sup>-induced loss of tryptophan fluorescence indicated that, besides its beneficial effects against oxidation of lipid moieties of LDL, this organoselenium compound prevented the oxidation of protein moieties of human LDL, pointing to an additional mechanism that could contribute to the inhibition of the atherogenic process.<sup>[19]</sup>

Triton WR-1339 (an oxyethylated tertiary octyl phenol formaldehyde polymer), one of the well known nonionic detergents, has been used widely to produce acute hyperlipidaemia in animal models.<sup>[20,21]</sup> Thus, this study was designed to investigate a potential hypolipidaemic effect of (PhSe)<sub>2</sub> on Triton WR-1339-induced acute hyperlipidaemia in mice.

An important property of a compound that may affect hyperlipidaemia is its antioxidant capacity. Considering that liver is the major organ responsible for cholesterol transport, metabolism and excretion, it is reasonable to study hepatic lipaemic-oxidative disturbances in hypercholesterolaemia. Kumar *et al.*<sup>[7]</sup> demonstrated that there was a significant increase in hepatic markers of oxidative damage, such as lipid peroxidation, accompanied by deteriorating enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in rats fed a high cholesterol diet for 30 days. These findings were suggestive of signifying heightened oxidative injury in the liver. Thus, another objective of this study was to evaluate whether Triton WR-1339-induced acute hyperlipidaemia in mice altered some parameters of oxidative damage in the hepatic tissue and to assess whether the antioxidant effect of (PhSe)<sub>2</sub> was related to this process.

## Materials and Methods

### Chemicals

(PhSe)<sub>2</sub> was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described by Paulmier.<sup>[22]</sup> Analyses of the <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) and <sup>13</sup>C NMR spectrum showed that (PhSe)<sub>2</sub> obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of the compound (99.9%) was determined by gas chromatography/high-performance liquid

chromatography. (PhSe)<sub>2</sub> is a solid compound, very stable and can be stored in the laboratory in a simple flask for a long time. (PhSe)<sub>2</sub> was dissolved in canola oil. Triton WR-1339 (Tyloxapol) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and was dissolved in saline solution (pH 7.4). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### Experimental animals

Male adult Swiss mice (25–35 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on a 12 h light/dark cycle, at room temperature (22 ± 2°C), with free access to food and water. All experiments were approved by and supervised under 'The Ethic Committee for Animal and Human Experiment' according to the declaration of Helsinki 1975. All efforts were made to minimize suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

### Experimental design

Mice were fasted for 12 h and then divided into four groups. Group 1, control (*n* = 6): mice received canola oil (10 ml/kg, *p.o.*) 30 min before saline (2.5 ml/kg, *i.p.*). Group 2, (PhSe)<sub>2</sub> (*n* = 6): mice received (PhSe)<sub>2</sub> (10 mg/kg; 10 ml/kg, *p.o.*) 30 min before saline (2.5 ml/kg, *i.p.*). Group 3, Triton (*n* = 5): mice received canola oil (10 ml/kg, *p.o.*) 30 min before Triton WR-1339 (400 mg/kg, 2.5 ml/kg, *i.p.*).<sup>[6]</sup> Group 4, (PhSe)<sub>2</sub> + Triton (*n* = 6): mice received (PhSe)<sub>2</sub> (10 mg/kg; 10 ml/kg, *p.o.*) 30 min before Triton WR-1339 (400 mg/kg, 2.5 ml/kg, *i.p.*).

All animals remained in a fasted state for the duration of the experiment (36 h). At 24 h after the Triton injection, blood samples were collected directly from the ventricle of the heart in anaesthetized animals, using heparin as the anticoagulant, and plasma was separated by centrifugation (2400g) for 15 min. Subsequently mice were killed by decapitation. The livers were quickly removed and homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/10, *w/v*). The homogenate was centrifuged at 2400g at 4°C for 15 min and a low-speed supernatant fraction (S<sub>1</sub>) was used for assays.

### Measurement of plasma lipid

Plasma total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic colorimetric methods using commercial kits (Labtest Diagnostica, MG, Brazil). Non-HDL values were obtained by the difference between total cholesterol and HDL-cholesterol levels. Plasma lipid levels were expressed as mg/dl.

### Determination of hepatic oxidative stress parameters

#### Thiobarbituric acid reactive species

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS), a measure of lipid peroxidation, were determined as described by Ohkawa *et al.*<sup>[23]</sup> A sample of S<sub>1</sub> was incubated with 0.8% thiobarbituric acid (TBA), acetic acid buffer pH 3.4 and 8.1% sodium dodecyl sulfate for 2 h at 95°C. The colour reaction was measured at 532 nm. TBARS level was expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein.

### Nonenzymatic antioxidant defence

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva *et al.*<sup>[24]</sup> S<sub>1</sub> was precipitated in 10 vol cold 4% trichloroacetic acid solution. A portion of the sample in a final volume of 1 ml of the solution was incubated at 38°C for 3 h, then 65% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using colour reagent containing 4.5 mg/ml dinitrophenyl hydrazine and CuSO<sub>4</sub> (0.075 mg/ml). The colour reaction was measured spectrophotometrically at 520 nm. Ascorbic acid content was expressed as µg ascorbic acid/g tissue.

### Antioxidant enzymatic defences

The activity of catalase and glutathione peroxidase (GPx) was determined. Catalase activity in S<sub>1</sub> was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi<sup>[25]</sup>, which involved monitoring the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of S<sub>1</sub> at 240 nm. A sample of S<sub>1</sub> was added to 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and the enzymatic reaction was initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required for monitoring the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The enzymatic activity was expressed as Unit (U)/mg protein (1 U decomposes 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min at pH 7 at 25°C).

GPx activity in S<sub>1</sub> was assayed spectrophotometrically by the method of Wendel<sup>[26]</sup>, through the glutathione/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 340 nm. S<sub>1</sub> was added in the glutathione/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In this assay, the enzyme activity is indirectly measured by means of NADPH decay. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is decomposed, generating glutathione disulfide (GSSG) from glutathione. GSSG is regenerated back to glutathione by glutathione reductase present in the assay medium at the expense of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min per mg protein.

### Protein determination

Protein concentration was measured by the method of Bradford<sup>[27]</sup>, using bovine serum albumin as the standard.

### Statistical analysis

The results were presented as the means ± SEM. The statistically significant difference between groups was calculated by means of two-way analysis of variance followed by Duncan's test when necessary. Probability values less than 0.05 ( $P < 0.05$ ) were considered as statistically significant.

## Results

### Measurement of plasma lipid

Two-way analysis of variance of cholesterol total data yielded a significant Triton WR-1339 × (PhSe)<sub>2</sub> interaction ( $F_{1,19} = 6.200$ ;  $P < 0.05$ ). Post-hoc comparisons demonstrated that Triton WR-1339 increased plasmatic cholesterol total levels in mice (2.4-times higher than the control group). (PhSe)<sub>2</sub> pretreatment was effective in preventing the increase of cholesterol total levels caused by Triton WR-1339 injection in mice (e.g. Figure 1a).

Two-way analysis of variance of HDL-cholesterol levels showed a significant Triton WR-1339 × (PhSe)<sub>2</sub> interaction ( $F_{1,19} = 4.585$ ;  $P < 0.05$ ). Post-hoc comparisons demonstrated that Triton WR-1339 decreased plasmatic HDL-cholesterol levels in mice (2.0-times lower than the control group). (PhSe)<sub>2</sub> pretreatment increased HDL-cholesterol levels reduced by Triton WR-1339 injection in mice (e.g. Figure 1b).

Two-way analysis of variance of non-HDL-cholesterol levels yielded a significant Triton WR-1339 × (PhSe)<sub>2</sub> interaction ( $F_{1,19} = 12.523$ ;  $P < 0.05$ ). Post-hoc comparisons demonstrated that Triton WR-1339 increased plasma non-HDL-cholesterol levels in mice (6.3-times higher than the control group). (PhSe)<sub>2</sub> pretreatment was effective in preventing the increase of non-HDL-cholesterol levels caused by Triton WR-1339 injection in mice (e.g. Figure 1c).

Two-way analysis of variance of triglyceride data revealed a significant Triton WR-1339 × (PhSe)<sub>2</sub> interaction ( $F_{1,19} = 5.606$ ;  $P < 0.05$ ). Post-hoc comparisons demonstrated that Triton WR-1339 increased the plasma triglycerides levels in mice (19.7-times higher than the control group). Oral administration of (PhSe)<sub>2</sub> in mice avoided the increase of triglyceride levels induced by Triton WR-1339 injection (e.g. Figure 1d).

### Determination of hepatic oxidative stress parameters

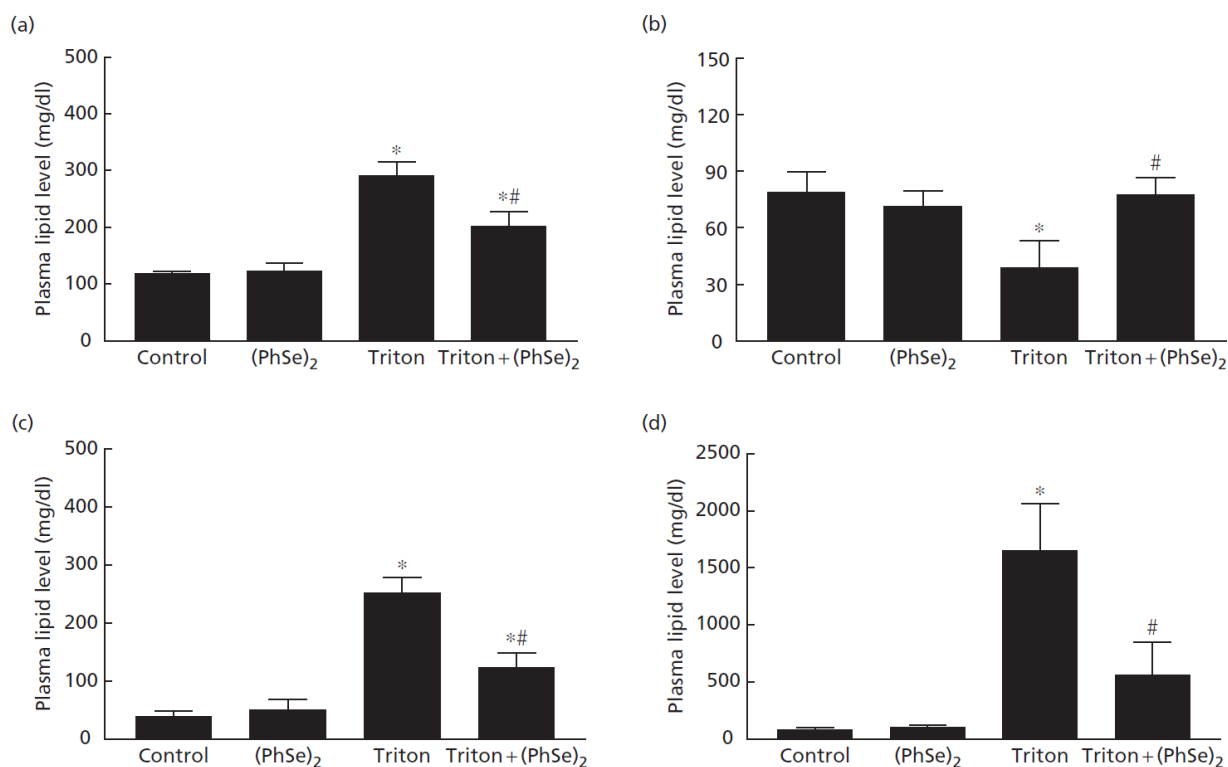
Two-way analysis of variance of TBARS, ascorbic acid, catalase and GPx data showed that neither (PhSe)<sub>2</sub> nor Triton WR-1339 changed any of these parameters in livers of tested mice (Table 1).

## Discussion

The purpose of this study was to demonstrate the hypolipidaemic effect of oral administration of (PhSe)<sub>2</sub> on Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. A single oral dose of (PhSe)<sub>2</sub> was able to prevent the augmentation of total cholesterol, non-HDL-cholesterol and triglyceride levels as well as to increase HDL-cholesterol levels in hyperlipidaemic mice.

The nonionic detergent, Triton WR-1339, has been used widely to block the uptake of triacylglycerol-rich lipoproteins from plasma by peripheral tissues to produce acute hyperlipidaemia in animal models, which are often used for a number of objectives, in particular for screening natural or chemical hypolipidaemic drugs.<sup>[1,20,21,28]</sup> Experimental evidence supports the concept that Triton WR-1339 physically alters very low density lipoproteins (VLDL), rendering them refractive to the action of lipolytic enzymes of blood and tissue.<sup>[29]</sup> This prevents or delays their removal from blood and secondarily stimulates the hepatic cholesterol biosynthesis, enhancing the hyperlipidaemia.<sup>[30]</sup>

In this study, the levels of total cholesterol, non-HDL-cholesterol and triglycerides were increased 24 h after a single Triton WR-1339 injection in mice. The results demonstrated here were in accordance with those reported by others.<sup>[1,21]</sup> Moreover, (PhSe)<sub>2</sub>, given by the oral route to mice, presented a hypolipidaemic effect by preventing



**Figure 1** Effect of Triton WR-1339 and diphenyl diselenide on plasma lipid levels in mice. (a) Total cholesterol, (b) high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, (c) non-HDL-cholesterol, and (d) triglyceride levels from plasma of male adult mice. (PhSe)<sub>2</sub>, diphenyl diselenide. Data are reported as means  $\pm$  SEM for five to six animals per group. \*Compared with control group; #compared with Triton group,  $P < 0.05$  (two-way analysis of variance/Duncan).

**Table 1** Effect of Triton WR-1339 and diphenyl diselenide on parameters of oxidative stress from liver of male adult mice

Treatment group	TBARS (nmol MDA/mg protein)	Ascorbic acid ( $\mu$ g ascorbic acid/g tissue)	Catalase (U/mg protein)	Glutathione peroxidase (nmol NADPH/min per mg protein)
Control	33.11 $\pm$ 4.71	328.17 $\pm$ 10.78	29.75 $\pm$ 5.68	108.23 $\pm$ 5.26
(PhSe) <sub>2</sub>	34.11 $\pm$ 7.88	341.24 $\pm$ 22.90	29.03 $\pm$ 3.90	114.13 $\pm$ 8.01
Triton	40.18 $\pm$ 6.44	324.69 $\pm$ 26.82	33.59 $\pm$ 6.15	111.14 $\pm$ 7.33
(PhSe) <sub>2</sub> + Triton	37.18 $\pm$ 8.75	364.05 $\pm$ 11.28	27.65 $\pm$ 4.45	106.92 $\pm$ 12.87

(PhSe)<sub>2</sub>, diphenyl diselenide; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for five to six animals per group.

the augmentation of total cholesterol, non-HDL-cholesterol and triglyceride levels in a Triton WR-1339-induced hyperlipidaemic model.

It has been postulated that high levels of HDL-cholesterol are associated with a reduced amount of atherosclerotic disease.<sup>[31]</sup> The HDL-cholesterol fraction may down regulate the total cholesterol via reverse cholesterol transport to the liver, i.e. the HDL fraction increases the cholesterol elimination from tissues and facilitates the cholesterol transport to the liver. Accordingly, Wójcicki *et al.*<sup>[32]</sup> reported an increase in HDL-cholesterol fraction on Se supplementation. In this way, it should be plausible to expect that (PhSe)<sub>2</sub> could augment HDL-cholesterol levels. Despite this, our data revealed that (PhSe)<sub>2</sub> itself was not capable of increasing significantly HDL-cholesterol levels, although it

had raised HDL-cholesterol to control levels in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice.

Oxygen free radicals or, more generally, reactive oxygen species (ROS), are the products of normal metabolic and signal-transduction events within a cell but free radical oxidation is responsible for the degradation of fatty acids and their esters in biological membranes and lipoproteins.<sup>[33]</sup> Consequently, this oxidation may also play a role in pathologic processes. Stokes *et al.*<sup>[34]</sup> reported that ROS levels in hypercholesterolaemia were higher than in the normal state. In agreement with this, Oh *et al.*<sup>[6]</sup> found that 18 h after Triton WR-1339 administration to mice, the level of plasma TBARS was increased and the activity of two hepatic detoxicating enzymes, catalase and GPx, were decreased compared with the control group. Conversely, in

this study the hepatic markers of oxidative stress were not altered in mice treated with Triton WR-1339. The unconformity between results presented herein and the data from Oh *et al.*<sup>[16]</sup> could be attributed to differences in the protocol of exposure, in other words, the different time of exposure to Triton WR-1339. In fact, in the experimental protocol carried out in this study, blood was collected from mice 24 h after Triton WR-1339 administration.

Although the mechanism involved in the hypolipidaemic effect of (PhSe)<sub>2</sub> has yet to be fully elucidated, its antioxidant property in liver was not demonstrated in this experimental protocol, since results from this study did not show any oxidative alteration in hepatic parameters tested. It is important to consider that liver TBARS and antioxidant defences are likely to have minimal effects on the cholesterol formation or tissue/vascular uptake of cholesterol because these are essentially two separate phenotypes with little correlation to the other. Therefore, we should not rule out that the antioxidant effect plays a role in (PhSe)<sub>2</sub>-reduced hyperlipidaemia. In fact, the experimental design assesses no correlation of liver TBARS/antioxidant defences with altered blood lipids, indicating that the antioxidant action of (PhSe)<sub>2</sub> could be discharged in liver, but not necessarily in blood or other tissues.

(PhSe)<sub>2</sub> has been reported as an organoselenium compound, which presents thiol peroxidase-like activity *in vitro*.<sup>[16]</sup> In-vivo, (PhSe)<sub>2</sub> increased the levels of ascorbic acid and glutathione and the activity of glutathione S-transferase in lungs of rats.<sup>[35,36]</sup> However, in this study the (PhSe)<sub>2</sub> effect on the basal levels of ascorbic acid were not demonstrated. This lack of (PhSe)<sub>2</sub> effect could be explained by a possible tissue specific action, but this study is in accordance with Santos *et al.*<sup>[37]</sup> who verified no changes on ascorbic acid content in liver of mice after (PhSe)<sub>2</sub> treatment.

Literature data have reported that chalcogen compounds, containing selenium or tellurium, inhibit human squalene monooxygenase, the second enzyme in the downstream pathway for cholesterol biosynthesis.<sup>[38,39]</sup> The inhibition of squalene monooxygenase by selenium results from binding to one or more critical sulfhydryl groups on the enzyme.<sup>[39]</sup> Since the mechanism by which Triton WR-1339 caused hyperlipidaemia in mice involved the prevention or delay of VLDL removal from blood and secondarily the stimulation of hepatic cholesterol biosynthesis, it could be speculated that the inhibition of squalene monooxygenase, which resulted in reduction of cholesterol biosynthesis, by (PhSe)<sub>2</sub> could have been involved in its hypolipidaemic effect.<sup>[29,30]</sup> In accordance, we have reported that a structural analogue of (PhSe)<sub>2</sub>, (PhTe)<sub>2</sub>, produced a significant decrease in the plasma cholesterol levels in rats.<sup>[40]</sup>

Cholesterol homeostasis in the body is maintained primarily by the liver through the regulation of LDL receptor (LDL-R) and HMG-CoA reductase that affect exogenous uptake and endogenous synthesis of cholesterol, respectively.<sup>[14]</sup> So, another possible explanation for the hypolipidaemic action of (PhSe)<sub>2</sub> is related to HMG-CoA reductase activity. In fact, HMG-CoA reductase, a rate-limiting step in cholesterol biosynthesis, possesses cysteine residues and is subject to regulation by thiol–disulfide exchange. Nassir *et al.*<sup>[41]</sup> reported that Se deficiency led to increased HMG-CoA reductase activity in rats, that in turn resulted in

increased endogenous cholesterol synthesis. In agreement, Dhingra and Bansal<sup>[14]</sup> demonstrated that 1 ppm Se supplementation was responsible for downregulation of HMG-CoA reductase expression during hypercholesterolaemia.

A balance between therapeutic versus toxicological effects of a compound is an important parameter when evaluating its usefulness as a pharmacological drug. The increased selenium bioaccumulation may be related to its ability to substitute sulfur in methionine to form the analogue, selenomethionine; the latter is directly incorporated into protein and so enhances the chance of its tissue accumulation.<sup>[42]</sup> Moreover, at the molecular level, selenium toxicity has been attributed to the oxidation of thiols of biological importance.<sup>[43]</sup> In this sense, it is important to mention that the liver is the major target organ of selenium toxicity.<sup>[44]</sup> Presumably this chronic type of poisoning is the result of prolonged ingestion of 10–30 ppm selenium, but in this study, (PhSe)<sub>2</sub> was used in a subtoxic dose (10 mg/kg e.g. 5.1 ppm Se).<sup>[43]</sup>

Furthermore, it has been known for a long time that inorganic selenium is highly toxic to several species of mammals.<sup>[45]</sup> However the methylated selenium is more easily excreted than inorganic selenium, resulting in lower tissue selenium levels and subsequent lower toxicity.<sup>[46]</sup> In line with this, previous results from our research group have demonstrated that (PhSe)<sub>2</sub>, an organoselenium compound, has potential toxic effects only when animals are exposed to high doses, affecting the central nervous system of mice and causing impairment of glutamatergic transmission as well as liver and renal toxicity.<sup>[47]</sup> Reinforcing this idea, results from Meotti *et al.*<sup>[48]</sup> indicated that subchronic exposure to (PhSe)<sub>2</sub> at high doses (94 mg/kg) induced minor toxicological effects in rats. In addition, it is very important to mention that (PhSe)<sub>2</sub> does not induce toxic effects at doses in which it has pharmacological effects.

In this context, the toxicity of selenium compounds not only depends on the chemical form and the quantity of the element consumed, but also on a variety of other factors including species, age, physiological state, nutrition and dietary interactions, and the route of administration.<sup>[49]</sup>

## Conclusions

A single oral administration of (PhSe)<sub>2</sub> was able to prevent the augmentation of plasma total cholesterol, non-HDL-cholesterol and triglyceride levels as well as to restore the HDL-cholesterol level in a Triton WR-1339-induced model of hyperlipidaemia in mice. The antioxidant effect of (PhSe)<sub>2</sub> in liver was not observed in this experimental protocol. Further studies are needed to elucidate the exact mechanism by which (PhSe)<sub>2</sub> exerted its hypolipidaemic effect, and its effect on atherosclerosis, since this organochalcogen has the potential to be a candidate for the development of a new hypolipidaemic drug.

## Declarations

### Conflict of interest

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

## Funding

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Cristina Wayne Nogueira and Gilson Zeni are recipients of a CNPq fellowship.

## References

- Xie W *et al.* Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. *J Pharmacol Sci* 2007; 103: 267–274.
- Jeong WI *et al.* Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J Med Vet Sci* 2005; 67: 235–242.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34–47.
- Fielding CJ, Fielding FE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36: 211–228.
- Hamelet J *et al.* Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *J Hepatol* 2007; 46: 151–159.
- Oh PS *et al.* Hypolipidemic and antioxidative effects of the plant glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* stokes fruit in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 447–456.
- Kumar SA *et al.* Protective role of eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 189: 115–122.
- May SW. Selenium-based pharmacological agents: an up date. *Exp Opin Invest Drugs* 2002; 11: 1261–1269.
- Huang K *et al.* Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats. *Atherosclerosis* 2002; 162: 137–144.
- Papp LV *et al.* From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 775–806.
- Suadicani P *et al.* Serum selenium concentration and risk of ischaemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males. *Atherosclerosis* 1992; 96: 33–42.
- Thomas JP *et al.* Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and iron-mediated reactions. *J Lipid Res* 1993; 34: 479–490.
- Lee O *et al.* The relationship between serum selenium levels and lipid profiles in adult women. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49: 397–404.
- Dhingra S, Bansal MP. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. *Chem Biol Interac* 2006; 161: 49–56.
- Nogueira CW *et al.* Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104: 6255–6286.
- Meotti FC *et al.* Protective role of aryl and alkyl diselenide on lipid peroxidation. *Environ Res* 2004; 94: 276–282.
- Porciuncula LO *et al.* Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 2001; 299: 217–220.
- Nogueira CW *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003; 52: 56–63.
- de Bem A *et al.* Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 2008; 201: 92–100.
- Pérez-Pastén R *et al.* Hypolipidaemic and antiplatelet activity of phenoxyacetic acid derivatives related to  $\alpha$ -ascarone. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 1343–1349.
- Harnafi H *et al.* Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chem* 2008; 108: 205–212.
- Paulmier C. *Selenium Reagents and Intermediates. Organic Synthesis.* Oxford: Pergamon, 1986.
- Ohkawa H *et al.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
- Jacques-Silva MC *et al.* Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Toxicol Pharm* 2001; 88: 119–125.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121–126.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77: 325–333.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- Schurr PE *et al.* Triton induced hyperlipidaemia in rats as an animal model for screening hypolipidaemic drugs. *Lipids* 1972; 7: 69–74.
- Friedman M, Byers SO. The mechanism responsible for the hypercholesterolemia induced by Triton WR-1339. *J Exp Med* 1953; 97: 117–130.
- Goldfarb S. Rapid increase in hepatic HMG-CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after Triton WR 1339 injection. *J Lipid Res* 1978; 19: 489–494.
- Von Eckardstein A *et al.* High density lipoproteins and atherosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 13–27.
- Wójcicki J. Effect of selenium and vitamin E on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1991; 87: 9–16.
- Morgan MJ *et al.* Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1471–1483.
- Stokes KY *et al.* Hypocholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1026–1036.
- Luchese C *et al.* Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72: 248–254.
- Luchese C *et al.* Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of an organoselenium compound. *Pharmacol Res* 2009; 59: 194–201.
- Santos FW *et al.* Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interac* 2005; 151: 159–165.
- Landen BP, Porter TD. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* 2001; 42: 235–240.
- Gupta N, Porter TD. Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds. *J Biochem Mol Toxicol* 2002; 16: 18–23.
- Borges VC *et al.* Repeated administration of diphenyl ditelluride induces hematological disorders in rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 1453–1458.
- Nassir F *et al.* Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat. *Br J Nutr* 1997; 78: 493–500.

**Author Copy:** This article was published by the Pharmaceutical Press, which has granted the author permission to distribute this material for personal or professional (non-commercial) use only, subject to the terms and conditions of the Pharmaceutical Press Licence to Publish. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, sub-licensing or modification of the whole or part of the article in any form is expressly forbidden.

42. Panter KE *et al.* Comparative toxicity of selenium from seleno-DL-methionine sodium selenate, and *Astragalus bisulcatus* in pigs. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 32: 217–223.
43. Painter EP. The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chem Rev* 1941; 28: 179–213.
44. Diskin CJ *et al.* Long-term selenium exposure. *Arch Intern Med* 1979; 139: 824–826.
45. Penrith ML. Acute selenium toxicosis as a cause of paralysis in pigs. *J S Afr Vet Assoc* 1995; 66: 47–48.
46. Chen CL *et al.* Effect of vitamin B12 on performance and tissue selenium content in rats fed sub-toxic levels of selenite. *Toxicology* 1993; 85: 101–115.
47. Nogueira CW *et al.* Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 2003; 183: 29–37.
48. Meotti FC *et al.* Toxicological evaluation of subchronic exposure to diphenyl diselenide in rats. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 638–644.
49. Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett* 2003; 137: 103–110.

## 5 DISCUSSÃO

Normalmente, o colesterol serve como elemento estrutural nas membranas celulares, sendo também empregado como precursor para a síntese de ácidos biliares no fígado, hormônios esteróides nas glândulas endócrinas e vitamina D na pele (Oh et al., 2006). Entretanto, desordens no metabolismo do colesterol bem como dos demais lipídios presentes no plasma sanguíneo estão associadas com o desenvolvimento de uma série de patologias, dentre elas doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão e esteatose hepática. Por essa razão, os organismos desenvolveram sofisticados mecanismos regulatórios, através dos quais a homeostase do metabolismo lipídico é mantida por meio da regulação da ingestão pela dieta, controle da biossíntese hepática, transporte e catabolismo (Muscat et al., 2002).

O Triton WR-1339, um detergente não iônico, provoca um significativo aumento na síntese hepática de colesterol (Frantz e Hinkelman, 1955; Bucher et al., 1959) e na atividade da enzima HMG-CoA redutase (Goldfarb, 1978; Kuroda et al., 1997) em roedores 24 horas após sua administração pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.). Simultaneamente, observa-se um rápido acúmulo de triglicerídeos e colesterol no plasma (Friedman & Byers, 1957) como consequência ao fato de a atividade da enzima lipase lipoproteica estar diminuída (Janicki & Aron, 1962) em função das alterações na constituição física das lipoproteínas (Friedman & Byers, 1953). Uma vez que o Triton WR-1339 bloqueia o retorno das lipoproteínas ou dos seus produtos de degradação ao fígado, isso estimula a biossíntese de colesterol (Frantz & Hinkelman, 1955; Scanu & Page, 1962). Dessa forma, o emprego do Triton WR-1339 constitui um modelo bastante interessante para o estudo de compostos com função hipolipemiante (Goldfarb, 1978; Oh et al., 2006; Harnafi et al., 2008).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho consistiu em demonstrar o efeito hipolipidêmico de uma única administração oral do  $(\text{PhSe})_2$ , um composto orgânico de Se, no modelo de hiperlipidemia aguda induzida pela injeção i.p. de Triton WR-1339 em camundongos. Os resultados obtidos evidenciaram que o  $(\text{PhSe})_2$  foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de colesterol total, colesterol não-HDL e triglicerídeos bem como aumentar os níveis de HDL-colesterol no plasma de camundongos hiperlipidêmicos.



A dose de  $(\text{PhSe})_2$  (10 mg/kg) utilizada neste trabalho foi escolhida em função de sua baixa toxicidade, uma vez que Prigol et al. (2009) demonstraram que a dose desse composto orgânico de Se que provoca efeitos neurotóxicos em camundongos é 50 vezes maior que a empregada no presente estudo. Também é necessário mencionar que o tempo escolhido para o pré-tratamento com o  $(\text{PhSe})_2$  (30 minutos antes da injeção do Triton WR-1339) está baseado no tempo que esse organocalcogênio demora para atingir sua concentração máxima no plasma, a qual é verificada meia hora após sua administração pela via oral (Prigol et al., 2009).

No que diz respeito à relação existente entre os níveis de colesterol plasmáticos e o micronutriente Se, Nassir et al. (1997) sugerem que o possível mecanismo que poderia estar envolvido na hipercolesterolemia observada durante a deficiência de Se diz respeito a um provável aumento na atividade da enzima HMG-CoA redutase, uma vez que ela corresponde ao principal ponto de regulação na biossíntese do colesterol. A atividade da HMG-CoA redutase está sujeita a múltiplos mecanismos regulatórios, incluindo a síntese e degradação de proteínas, o controle endócrino por diferentes hormônios, e a fosforilação/desfosforilação (Nassir et al., 1997). Além disso, considerando que a HMG-CoA redutase possui resíduos de cisteína, sua atividade também pode ser regulada por meio de trocas tiol-dissulfeto (Bunce, 1993). Corroborando com os dados anteriores, Landen e Porter (2001) e Gupta e Porter (2002) evidenciaram que compostos organocalcogênicos inibem a atividade da enzima esqualeno monooxigenase, outra enzima bastante importante na via de biossíntese do colesterol.

Por esse motivo, torna-se plausível sugerir que o efeito hipolipidêmico do  $(\text{PhSe})_2$  pode estar relacionado com a capacidade que os compostos orgânicos de Se possuem de oxidar grupamentos tióis (Nogueira et al., 2004). Dessa forma, seria provável que a diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol verificada pelo presente trabalho pudesse ser devida a uma inibição da atividade de enzimas chave para a biossíntese do colesterol por meio da ligação do Se a grupos sulfidríla críticos para o funcionamento de tais enzimas.

Os resultados obtidos pelo presente trabalho demonstraram ainda que a administração de  $(\text{PhSe})_2$  restaurou os níveis de HDL-colesterol nos camundongos que receberam a injeção de Triton WR-1339. Embora Wojcicki et al. (1991) tenham demonstrado que a suplementação com Se é capaz de aumentar os níveis dessa

lipoproteína no soro, no presente estudo não foi observado o aumento dos níveis de HDL-colesterol *per se*.

A principal forma de tratamento para combater a hipertrigliceridemia reside no uso de fibratos, os quais apresentam um complexo mecanismo de ação, incluindo o aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica (Yuan et al., 2007). Estudos conduzidos no intuito de avaliar alterações no perfil lipídico e na atividade de algumas enzimas do metabolismo dos lipídios em modelos de hepatoma (Thirunavukkarasu et al., 2002) e câncer de mama (Chidambaram & Baradarajan, 1995) demonstraram que o tratamento com Se na forma de selenito de sódio diminuiu as concentrações de triglicerídeos bem como dos demais lipídios presentes no plasma, exceto HDL-colesterol. Além disso, ambos os trabalhos evidenciaram um aumento na atividade da enzima lipase lipoprotéica, fato que pode ter contribuído para a diminuição dos níveis de triglicerídeos.

Acerca da associação existente entre hipercolesterolemia e estresse oxidativo, Stokes et al. (2002) evidenciaram que o estado de hipercolesterolemia, além de aumentar os níveis de EROS, também provoca efeitos negativos em várias funções do sistema cardiovascular. Conseqüentemente, verifica-se um aumento na vulnerabilidade do tecido endotelial frente a condições isquêmicas e inflamatórias. Em acréscimo a isso, Kumar et al. (2006) demonstraram aumentos nos níveis de malondialdeído, proteína carbonilada e 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (todos marcadores de estresse oxidativo) bem como prejuízos às defesas antioxidantes no tecido hepático de ratos hipercolesterolêmicos. Por essa razão, seria natural esperar que houvesse um aumento na peroxidação lipídica, bem como a diminuição das defesas antioxidantes em camundongos com hipercolesterolemia induzida pela administração de Triton WR-1339. Contudo, no protocolo experimental empregado no presente trabalho, não foi possível evidenciar alterações nos níveis de peroxidação lipídica nem nas defesas antioxidantes analisadas em tecido hepático.

Em adição a seu efeito hipolipemiante, outro aspecto que torna o  $(\text{PhSe})_2$  um candidato em potencial a ser empregado no tratamento das dislipidemias diz respeito a sua capacidade de inibir *in vitro* a peroxidação lipídica bem como a oxidação das moléculas de proteína presentes no LDL-colesterol humano, fornecendo, dessa maneira, um mecanismo adicional contra o desenvolvimento de aterosclerose (de Bem et al., 2008).

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação, é possível concluir que:

- Uma única administração oral de  $(\text{PhSe})_2$  foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de plasmáticos de colesterol total, não HDL-colesterol e triglicerídeos, bem como restaurar os níveis de HDL-colesterol em camundongos com hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339;
- No protocolo experimental utilizado no presente trabalho não foi possível observar o efeito antioxidante do  $(\text{PhSe})_2$  no fígado de camundongos uma vez que a administração de Triton WR-1339 não provocou alterações nos marcadores hepáticos de estresse oxidativo estudados.

## 7 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos com esta dissertação, as perspectivas do presente trabalho dizem respeito a:

- Determinar se a administração i.p. de Triton WR-1339 é capaz de provocar alterações nos marcadores plasmáticos de estresse oxidativo;
- Avaliar se o  $(\text{PhSe})_2$  reduz a peroxidação lipídica no plasma de camundongos com hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339;
- Investigar o mecanismo através do qual o  $(\text{PhSe})_2$  exerce seu efeito hipolipidêmico.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol 2001; 77: 4-48.

Åkesson B et al. Purification of selenoprotein P from human plasma. Biochim Biophys Acta 1994; 1204: 243–9.

Arthur JR et al. Hepatic iodothyronine 5 $\alpha$ -deiodinase. Biochem J 1990; 272: 537–40.

Barbosa NBV et al. Effect of organic forms of selenium on d-Aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. Toxicol Appl Pharmacol 1998; 149: 243-53.

Barbosa NBV et al. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. Chem Biol Interact 2006; 163 230-8.

Borges VC et al. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. Neurochem Res 2004; 29: 1505-9.

Borges LP et al. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2- nitropropane in rats. Toxicology 2005a; 210: 1-8.

Borges VC et al. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+),K(+)-ATPase activity in rats. Toxicology 2005b; 215: 191-7.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 1986; 232: 34–47.

Bucher NLR et al. Cholesterol biosynthesis in preparations of liver from normal, fasting, X-irradiated, cholesterol fed, Triton, or 4-cholesten-3-one treated rats. J Biol Chem 1959; 234: 262-7.

Bugianesi E et al. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 987–1000.

Bunce GE. Hypercholesterolaemia of copper deficiency is linked to glutathione metabolism and regulation of hepatic HMG-CoA reductase. *Nutr Rev* 1993; 51: 305-7.

Byington RP et al. Reduction in cardiovascular events during pravastatin therapy. Pooled analysis of clinical events of the pravastatin atherosclerosis intervention program. *Circulation* 1995; 92: 2419–25.

Carmiel-Haggai M et al. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* 2004.

Combs Jr, GF, Gray WP. Chemopreventive Agents: Selenium. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 179-92.

Charlton-Menys V., Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol* 2007, 93: 27–42

Chidambaram N, Baradarajan A. Effect of selenium on lipids and some lipid metabolising enzymes in DMBA induced mammary tumor rats. *Cancer Biochem Biophys* 1995; 15: 41-7.

Chu FF et al. Expression, characterization and tissue distributions of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; 268: 2571–76.

Croteau W et al. Cloning and expression of cDNA for a mammalian type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 16569–75.

Davey JC et al. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 26786–9.

De Bem AF et al. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 2008; 201: 92–100.

De Bem AF et al. Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 105: 17–23.

Favero et al. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 2005; 20: 561-8.

Fielding CJ, Fielding PE. Molecular transport physiology of reverse cholesterol. *J Lipid Res* 1995; 36: 211-28.

Frantz ID, Hinkelman BT. Acceleration of hepatic cholesterol synthesis by Triton WR 1339. *J Exp Med* 1955; 101: 225-32.

Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 13–8.

Friedman M, Byers SO. The mechanism responsible for the hypercholesterolemia induced by Triton WR 1339. *J Exp Med* 1953; 97: 117- 30.

Friedman M, Byers SO. Mechanism underlying hypercholesterolemia induced by Triton WR 1339. *Amr J Physiol* 1957; 190: 439-45.

Ghisleni G et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res* 2003; 986: 196-9.

Goldfarb S. Rapid increase in hepatic HMG-CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after Triton WR 1339 injection. *J Lipid Res* 1978; 19: 489–94

Gupta N, Porter TD. Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds. *J Biochem Mol Toxicol* 2002; 16: 18–23.

Gylling H et al. Regulation of serum cholesterol level in middle-aged and elderly men. *Arterioscler Thrombosis* 1994; 14: 694–700.

Ha BJ et al. The role of *Salicornia herbacea* in ovariectomy-induced oxidative stress. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1305-9.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. London: Oxford University Press; 1999.

Harnafi H et al. Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Food Chem* 2008; 108: 205–12.

Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 109-21.

Janicki BS, Aron SA. Effect of Triton WR 1339 on lipoproteins and lipoprotein lipase of guinea pig plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 109: 507-9.

Jung et al. The MeOH extract of *Pleurospermum kamtschaticum* and its active component buddlejasaponin (IV) inhibits intrinsic and extrinsic hyperlipidemia and hypercholesterolemia in the rat. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 255-61.

Kohrle J et al. Selenium in biology: Facts and medical perspectives. *Biol Chem* 2000; 381: 849-64.

Kritchevsky D. Atherosclerosis and Nutrition. *Nutr Int* 1986; 2: 290-7

Kumar SA et al. Protective role of eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 189: 115–22.



Kuroda M et al. Mechanism for elevation of hepatic cholesterol synthesis and serum cholesterol levels in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia. *Biochim Biophys Acta* 1977; 489: 119-25.

Landen BP, Porter TD. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* 2001; 42: 235-40.

Larsen RP, Berry MJ. Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases. *Ann Rev Nutr* 1995; 15: 323-52.

Lee AH, Glimcher LH. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2835-50.

Lee O et al. The relationship between serum selenium levels and lipid profiles in adult women. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49: 397-404

Luchese C et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: Involvement of glutathione. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72: 248-54.

Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem* 2009; 284: 723-7.

Lu LS et al. Apocyninalleviated hepaticoxidative burdenand reduced liver injury in hypercholesterolaemia. *Liver Int* 2007; 529-37.

Ludwig J et al. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.

Ludwig J et al. Review: nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12, 398-403.

Marí M et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006; 4: 185-98.

Mattos AA. Hesteato-hepatite não-alcoólica. *J Brás Gastroenterol* 2005; 5: 160-5.

Mazur A et al. Diets deficient in selenium and vitamin E affect plasma lipoprotein and apolipoprotein concentrations in the rat. *Br J Nut* 1996; 76: 899-907.

Meotti FC et al. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 2004; 94: 276–82.

Muscat GEO et al. Regulation of Cholesterol Homeostasis and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle by Liver X Receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 40722-8.

Nassir F et al. Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat. *Br J Nutr* 1997; 78: 493–500.

Navarro-Alarcón M, López-Martínez MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ* 2000; 249: 347-71.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios de bioquímica*. Tr. Simões AA, Lodi WRN. 4 ed, São Paulo: Sarvier, 2006.

Ness GC, Chambers CM. Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buffering capacity. *Exp Biol Med* 2000; 224: 8–19.

Nogueira CW et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res* 2001; 906: 157-63.

Nogueira CW et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003a; 52: 56-63.

Nogueira CW et al. Organochalcogens effects on aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 2003b; 191: 169-178.

Nogueira CW et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 2003c; 183: 29-37.

Nogueira CW et al. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004; 104: 6255-86.

Oh PS et al. Hypolipidemic and antioxidative effects of the plant glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* stokes fruit in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 447–56.

Oldfield JE. The Two faces of selenium. *J Nutr* 1987; 117: 2002-8.

Parnham MJ, Graf E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Prog Drug Res* 1991; 36: 10-47.

Papp LV et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 775–806

Penn MS, Chisolm GM. Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1994; 108: 21–9.

Prigol M et al. Diphenyl diselenide-induced seizures in rat pups: possible interaction with glutamatergic system. *Neurochem Res* 2008; 33: 996-1004.

Prigol M et al. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. *Toxicol Lett* 2009; doi:10.1016/j.toxlet.2009.04.026

Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356: 233-41.

Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000, 16: 459–81.

Rotruck JT et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179: 585-90.

Santos FW et al. Diphenyl diselenide reverses cadmium induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interac* 2005; 151: 159–165

Savegnago L et al. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 88: 418-26.

Savegnago L et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 21: 86-92.

Scanu A, Page IH. Plasma transport of lipids and lipoprotein proteins in dogs treated with Triton WR 1339. *J Clin Invest* 1962; 41: 495-504.

Schwarz M et al. Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1998; 39:1833–43.

Schwarz K et al. Prevention of exudative diathesis in chicks by factor 3 and selenium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 95: 621–5.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-5.

Stangherlin EC et al. Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. *Brain Res* 2008; 1201: 106-13.

Stokes KY et al. Hypocholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1026–36.

Stone WL et al. Effects of dietary selenium and vitamin E on plasma lipoprotein cholesterol levels in male rats. *Ann Nutr Metab* 1986; 30: 94-103.

Suadicani P et al. Serum selenium concentration and risk of ischaemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males. *Atherosclerosis* 1992; 96: 33–42.

Szasz T et al. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med* 2007; 232: 27-37.

Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002; 110: 905–11.

Takahashi K, Cohen HJ. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood* 1986; 68: 640–5.

Takashi T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 1006–11.

Thirunavukkarasu C et al. Effect of sodium selenite on lipids and lipid-metabolizing enzymes in N-nitrosodiethylamine-induced hepatoma-bearing rats. *J Trace Elem Exp Med* 2002; 16: 1-15.

Thomas JP et al. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and iron-mediated reactions. *J Lipid Res* 1993; 34: 479–90.

Towle HC et al. Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr* 1997; 17: 405–33.

Ursini F et al. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1985; 839: 62–70.

Vendeland SC et al. Rat skeletal muscle selenoprotein W: cDNA clone and mRNA modulation by dietary selenium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8749–53.

Vuoristo M, Miettinen TA. Absorption, metabolism, and serum concentrations of cholesterol in vegetarians: effects of cholesterol feeding. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 1325-31.

Weis SN et al. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 175-81.

Weitzel F, Wendel A. Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem* 1993; 268: 6288-92.

Wójcicki J. Effect of selenium and vitamin E on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1991; 87: 9–16.

Yuan G et al. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ* 2007; 176: 1113-20.