UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Guilherme Vannucchi Portari

**Avaliação do efeito da tiamina ou benfotiamina sobre
sistema antioxidante hepático em modelo experimental
agudo de alcoolismo.**

Ribeirão Preto
2008

GUILHERME VANNUCCHI PORTARI

**Avaliação do efeito da tiamina ou benfotiamina sobre sistema
antioxidante hepático em modelo experimental agudo de
alcoolismo**

Tese de doutorado apresentado à Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

**Orientador: Prof. Dr. ALCEU AFONSO JORDÃO
JÚNIOR**

Ribeirão Preto
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Portari, Guilherme Vannucchi Portari.

Avaliação do efeito da tiamina ou benfotiamina sobre sistema antioxidante hepático em modelo experimental agudo de alcoolismo. Ribeirão Preto, 2008.

85 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Jordão Jr., Alceu Afonso.

1. Benfotiamina. 2. Tiamina. 3. Antioxidante. 4. Etanol. 5. Estresse oxidativo. 6. Rato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Vannucchi Portari

Avaliação do efeito da tiamina ou benfotiamina sobre sistema antioxidante hepático em modelo experimental agudo de alcoolismo

Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.
Área de concentração: Investigação Biomédica.

Aprovação em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thomas Prates Ong

Instituição: FCF-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Estela Iraci Rabito

Instituição: Curso de Nutrição-UFTM

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Jr

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Dedicatória

As minhas amadas Maria Laura e Laura pela
presença e compreensão.

Agradecimentos

Ao meu Orientador Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior pelas
oportunidades e constante apoio ao saber.

A Attivos Magisttrais divisão da Pharmacopeia CIL (Brasil) na pessoa
do Dr. Fernando Luna que gentilmente nos cedeu a benfotiamina
(HAUPTACE®).

Ao professor Dr. Helio Vannucchi pela cessão do laboratório.

Aos técnicos de laboratório, amigos e companheiros, Paula Payão e

Aos técnicos do Biotério da Clínica Médica pela realização da
eutanásia e coleta de órgãos dos animais.

José Eduardo Bueno pela competente ajuda nas dosagens.

Aos secretários da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica

Émerson e Adriana pela competência e auxílios prestados.

Ao Rafael Deminice pelo apoio e amizade.

À todos os colegas aqui não citados que direta ou indiretamente
ajudaram na execução deste trabalho.

RESUMO

Os mecanismos propostos para a gama de ações deletérias provocadas pelo etanol são decorrentes de alterações bioquímicas ocorridas nos hepatócitos tais como: 1) aumento da geração de radicais livres; 2) produção exacerbada de intermediários de alta reatividade vindos de peroxidação de macromoléculas, e 3) depleção de substâncias da defesa antioxidante. A utilização de antioxidantes visando restaurar o sistema antioxidante é uma das linhas de tratamento para os danos provocados pelo etanol. Recentemente, estudos têm apontado para um possível papel antioxidante da tiamina e benfotiamina com efeitos benéficos principalmente em doenças crônicas-degenerativas. Assim este estudo verificou o papel da tiamina ou benfotiamina no sistema antioxidante hepático em ratos com intoxicação aguda por etanol. Verificou-se que o tratamento com tiamina e benfotiamina teve influencia no metabolismo do etanol ficando este mais circulante sem metabolização. Os tratamentos foram eficazes em aumentar os valores hepáticos de tiamina, o que resultou em diminuição dos danos hepáticos e diminuição de vitaminas antioxidantes do fígado. Além disso, a benfotiamina foi capaz de aumentar em 25 vezes os níveis eritrocitários de tiamina não fosfatada em relação à administração de tiamina hidrocloreto. Desta maneira ficou constatada a atividade antioxidante da tiamina frente ao estresse oxidativo provocado pela intoxicação aguda por etanol e a alta biodisponibilidade da benfotiamina. Assim sendo seria recomendada a utilização da benfotiamina como antioxidante mais biodisponível que a tiamina.

ABSTRACT

The proposed arrangements for the range of deleterious actions caused by ethanol are due to biochemical changes occurring in hepatocytes such as: 1) increasing in generation of free radicals; 2) production exacerbated an intermediary of high reactivity from peroxidation of macromolecules, and 3) depletion of substances of antioxidant defense system. The use of antioxidants aimed at restoring the antioxidant system is a line of treatment for the damage caused by ethanol. Recently, studies have pointed to a possible role of thiamine and benfotiamine as antioxidant with beneficial effects especially in chronic and degenerative diseases. So, the aim of this study was verify the role of thiamine or benfotiamine in the liver antioxidant system in rats treated with acute ethanol. It has been verified that treatment with thiamine and benfotiamine had influence on the metabolism of ethanol leaving it more circulating without metabolism. The treatments were effective in increasing the values of liver thiamine, which resulted in reduction of liver damage and decrease of the consumption of antioxidant vitamins of the liver. In addition, the benfotiamine was able to increase at 25 times the levels of erythrocyte free thiamine in relation to the administration of thiamine hydrochloride. Thus was established the antioxidant activity of thiamine front of the oxidative stress caused by acute ethanol and high bioavailability of benfotiamine. Therefore it recommended the use of more bioavailable benfotiamine as an antioxidant that thiamine.

Lista de tabelas

Tabela 1. Caracterização do modelo experimental quanto às concentrações de etanol no soro e fígado.	40
Tabela 2. Efeito da administração de etanol e dos tratamentos com tiamina e benfotiamina sobre enzimas marcadoras de dano hepático.	48
Tabela 3. Marcadores séricos e hepáticos do dano oxidativo	51
Tabela 4. Parâmetros do sistema antioxidante hepático	53

Lista de figuras

Figura 1. Molécula de hidrocloreto de tiamina	16
Figura 2. Mecanismo de produção dos AGEs	18
Figura 3. Estrutura da molécula de benfotiamina	19
Figura 4. Distribuição ponderal dos grupos experimentais	36
Figura 5. Análise dos pesos dos fígados dos animais dos diferentes grupos.	37
Figura 6. Relação entre peso do fígado e peso corporal dos animais.	38
Figura 7. Correlação entre concentração sérica e hepática de etanol.	41
Figura 8. Valores hepáticos de tiamina e seus fosfatos ésteres.	44
Figura 9. Concentração eritrocitária de tiamina e seus fosfatos	45
Figura 10. Concentração sérica de tiamina total.	46
Figura 11. Correlações entre peroxidação lipídica e antioxidante de membrana hepática	54

Sumário

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução	11
1.1. Metabolismo do etanol e desequilíbrio no sistema antioxidante	11
1.2. Utilização de tiamina ou benfotiamina como protetor dos danos do consumo de etanol	15
2. Hipótese	20
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. Material e métodos	22
4.1. Aspecto Ético	22
4.2. Material	22
4.3. Animais	23
4.4. Delineamento experimental	24
4.4.1. Administração aguda de etanol	24
4.5. Eutanásia e coleta de material biológico	25
4.6. Análises laboratoriais	25
4.6.1. Quantificação da alcoolemia	25
4.6.2. Determinação da tiamina e seus ésteres fosfatados no fígado, eritrócitos e soro	26
4.6.3. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	28

4.6.4. Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX)	29
4.6.5. Determinação de proteínas carboniladas	29
4.6.6. Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (<i>Advanced Oxidation Protein Products</i> - AOPP)	30
4.6.7. Determinação da concentração de vitamina E hepática	31
4.6.8. Glutathiona reduzida (GSH) e tióis totais	32
4.6.9. Determinação da vitamina C hepática	32
4.6.10. Dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)	32
4.6.11. Determinação hepática da gordura total	33
4.6.12. Determinações de proteínas totais	33
5. Análise estatística	34
6. Resultados	35
6.1. Caracterização do modelo experimental e dos tratamentos	35
6.2. Avaliação do dano hepático	47
6.3. Parâmetros do dano oxidativo e do sistema antioxidante não enzimático	49
7. Discussão	55
8. Conclusões	66
Referências	67
Anexo A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal	84

1. Introdução:

Os danos provocados ao organismo humano pelo consumo agudo e/ou crônico de álcool são bem estabelecidos na literatura, principalmente no fígado, órgão onde ocorre a maior parte da metabolização desta substância. Acredita-se que 1-2% de consumidores crônicos de bebidas alcoólicas por ano desenvolvem hepatocarcinoma, passando por esteatoepatite (10-35%) e cirrose hepática (8-20%) (SEITZ; STICKEL, 2006).

Os mecanismos propostos para a gama de ações deletérias provocadas pelo etanol são decorrentes de alterações bioquímicas ocorridas nos hepatócitos tais como: 1) aumento da geração de radicais livres; 2) produção exacerbada de intermediários de alta reatividade vindos de peroxidação de macromoléculas, e 3) depleção de substâncias da defesa antioxidante (GYAMFI; WAN, 2006).

1.1. Metabolismo do etanol e desequilíbrio no sistema antioxidante:

O etanol está contido em bebidas em que há a fermentação de açúcares e este processo é conhecido desde a antiguidade, datando também desta época o consumo humano de bebidas alcoólicas. No entanto, somente no século passado iniciaram-se pesquisas sistematizadas com respeito aos efeitos do álcool no organismo

(OLIVEIRA; LUIS, 1996).

Após sua ingestão, o etanol tem sua absorção principalmente no intestino delgado (YOST, 2002) e somente uma pequena fração é absorvida pelo estômago (LEVITT et al., 1997), sendo que nos dois órgãos a absorção é dependente do esvaziamento gástrico (JONES; JONSSON; KECHAGIAS, 1997; ONETA et al., 1998; PASTINO; CONOLLY, 2000; KLOCKHOFF; NASLUND; JONES, 2002).

De todo etanol absorvido, somente 2 a 10% é eliminado pelos rins e pulmões na sua forma original, ou seja, sem sofrer nenhuma transformação pelo sistema de detoxificação de xenobióticos (JAESCHKE et al., 2002; LIEBER, 2005). O restante do etanol consumido sofrerá o metabolismo hepático que é realizado através de três vias enzimáticas: a via da álcool desidrogenase, do sistema microsomal de oxidação do etanol (CYP2E1) e a via da catalase (LIEBER, 2004, 2005). O primeiro passo do metabolismo do etanol é comum para as três vias e é representado pela produção de um metabólito de maior toxicidade, o acetaldeído.

Quando ocorre a indução do sistema microsomal pode-se observar um aumento da ordem de 4 a 10 vezes na catabolização do etanol (LIEBER, 2004).

Embora esse sistema seja mais eficiente na catabolização do etanol comparado à álcool desidrogenase e à catalase, ele ocasiona maior dano hepático pela maior produção de metabólitos tóxicos (GONZALEZ, 2005; LIEBER, 2005; WU; CEDERBAUM, 2005).

Durante a transformação do etanol em acetaldeído via CYP2E1 ocorre produção de excesso de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, principalmente nas formas de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxietila ($CH_3CH^{\bullet} - OH$) (FERNANDEZ-CHECA, 1997; NAVASUMRIT, 2000; WU; CEDERBAUM, 2003). Essas moléculas são altamente reativas e, como o acetaldeído, atacam macromoléculas, ocasionando comprometimento ou perda funcional e, em última instância, morte celular (PATEL et al., 2005).

Radicais livres são átomos ou moléculas com alta reatividade que possuem um elétron não pareado no último orbital. Os radicais livres podem danificar todas as macromoléculas, tais como, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (VALKO et al., 2007).

A formação de espécies reativas de oxigênio tais como os ânions superóxido e o peróxido de hidrogênio representam uma importante causa da injúria oxidativa de diversas doenças associadas com a formação de radicais livres, tais como, alcoolismo, câncer, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, diabetes, entre outras (VALKO et al., 2007). Na presença de quantidades traço de metais (geralmente o ferro) O_2 e H_2O_2 geram radicais hidroxila de muito maior reatividade. Na presença de intoxicação por etanol os sistemas de oxidação do etanol são grandes fontes geradoras de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (ALBANO, 2006). O ataque às macromoléculas pelas espécies radicalares pode gerar novos radicais

e/ou moléculas perpetuando, assim uma cadeia cíclica de reações (WU; CEDERBAUM, 2003).

O malondialdeído (MDA) é o produto final formado no processo de peroxidação lipídica pelo ataque de espécies reativas de oxigênio e é considerado um marcador deste processo (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). MASALKAR & ABHANG (2005), utilizando o MDA como índice de peroxidação lipídica em pacientes com doença hepática ocasionada pelo álcool, encontraram uma correlação positiva entre os níveis de MDA e o aumento na severidade da doença. Este aldeído, assim como o acetaldeído e os radicais livres, é muito reativo e ataca macromoléculas como proteínas e DNA, ocasionando uma gama de efeitos deletérios no fígado, que vão de fibrose, cirrose até câncer (TUMA; CASEY, 2003; AHMED et al., 2005; MCKILLOP; SCHRUM, 2005).

Na tentativa de bloquear a propagação dessa cadeia de reações, o organismo lança mão de substâncias antioxidantes como a glutathiona reduzida (γ -glutamilcisteinilglicina, GSH), a vitamina E (α -tocoferol) e a vitamina C (ácido ascórbico). No entanto, a produção de radicais livres excede a ação dos antioxidantes consumindo-os em excesso e gerando um estado de desequilíbrio celular entre radicais livres e antioxidantes conhecido como estresse oxidativo. JORDÃO JR. et al. (2004), verificaram em ratos agudamente alcoolizados, um decréscimo nos níveis de GSH e vitamina E hepáticos mesmo nos animais suplementados com α -tocoferol. Em estudo sobre a interação

entre o radical hidroxietila e o consumo de antioxidantes celulares, foi verificado a depleção de GSH e vitaminas E e C (STOYANOVSKY; WU; CEDERBAUM, 1998).

O estresse oxidativo é um dos promotores do desenvolvimento dos produtos finais de glicação avançada (AGEs - *Advanced glycation end products*) e produtos finais de lipoxidação avançada (ALEs - *Advanced lipoxidation end products*) (MIYATA; KUROKAWA; VAN YPERSELE DE STRIHOU, 2000; THORNALLEY, 2002; KALOUSOVA et al., 2004; LAPOLLA et al., 2005).

Outras situações promotoras dos AGEs e ALEs são a autooxidação da glicose e a glicação de proteínas e lipídeos, nas quais por via não enzimática, conhecida como reações de Maillard, a glicose forma adutos de alta reatividade como glioxal e metilglioxal (THORNALLEY, 2002; KALOUSOVA et al., 2004).

1.2. Utilização de tiamina ou benfotiamina como protetor dos danos do consumo de etanol:

Dentre as vitaminas utilizadas comumente no tratamento de alcoolistas, a tiamina ou vitamina B₁ (Figura 1) é essencial ao metabolismo dos carboidratos e apresenta diminuição sérica após intoxicação aguda com etanol (BONJOUR, 1980; TAKABE; ITOKAWA, 1980, 1983). A tiamina não é sintetizada no organismo dos mamíferos sendo obtida por meio da ingestão de alimentos que a

contém como carnes, cereais integrais e feijões (SINGLETON; MARTIN, 2001). A recomendação diária para esta vitamina é de 1,2 mg/dia para o homem e 1,1 mg/dia para mulher. Para roedores adultos, a recomendação, segundo o American Institute of Nutrition (AIN-93), é de 0,6 g de hidrocloreto de tiamina/ kg de dieta (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Figura 1. Molécula de hidrocloreto de tiamina

A tiamina é uma vitamina hidrossolúvel e sua forma biologicamente ativa é a tiamina pirofosfato, a qual é formada no fígado pela ação da enzima tiamina fosfoquinase (BONJOUR, 1980). Na sua forma ativa, esta vitamina é essencial como coenzima para o funcionamento ótimo da piruvato desidrogenase, da transcetolase e da α -cetoglutarato desidrogenase em reações do metabolismo dos carboidratos pelas vias da pentose fosfato, glicólise e ciclo do ácido cítrico formando NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e energia na forma de ATP (adenina trifosfato) (SINGLETON; MARTIN, 2001). O NADPH formado tem sua importância como doador de hidrogênio para reações que resultam na formação de moléculas como esteróides, ácidos graxos, aminoácidos entre outras, bem como na síntese de glutathione (GSH), importante composto de defesa

contra o estresse oxidativo (SINGLETON; MARTIN, 2001; REED, 2004).

Recentes estudos têm apontado para um possível papel protetor da tiamina frente ao estresse oxidativo e ao acetaldeído (LUKIENKO *et al.*, 2000; PORTARI *et al.*, 2008). SINGLETON & MARTIN (2001) relatam um aumento do estresse oxidativo em cérebro de ratos devido a deficiência de vitamina B₁. Em miócitos cardíacos tratados com acetaldeído, a vitamina B₁ diminuiu a formação de carbonilas resultantes do dano em proteínas, ocasionado pelo acetaldeído, diminuindo por consequência o número de células apoptóticas (ABERLE *et al.*, 2004). Ratos submetidos ao estresse oxidativo por infusão de arsênio reverteram este quadro pelo tratamento com tiamina (NANDI; PATRA; SWARUP, 2005). GLISZCZYNSKA-SWIGLO (2006), utilizando ensaios *in vitro* verificou alta atividade antioxidante da tiamina podendo-se comparar àquela da vitamina C. As reações de glicação, especialmente as reações de Maillard, ocorrem *in vivo* assim como *in vitro* e são associadas com complicações crônicas pelo aumento de modificações oxidativas de lipídeos, DNA e proteínas, formando produtos finais de glicação avançada (AGEs - *Advanced glycation end products*) pela reação com açúcares redutores (OSAWA; KATO, 2005). OBRENOVICH & MONNIER (2003) postulam benefícios da vitamina B₁ frente aos danos causados pela hiperglicemia, principalmente pelo bloqueio na formação de produtos finais de glicação avançada. Na mesma linha, outros autores

verificaram aumento na formação de aductos de metilglioxal, marcadores de estresse oxidativo, em ratos com deficiência de tiamina (SHANGARI et al., 2005; LONSDALE, 2006). Em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina verificou-se um aumento dos produtos finais de glicação avançada na proteína plasmática que foi revertida com altas doses de tiamina ou seu derivado lipofílico, a benfotiamina (KARACHALIAS et al., 2005).

Uma possível via pela qual a tiamina bloqueia a produção de produtos finais de glicação avançada em situações de hiperglicemia está esquematizada na Figura 2. HAMMES et al. (2003) postularam que o fornecimento de tiamina favorece a reação da transcetolase na via das pentoses, diminuindo o substrato de formação dos produtos finais de glicação avançada.

Figura 2. Mecanismo de formação dos AGEs
Adaptado de HAMMES et al. (2003)

Benfotiamina (Figura 3) é uma substância lipofílica sintética análoga à tiamina e com maior absorção e biodisponibilidade comparada com a forma hidrossolúvel quando administrada oralmente (HAMMES et al., 2003; KARACHALIAS et al., 2005; SANCHEZ-RAMIREZ et al., 2006).

Figura 3. Estrutura da molécula de benfotiamina

Embora descoberta em meados do século passado, recentemente, alguns autores têm-se voltado para novos estudos com esta substância focando-se em sua possível atividade antioxidante, principalmente em doenças crônicas-degenerativas (BERRONE et al., 2006; WU; REN, 2006). Desta maneira, tem-se demonstrado que a benfotiamina atua no abrandamento do estresse oxidativo sem influenciar na produção de AGEs (CEYLAN-ISIK et al., 2006; WU; REN, 2006), embora em ratos induzidos experimentalmente ao diabetes tenha sido demonstrado um papel similar ao da tiamina em desviar a via dos polióis para a via acessória da pentose-fosfato (POMERO et al., 2001; HAMMES et al., 2003;

BERRONE et al., 2006).

A possibilidade do uso das substâncias citadas (tiamina e benfotiamina) com efeito benéfico em modelos experimentais de alcoolismo agudo merecem investigação mais profunda a fim de se encontrar dados mais conclusivos.

2. Hipótese:

A hipótese deste estudo é que a tiamina e benfotiamina atuam como antioxidantes auxiliando o sistema antioxidante hepático contra os danos provocados pela intoxicação aguda por etanol.

3. Objetivos:

3.1. Objetivo Geral:

Verificar o papel da tiamina e benfotiamina sobre os danos hepáticos provocados pela administração aguda de etanol em modelo experimental.

3.2. Objetivos Específicos:

3.2.1. Analisar os teores de etanol sérico e hepático;

3.2.2. Analisar os valores de tiamina hepática e sanguínea;

3.2.3. Avaliar o estresse oxidativo hepático por meio de marcadores de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas;

3.2.4. Verificar alterações no sistema antioxidante hepático através da vitamina E, vitamina C, GSH e tiamina.

4. Material e Métodos:

4.1. Aspecto Ético: o presente trabalho foi enviado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e aprovado em reunião de 29 de janeiro de 2007 com protocolo número 152/2006 (Anexo A).

4.2. Material:

- α -tocoferol (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Acetato de etila (EM Science, Gibbstown, NJ, E.U.A.)
- Acetonitrila (EM Science, Gibbstown, NJ, E.U.A.)
- Ácido acético glacial (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Ácido clorídrico (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Ácido perclórico (F. Maia, Cotia, SP, Brasil)
- Ácido sulfúrico (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Ácido tiobarbitúrico
- Ácido tricloroacético (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Cloramina-T (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Cloreto de potássio (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Clorofórmio (F. Maia, Cotia, SP, Brasil)
- Etanol (EM Science, Gibbstown, NJ, E.U.A.)

- Ferrocianeto de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Glutathione reduzida (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Hidróxido de sódio (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Hidroxitolueno butilado – BHT (Acros Organics, Geel, Bélgica)
- Iodeto de potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Metanol (EM Science, Gibbstown, NJ, E.U.A.)
- Peróxido de hidrogênio (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Sulfato de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Sulfato ferroso (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Tampão fosfato (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Tiamina (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Tiamina difosfato (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Tiamina monofosfato (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)
- Xilenol laranja (Sigma, ST Louis, MO, E.U.A.)

A benfotiamina (HAUPTACE®) foi cedida pela Attivos Magisttrais divisão da Pharmacopeia CIL (Brasil).

4.3. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, jovens, oriundos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP e, posteriormente, mantidos por 3 dias no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP para adaptação ao ambiente. Durante os 3 dias de adaptação, o regime de

claro-escuro foi mantido constante, de 12 em 12 horas e a temperatura controlada $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.4. Delineamento Experimental:

4.4.1. Administração aguda de etanol: foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 270-333 g, que foram separados aleatoriamente em 4 grupos com 10 animais cada. Cada animal, exceto os do grupo controle, recebeu a dose de 5 g de etanol por kg de peso sob a forma de solução aquosa na concentração de 40% (m/v). O método de administração de etanol e das substâncias utilizadas no tratamento foi gavagem por meio de sonda orogástrica. Os grupos formados foram:

4.4.1.1. Grupo Controle (C): os animais receberam somente água por gavagem.

4.4.1.2. Grupo Etanol (E): os animais receberam a dose de etanol somente.

4.4.1.3. Grupo Etanol + Tiamina (T): os animais receberam a dose de etanol e após 30 minutos receberam a tiamina na dose de 100 mg/kg.

4.4.1.4. Grupo Etanol + Benfotiamina (BE): os animais receberam a dose de etanol e após 30 minutos receberam a benfotiamina na dose de 100 mg/kg (CEYLAN-ISIK et al., 2006).

4.5. Eutanásia e coleta de material biológico:

Os animais foram eutanasiados por decapitação após 6 horas da gavagem de etanol e foram coletados o sangue e o fígado. O sangue foi prontamente centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos para obtenção do soro e eritrócitos, os quais foram estocados à temperatura de -40°C para análises bioquímicas. O fígado, após retirado, foi pesado e prontamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -40°C para posteriores análises.

4.6. Análises laboratoriais:

4.6.1. Quantificação da alcoolemia: a quantidade de etanol sérico foi determinada em 100 µL de soro por cromatografia gasosa com amostragem da fase vapor ("*headspace*") em tubo com tampa de borracha (PORTARI; MARCHINI; JORDAO, 2008). Para a quantificação do etanol hepático utilizou-se a mesma metodologia em homogenato de fígado preparado com 500 mg de tecido homogeneizados com auxílio de um homogeneizador tipo "*turrax*" (modelo MA-102/MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Todas as análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso modelo GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector de ionização por chama equipado com coluna DB-Wax de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA).

4.6.2. Determinação da tiamina e seus ésteres fosfatados no fígado, eritrócitos e soro: a análise de tiamina (T) e seus ésteres fosfatados (tiamina monofosfato, TMP e tiamina difosfato, TDP) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector fluorimétrico (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) e otimizadas para corrida isocrática com coluna C18 após derivação para tiocromo seguindo metodologia proposta por BATIFOULIER et al. (2005) e LU & FRANK (2008), respectivamente para fígado e eritrócitos. Para tanto, foram analisadas várias proporções de constituintes da fase móvel chegando a que proporcionou melhor separação com menor tempo de corrida. Tal proporção foi de 70 volumes de tampão fosfato 25 mM pH 7,0 para 20 volumes de metanol e 10 volumes de acetonitrila.

Para o preparo das amostras de fígado 100 mg de tecido foram homogeneizados com 700 µL de ácido perclórico 0,4 M em tubos fotoprotégidos com auxílio de um homogeneizador tipo “*turrax*” (modelo MA-102/MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Após centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos 200 µL do sobrenadante foram transferidos para “*vial*” de 2 mL e derivados com adição de 20 µL de ferrocianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) 30 mM preparado em NaOH 15% e agitado por 20 segundos em agitador de tubos tipo “*vortex*” (modelo AP-56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). Após 60 segundos da agitação do “*vial*” 5 µL de NaOH 15% foram adicionados

e então a 20 μL foram injetados no cromatógrafo. A detecção foi realizada com o fluorímetro operando em 365 nm para excitação e 435 nm para emissão. Os picos formados foram identificados por comparação com padrões derivados da mesma maneira descrita acima e a quantificação foi realizada por meio de curvas de calibração nas concentrações de 1,25 a 10 μM para T e TDP e de 0,625 a 5 μM para TMP.

Para a dosagem de tiamina eritrocitária foram removidas as células brancas e os eritrócitos foram lisados por congelamento e descongelamento (HERVE; BEYNE; DELACOUX, 1994) rápidos com nitrogênio líquido e centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos para sedimentação de “*debris*” celulares. Para a derivação a tiocromo 80 μL do sobrenadante foram transferidos para “*vial*” de 2 mL e misturados com 20 μL de metanol, 50 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 30 mM e 50 μL de NaOH 0,8 M. Após agitação de 20 segundos em agitador de tubos tipo “*vortex*” (modelo AP-56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) 20 μL foram injetados no cromatógrafo. A detecção foi realizada com o fluorímetro operando em 365 nm para excitação e 435 nm para emissão. Os picos formados foram identificados por comparação com padrões derivados da mesma maneira descrita acima e a quantificação foi realizada por meio de curvas de calibração nas concentrações de 6,25 a 100 nM para T e TMP e de 31,25 a 500 nM para TDP.

No soro a análise foi realizada por meio de espectrofluorímetro

(modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) sem diferenciação das formas fosfatadas, ou seja, tiamina total, por ser a tiamina livre a forma predominante. A derivação a tiocromo foi a mesma descrita para os eritrócitos com detecção nos mesmos comprimentos de onda para excitação e emissão.

4.6.3. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – “*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*”): a peroxidação lipídica no soro e homogenato de fígado foi quantificada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e determinadas por método colorimétrico que consiste na reação dos aldeídos formados cujo principal representante é o malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e sobre aquecimento por 30 minutos a 100°C em banho-maria (Modelo 100, FANEM, Guarulhos, SP, Brasil). Esta reação produz um composto de coloração amarela que é lido em espectrofotômetro (UV-Vis Mod Q98U Quimis®, Diadema, SP, Brasil) no comprimento de onda de 535 nm (BUEGE; AUST, 1978). Para quantificar o MDA ligado a macromoléculas as amostras de soro ou homogenato foram submetidas à hidrólise alcalina seguindo protocolo proposto por CIGHETTI et al. (1999) com as seguintes modificações: em tubo de ensaio 100 mg de fígado (ou 200 µL de soro) foram homogenizados com 1 mL de KCl 1,15% com auxílio de um homogeneizador tipo “*turrax*” (modelo MA-102/MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Em

seguida adicionou-se 3 mL de água nanopura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) e 0,5 mL de NaOH 2 M. Após agitação em agitador de tubos tipo “*vortex*” (modelo AP-56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) os tubos foram aquecidos a 60°C por 30 minutos em banho-maria (Modelo 100, FANEM, Guarulhos, SP, Brasil) e, então neutralizados com HCl 2 M para seguirem à reação com o ácido tiobarbitúrico.

4.6.4. Determinação de hidroperóxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX): os hidroperóxidos foram determinados pelo método da oxidação dos íons férrico na presença de xilenol laranja, em que 1 mL de solução contendo 100 mmol/L de xilenol laranja, 4 mmol/L BHT, 25 mmol/L de ácido sulfúrico e 250 mmol/L de sulfato ferroso em metanol:água (9:1 v/v) foi adicionada a uma alíquota de 100 µL de soro. Após agitar e encubar por 30 min em temperatura ambiente, o homogenato foi centrifugado por 10 min a 3000 rpm. A absorbância do sobrenadante foi lida a 560 nm e comparada com curva padrão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em espectrofotômetro (UV-Vis Mod Q98U Quimis®, Diadema, SP, Brasil). Os resultados foram expressos em µmols de H₂O₂/L.

4.6.5. Determinação de proteínas carboniladas: a formação de proteínas carboniladas conseqüente da desaminação oxidativa

catalisada por metais foi determinada pelo método proposto por ODETTI et al. (1996). Para as amostras de fígado, 100 mg foram homogeneizados com 0,5 mL de água desionizada com auxílio de um homogeneizador tipo “*turrax*” (modelo MA-102/MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Foram adicionados 100 µL do plasma ou 100 µL de homogenato de fígado em 100 µL de TCA 20%. Após agitação seguida de centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm descartou-se o sobrenadante e 500 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10mM em HCl 2M foram adicionados ao precipitado. Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, com agitação a cada 15 min. Em seguida, foi adicionado 1 mL de etanol-acetato de etila (1:1, v/v) e após agitação efetuou-se nova centrifugação por 10 min a 3500 rpm a 4°C. O procedimento de lavagem com etanol-acetato de etila foi repetido por 3 vezes. Ao final, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado e o “*pellet*” foi ressuspensionado em 2mL de NaOH, manteve-se em banho-maria (Modelo 100, FANEM, Guarulhos, SP, Brasil) a 34°C por 15 min e procedeu-se à leitura a 370 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o cálculo.

4.6.6. Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (*Advanced Oxidation Protein Products* - AOPP):

os valores plasmáticos de AOPP foram determinados por espectrofotometria em leitora de microplacas (modelo SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) de acordo com WITKO-

SARSAT et al. (1996). A reação foi calibrada com cloramina-T (Sigma, ST Louis, MO, USA) na presença de iodeto de potássio a 340 nm. Para as análises hepáticas um homogenato foi preparado homogeneizando-se aproximadamente 200 mg de tecido em 8,0 mL de água desionizada com auxílio de um homogeneizador tipo “*turrax*” (modelo MA-102/MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). 200 μ L de soro ou homogenato de fígado diluídos 1/5 em tampão fosfato foram colocados na placa de 96 poços (Becton Dickison Labware, Lincoln Park, NJ, USA) seguidos de 20 μ L de ácido acético glacial. Em poços padrões, foram adicionados 10 μ L de iodeto de potássio 1.16 M (Sigma) e 200 μ L de solução cloramina-T (0-100 μ M) seguido de 20 μ L de ácido acético glacial. A densidade óptica da mistura reativa foi imediatamente lida em 340 nm contra um controle contendo 200 μ L de PBS e 20 μ L de ácido acético glacial. As concentrações de AOPP foram expressas como μ M de cloramina-T.

4.6.7. Determinação da concentração de vitamina E hepática: a análise de vitamina E foi realizada em amostras de fígado em HPLC (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) equipado com uma coluna tipo C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6 x 25 cm, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), pré-coluna 4 mm x 1 cm e fluxo de 2,0 mL/min e detector UV/Visível com leitura no comprimento de onda 292 nm. A concentração foi calculada por meio de um padrão externo de α -tocoferol (ARNAUD et al., 1991).

4.6.8. Glutathiona reduzida (GSH) e tióis totais: a quantificação da glutathiona reduzida e dos tióis totais foram realizadas por método colorimétrico que consiste na reação do grupo sulfidríla com 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro UV-Vis Mod Q98U Quimis®, Diadema, SP, Brasil) no comprimento de onda de 412 nm. A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.6.9. Determinação da vitamina C hepática: a dosagem de vitamina C foi realizada por meio de reação colorimétrica com 2,4-dinitrofenilhidrazina em homogenato de fígado e posterior leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro UV-Vis Mod Q98U Quimis®, Diadema, SP, Brasil) (BESSEY, 1960).

4.6.10. Dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT): para verificar o dano hepático foram dosadas as enzimas AST e ALT por meio de reação colorimétrica e leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro UV-Vis Mod Q98U Quimis®, Diadema, SP, Brasil), utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.6.11. Determinação hepática da gordura total:

Para determinação e quantificação de gordura total, foi utilizado o método proposto por BLIGH & DYER (1959).

Primeiramente, 500 mg de tecido hepático foram homogeneizados com 0,8 mL de água destilada, em tubos de 10 mL com auxílio de um homogeneizador tipo “*turrax*” (modelo MA-102/MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Em seguida foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol, para que então os tubos pudessem ser submetidos à agitação em vortex por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. Uma nova agitação foi realizada por aproximadamente 2 minutos e os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 2 minutos para separação das camadas de clorofórmio (inferior) e aquosa (superior). A fase inferior foi retirada e colocada em um tubo de ensaio contendo 1 g de sulfato de sódio anidro, para remoção de traços de água. Uma alíquota de 0,5 mL da fase de clorofórmio livre de água foi transferida para um béquer previamente pesado, o qual foi levado para uma estufa com circulação forçada de ar a 75°C. Após a evaporação de todo o clorofórmio, foi repetida a pesagem do béquer. O cálculo foi realizado pela diferença das pesagens do béquer, dividido pela massa inicial de tecido utilizado.

4.6.12. Determinações de proteínas totais: as dosagens de proteínas totais no soro ou tecidos foram realizadas por meio de kit

comercial utilizando método de Biureto (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

5. Análise Estatística:

Os resultados serão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As comparações entre grupos serão realizadas por análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, estabelecendo como nível de significância $p < 0,05$. As correlações foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad InStat versão 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6. Resultados:

6.1. Caracterização do modelo experimental e dos tratamentos:

Na Figura 4 são apresentadas as médias dos pesos dos animais dos 4 grupos formados. Verifica-se que os pesos estavam distribuídos homogeneamente sem diferença estatística entre os grupos. O mesmo foi verificado para as médias de pesos dos fígados dos animais (Figura 5) em que nota-se ausência de diferença estatística. Quando os pesos de fígado foram normalizados pelos pesos corporais, obtendo-se a razão peso do fígado/peso corporal (Figura 6), também não foi verificada diferença entre os grupos estudados.

Figura 4. Distribuição ponderal dos grupos experimentais

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

Figura 5. Análise dos pesos dos fígados dos animais dos diferentes grupos

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

Figura 6. Relação entre peso do fígado e peso corporal dos animais

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

Na Tabela 1 são apresentados os valores de etanol sérico e hepático bem como o percentual de etanol hepático em relação à dose inicial. Não foi detectado etanol nas análises séricas ou hepáticas para os animais do grupo controle. Podemos notar que os grupos que receberam algum dos tratamentos apresentaram etanol sérico significativamente maior ($p < 0,05$) que o grupo E. O mesmo comportamento foi verificado para as concentrações de etanol hepático com valores de $1,32 \pm 1,12$ mg/g de tecido para o grupo E, $3,34 \pm 1,38$ mg/g de tecido para o grupo T e de $4,93 \pm 1,86$ mg/g de tecido para o grupo BE. Quanto aos percentuais de etanol hepático em relação à dose inicial, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os três grupos que receberam etanol, com valores de $1,3 \pm 1,3$ %, $2,5 \pm 0,9$ % e $3,6 \pm 1,2$ % para os grupos E, T e BE, respectivamente. Uma correlação significativa positiva ($p < 0,0001$) foi encontrada em relação à concentração sérica e hepática de etanol para estes 3 grupos (Figura 7).

Tabela 1. Caracterização do modelo experimental quanto às concentrações de etanol no soro e fígado

	C	E	T	BE
Etanol sérico (g/L)	nd	1,08 ±0,85	1,99 ±0,75**	1,90 ±0,39**
Etanol hepático (mg/g de tecido)	nd	1,32 ±1,12	3,34 ±1,38**	4,93 ±1,86**
Percentual hepático de etanol em relação à dose	-	1,3 ±1,3	2,5 ±0,9**	3,6 ±1,2***,***

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina
n.d., não detectado.

* p<0,05 em relação ao Grupo C

** p<0,05 em relação ao Grupo E

*** p<0,05 em relação ao Grupo T

Figura 7. Correlação entre concentração sérica e hepática de etanol

Os tratamentos com tiamina ou benfotiamina foram efetivos no aumento da concentração de tal vitamina. Na Figura 8 estão representados os valores da concentração hepática de tiamina e seus ésteres fosfato. Verifica-se que houve um aumento significativo ($p<0,05$) de tiamina livre nos grupos T e BE que chegou a ordem de 60% quando comparado aos grupos C e E. Entretanto, não foram verificadas diferenças entre todos os grupos em relação às formas fosfatadas da tiamina (TMP e TDP) analisadas no fígado.

Na Figura 9 são apresentadas as concentrações eritrocitárias das três formas da tiamina ensaiadas. Verifica-se que para a tiamina livre houve um aumento significativo ($p<0,05$) de cerca de 4 vezes para o grupo que recebeu tiamina e de 100 vezes para o grupo que recebeu benfotiamina em relação aos grupos sem tratamento, bem como, um aumento de aproximadamente 25 vezes do grupo BE em relação ao grupo T. Com relação à TMP verificou-se diferença estatística ($p<0,05$) somente entre grupo BE e os demais grupos. A análise dos valores de TDP eritrocitária revela um comportamento semelhante ao da tiamina livre com aumento significativo ($p<0,05$) dos grupos que receberam tratamento, mas agora, com um decréscimo para o grupo E em relação ao grupo C. Assim, os valores foram de $129,2\pm 18,4$ nM, $99,3\pm 17,0$ nM, $164,9\pm 19,4$ nM e de $977,6\pm 176,8$ nM para os grupos C, E, T e BE, respectivamente.

Em relação à tiamina sérica total (Figura 10), em que a forma predominante é a tiamina livre, verificou-se aumento significativo

($p < 0,05$) nos grupos tratados (T e BE) com a vitamina em relação aos outros sem tratamento (C e E). No grupo BE ocorreu um aumento em torno de 100% mais elevado que nos demais grupos.

Figura 8. Valores hepáticos de tiamina e seus fosfatos ésteres

TMP = tiamina monofosfato; TDP = tiamina difosfato

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

* p < 0,05 em relação ao Grupo C

** p < 0,05 em relação ao Grupo E

Figura 9. Concentração eritrocitária de tiamina e seus fosfatos

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

* $p < 0,05$ em relação ao Grupo C

** $p < 0,05$ em relação ao Grupo E

*** $p < 0,05$ em relação ao Grupo T

Figura 10. Concentração sérica de tiamina total

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

* $p < 0,05$ em relação ao Grupo C

** $p < 0,05$ em relação ao Grupo E

*** $p < 0,05$ em relação ao Grupo T

6.2. Avaliação do dano hepático:

O dano hepático avaliado pelas enzimas AST e ALT é representado na Tabela 2. Nota-se que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da AST no grupo que recebeu somente etanol ($196,3 \pm 15,8$ U/L) quando comparado com o grupo C ($173,2 \pm 14,1$ U/L) e um decréscimo dessa enzima nos grupos que receberam tratamento ($142,0 \pm 23,1$ e $131,2 \pm 8,9$ U/L para os grupos T e BE, respectivamente). Com respeito à ALT verifica-se valor significativamente maior ($p < 0,05$) do grupo E ($67,1 \pm 5,5$ U/L) em relação aos outros grupos ($61,2 \pm 5,7$ U/L para o grupo C, $54,7 \pm 7,3$ U/L para o grupo T e $55,2 \pm 5,5$ U/L para o grupo BE).

Tabela 2. Efeito da administração de etanol e dos tratamentos com tiamina e benfotiamina sobre enzimas marcadoras de dano hepático

	C	E	T	BE
AST (U/L)	173,2 ±14,1	196,3 ±15,8*	142,0 ±23,1*,**	131,2 ±8,9*,**
ALT (U/L)	61,2 ±5,7	67,1 ±5,5*	54,7 ±7,3**	55,2 ±5,5**

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

* p<0,05 em relação ao Grupo C

** p<0,05 em relação ao Grupo E

*** p<0,05 em relação ao Grupo T

6.3. Parâmetros do dano oxidativo e do sistema antioxidante não enzimático:

O dano oxidativo verificado após a administração de dose aguda de etanol é representado na Tabela 3. Com relação às TBARS livres hepáticas, representadas por aldeídos provenientes da peroxidação lipídica não ligados às macromoléculas, verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo E ($18,0 \pm 3,7$ nmol/g de proteína) em relação aos demais grupos com significativa queda para os grupos T ($9,7 \pm 3,2$ nmol/g de proteína) e BE ($10,0 \pm 2,5$ nmol/g de proteína). Quando analisadas as TBARS totais hepáticas, as quais representam a somatória dos aldeídos provenientes da peroxidação lipídica ligados e não ligados às macromoléculas, verificou-se uma diminuição significativa para os grupos tratados (T com $5,4 \pm 2,9$ mmol/g de proteína e, BE com $3,8 \pm 1,3$ mmol/g de proteína) em relação aos grupos C ($9,7 \pm 3,0$ mmol/g de proteína) e grupo E ($10,9 \pm 3,1$ mmol/g de proteína). As análises séricas de TBARS livres e totais revelam comportamento semelhante entre si com diminuição significativa ($p < 0,05$) de suas concentrações para os grupos T e BE comparados com os grupos C e E. Com relação aos hidroperóxidos séricos verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo E ($44,8 \pm 8,2$ μ M) em relação aos demais grupos com significativa queda para os grupos T ($27,9 \pm 7,3$ μ M) e BE ($30,5 \pm 4,5$ μ M). Os valores de AOPP hepático mostraram-se significativamente diferentes ($p < 0,05$)

entre o grupo C ($21,2 \pm 5,1$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína) e os grupos T ($16,9 \pm 4,2$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína) e BE ($14,1 \pm 4,9$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína) e, com este último diferente também comparado ao grupo E ($21,2 \pm 5,1$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína). Quanto aos valores séricos de AOPP verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) somente entre o grupo BE ($10,8 \pm 3,6$ μM) e os grupos C ($25,0 \pm 14,3$ μM) e E ($23,4 \pm 10,2$ μM). A análise das proteínas carboniladas no fígado revelou a presença significativamente diminuída ($p < 0,05$) desse marcador no grupo BE ($17,7 \pm 3,1$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína) quando comparado com os demais grupos ($24,0 \pm 5,3$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína para o grupo C, $24,5 \pm 5,8$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína para o grupo E e $22,9 \pm 5,0$ $\mu\text{mol/g}$ de proteína para o grupo T). Em relação aos valores séricos de proteínas carboniladas não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

Tabela 3. Marcadores séricos e hepáticos do dano oxidativo

	C	E	T	BE
TBARS livres hepáticas (nmol/g de proteína)	14,4 ±4,1	18,0 ±3,7*	9,7 ±3,2***	10,0 ±2,5***
TBARS totais hepáticas (mmol/g de proteína)	9,7 ±3,0	10,9 ±3,1	5,4 ±2,9***	3,8 ±1,3***
TBARS séricas (nM)	74,7 ±18,1	86,4 ±22,2	66,0 ±11,6**	59,6 ±11,3**
TBARS totais séricas (μM)	1,21 ±0,28	1,30 ±0,67	0,80 ±0,08***	0,83 ±0,12***
Hidroperóxidos séricos (μM)	37,3 ±6,9	44,8 ±8,2*	27,9 ±7,3***	30,5 ±4,5***
AOPP hepáticos (μmol/g de proteína)	24,9 ±5,0	21,2 ±5,1	16,9 ±4,2*	14,1 ±4,9***
AOPP séricos (μM)	25,0 ±14,3	23,4 ±10,2	16,1 ±7,8	10,8 ±3,6***
Proteínas carboniladas hepáticas (μmol/g de proteína)	24,0 ±5,3	24,5 ±5,8	22,9 ±5,0	17,7 ±3,1***
Proteínas carboniladas séricas (nM)	73,7 ±5,9	76,8 ±6,1	76,2 ±4,8	72,2 ±7,7

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

* p<0,05 em relação ao Grupo C

** p<0,05 em relação ao Grupo E

*** p<0,05 em relação ao Grupo T

Na Tabela 4 são apresentados os valores dos parâmetros hepáticos do sistema antioxidante não enzimático. Nota-se que houve um aumento significativo ($p<0,05$) na concentração hepática de vitamina E no grupo E ($1,30\pm0,37$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ gordura total) em relação aos demais grupos, seguido pelo grupo T ($0,92\pm0,17$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ gordura total) e depois pelo grupo BE ($0,57\pm0,13$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ gordura total), o qual não apresentou mudança em relação ao grupo C ($0,51\pm0,14$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ gordura total). Com relação aos tióis livres hepáticos verificou-se um decréscimo significativo ($p<0,05$) para os grupos T ($2,8 \pm 1,0$ $\mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína) e BE ($2,8 \pm 0,8$ $\mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína) em relação ao grupo C ($5,3 \pm 1,9$ $\mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína). Com referência aos tióis totais hepáticos não se verificou diferença significativa entre os grupos. A análise da vitamina C hepática revelou um aumento significativo ($p<0,05$) para os grupos E ($36,1\pm7,6$ g/100 g de tecido), grupo T ($28,4\pm7,6$ g/100 g de tecido) e grupo BE ($34,0\pm6,4$ g/100 g de tecido) quando comparados com o grupo C ($15,7\pm3,3$ g/100 g de tecido).

Na Figura 11 são apresentadas as correlações entre 2 parâmetros hepáticos com efeitos biológicos opostos, isto é, peroxidação lipídica e antioxidante de membrana demonstram correlação positiva significativa entre as TBARS livres e a vitamina E ($p=0,0229$; $R^2=0,1288$) e ausência de correlação entre as TBARS totais e a vitamina E ($p=0,1433$; $R^2=0,0570$).

Tabela 4. Parâmetros do sistema antioxidante hepático

	C	E	T	BE
Vitamina E hepática ($\mu\text{g}/\text{mg}$ gordura total)	$0,51 \pm 0,14$	$1,30 \pm 0,37^*$	$0,92 \pm 0,17^{*,**}$	$0,57 \pm 0,13^{**,***}$
GSH hepático ($\mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína)	$5,3 \pm 1,9$	$4,1 \pm 1,4$	$2,8 \pm 1,0^*$	$2,8 \pm 0,8^*$
Tióis totais hepático ($\mu\text{mol}/\text{g}$ de proteína)	$14,8 \pm 4,1$	$15,4 \pm 3,6$	$13,9 \pm 3,4$	$11,5 \pm 2,0$
Vitamina C hepática ($\text{g}/100 \text{ g}$ de tecido)	$15,7 \pm 3,3$	$36,1 \pm 7,6^*$	$28,4 \pm 7,6^{*,**}$	$34,0 \pm 6,4^*$

C=grupo controle; E=grupo etanol; T=grupo etanol+tiamina; BE=grupo etanol+benfotiamina

* $p < 0,05$ em relação ao Grupo C

** $p < 0,05$ em relação ao Grupo E

*** $p < 0,05$ em relação ao Grupo T

Figura 11. Correlações entre peroxidação lipídica e antioxidante de membrana hepáticas

7. Discussão:

O metabolismo do etanol produz radicais livres e espécies reativas de oxigênio com conseqüente consumo de substâncias antioxidantes levando a um desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes, conhecido como estresse oxidativo. Vários grupos de pesquisa têm se voltado ao estudo das doenças hepáticas provocadas pelo álcool, visto que esse é o órgão responsável por cerca de 95% de seu metabolismo (MASALKAR; ABHANG, 2005). Uma das frentes de estudo está relacionada com o uso de substâncias antioxidantes que possam auxiliar no equilíbrio do sistema antioxidante hepático diminuindo os efeitos deletérios provocados pelo estresse oxidativo (LIEBER, 2003).

O presente estudo objetivou avaliar os danos provocados pela administração aguda de etanol em ratos Wistar, um modelo experimental que produz efeitos semelhantes aos provocados pela ingestão maciça ("*binge drinking*") de etanol em humanos. Define-se ingestão maciça como aquela responsável por elevar para 0,8 g/L a concentração de álcool sanguíneo em uma única sessão (FARKE; ANDERSON, 2007). Em conjunto com a avaliação dos danos provocados nesse modelo experimental, avaliou-se também os efeitos do tratamento com duas formas da vitamina B1, tiamina hidrocloreto e benfotiamina.

É importante destacar que conforme demonstrado nas Figuras

4, 5 e 6 os animais apresentaram-se homogeneamente distribuídos em relação ao peso corporal e não houve diferenças entre as suas massas de fígado.

Os animais que receberam etanol (dose de 5 g/kg de peso) alcançaram valores séricos de etanol, com média de 1,66 g/L, compatíveis com o modelo experimental de intoxicação aguda, verificada mesmo após seis horas da infusão intragástrica (BIELAWSKI; ABEL, 2002). Outros estudos vêm a corroborar com os valores encontrados nesse estudo. Assim, BIELAWSKI & ABEL (2002) reportam valores sanguíneos de 2,3 g/L após 6 horas da administração intragástrica de 5 g/kg de etanol 20% em ratos. LIVY et al. (2003) relatam valor de aproximadamente 0,5 g/L após 6 horas da gavagem intragástrica de etanol na dose de 3,8 g/kg (concentração de 21%, m/v). PORTARI et al. (2008) verificaram aproximadamente 1,2 g/L após 6 horas da administração de etanol na dose de 5g/kg.

Embora não haja relatos na literatura, os valores de etanol hepático podem ser auxiliares na elucidação dos efeitos deletérios do metabolismo hepático dessa substância. Assim, foi verificada neste estudo uma correlação positiva entre os valores séricos e hepáticos de concentração de etanol. Além disso, o tratamento com tiamina e benfotiamina elevou as concentrações sérica e hepática de etanol comparadas com o grupo que recebeu somente etanol. A presença mais elevada de etanol intacto, i.e. não metabolizado, tem duas

possíveis explicações.

A primeira seria um aumento na metabolização via sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS – *Microsomal Ethanol Oxidizing System*), o qual aumentaria o fluxo dos vários compartimentos aquosos do organismo para o sangue e, conseqüentemente, para o fígado. Esta explicação estaria de acordo com os trabalhos de TABAKE & ITOKAWA (1982, 1983). Estes autores verificaram que a administração aguda de etanol diminui a concentração de tiamina (TAKABE; ITOKAWA, 1983). Em ratos deficientes em tiamina verificaram uma diminuição da atividade do MEOS que foi restaurada com a administração de tiamina ou tiamina difosfato (TAKABE; ITOKAWA, 1982).

A outra possibilidade, contrária aos achados de TABAKE e ITOKAWA, é de que o etanol permanece circulante no sangue com baixa metabolização no período ensaiado de 6 horas após o tratamento com as duas formas da vitamina B1. Essa possível explicação vem de encontro com os achados de PORTARI et al. (2008) que embora relatem uma queda na alcoolemia em ratos tratados com etanol e tiamina, verificaram uma maior excreção urinária de etanol intacto comparados com os ratos que só receberam etanol, indicando a não metabolização do álcool.

Outro achado de relevância do presente estudo foram as concentrações hepática, sérica e eritrocitária de tiamina e seus ésteres fosfatados encontrados após a administração oral de tiamina

hidrocloro e benfotiamina. Verificou-se um aumento hepático de tiamina na forma não fosfatada nos grupos T e BE, enquanto que as formas mono e difosfato não foram alteradas. Entretanto, os valores eritrocitários de todas as formas e séricos totais (representado principalmente pela tiamina livre) foram extremamente mais elevados nos animais que receberam benfotiamina em relação a todos os outros grupos e até mesmo ao grupo que recebeu tiamina hidrocloro. Estes achados podem ser explicados pelos modos distintos de absorção da tiamina e da benfotiamina.

A tiamina, por ser uma molécula positivamente carregada, requer um transportador para atravessar as membranas biológicas. Assim, o transporte da tiamina do intestino ao sangue se faz por dois passos com envolvimento de transportadores saturáveis o que torna a absorção mais lenta comparada com substâncias com caráter lipofílico (SINGLETON & MARTIN, 2001). Em contrapartida, a benfotiamina (S-benzoiltiamina monofosfato) é primeiramente defosforilada nas vilosidades do intestino por uma fosfatase alcalina extracelular gerando um composto mais lipossolúvel, a S-benzoiltiamina. A S-benzoiltiamina se difunde facilmente pelas membranas das células intestinais e endoteliais e entra na circulação mesentérica sendo capturada pelo fígado, no qual é hidrolisada em tiamina por tioesterases dos hepatócitos (VOLVERT et al., 2008). O excesso de tiamina hepática é então lançado no sangue onde é capturado pelos eritrócitos e transformado em tiamina difosfato pela

ação da enzima tiamina difosfoquinase.

Embora não se tenha relatos na literatura sobre a administração de benfotiamina após intoxicação aguda por etanol, alguns trabalhos verificaram a biodisponibilidade dessa substância em outras situações (FRANK et al., 2000; SCHUPP et al., 2008; VOLVERT et al., 2008). Dessa maneira, FRANK et al. (2000) compararam as concentrações eritrocitárias de pacientes com doença renal crônica após administração de nitrato de tiamina ou benfotiamina. Verificaram um grande aumento eritrocitário de tiamina difosfato com conseqüente aumento de atividade da transcetolase nos pacientes que receberam benfotiamina. Em estudo mais abrangente, VOLVERT et al. (2008) analisaram a farmacocinética de uma dose oral (gavagem intragástrica) de benfotiamina em camundongos. Estes autores verificaram um grande aumento de tiamina livre no fígado com pico máximo de concentração em 60 minutos após a administração, enquanto no sangue o pico máximo foi atingido em 120 minutos. SCHUPP et al. (2008) analisaram em estudo cego simples com pacientes renais crônicos com duração de 6 semanas o efeito da suplementação com benfotiamina na dose de 600 mg/dia e verificaram um aumento de 45 vezes na concentração plasmática de tiamina em relação ao grupo placebo.

Tais estudos vêm corroborar nossos resultados. Ainda que após 6 horas da administração de tiamina ou benfotiamina os valores hepáticos de tiamina livre sejam iguais, o estoque eritrocitário no

grupo BE foi superior (na ordem de 25 vezes) ao grupo T. Embora tal estoque eritrocitário não participe diretamente na defesa antioxidante do fígado, em estágios posteriores essa tiamina poderá ser recrutada novamente ao fígado.

É bem documentado que modelos de intoxicação aguda por etanol levam a um dano hepático devido ao estresse oxidativo provocado pela formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e conseqüente consumo de antioxidantes (NAVASUMRIT et al., 2000; JORDAO et al., 2004; LI et al., 2004; PATEL et al., 2005; PORTARI et al., 2008). Essa constatação pode ser verificada pelos valores das enzimas ALT e AST aumentadas no grupo que recebeu apenas etanol. Verifica-se também que os grupos que receberam tiamina ou benfotiamina tiveram valores normais desses marcadores de lesão hepática.

Somando-se a isso, verificou-se um aumento das TBARS hepáticas e séricas e dos hidroperóxidos que representam um índice da peroxidação lipídica. Entretanto, esses índices foram sempre menores nos grupos que receberam tratamento com alguma das formas de tiamina. Cabe ressaltar que no presente estudo foram quantificados os valores livres e totais das TBARS as quais diferem em ordem de grandeza de 10^6 unidades. As TBARS são moléculas tidas como de alta reatividade que ligam-se às macromoléculas. A quantificação dos valores totais dessas substâncias tem um significado biológico de grande interesse principalmente para se saber

a magnitude da peroxidação lipídica.

Alguns estudos têm apontado um papel antioxidante da tiamina e da benfotiamina. Assim LUKIENKO et al. (2000) postularam que a tiamina interage diretamente com radicais livres e hidroperóxidos sendo oxidada à tiocromo e tiamina dissulfeto. OKAI et al. (2007) verificaram uma ação inibitória na produção de radicais livres, incluindo radicais superóxido e hidroxila, em ensaios com tiamina e tiamina difosfato atribuindo-se em parte à quelação de metais pela forma fosfatada.

Outros autores atribuem os efeitos antioxidantes da tiamina ou benfotiamina à ativação da enzima transcetolase. Esta ativação diminuiria o fluxo de substratos (gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato) para produção de AGEs (Figura 2) desviando a glicólise para a via das pentoses com conseqüente diminuição do estresse oxidativo e carbonílico (BERRONE et al., 2006; BELTRAMO et al., 2008).

Entretanto, a forma que atua como cofator para a transcetolase é a tiamina difosfato (MEHTA et al., 2008) que neste estudo não esteve aumentada no fígado, o que nos leva a acreditar que o efeito antioxidante verificado aqui não fora por ativação da enzima referida e, sim diretamente, pela tiamina. CEYLAN-ISIK et al. (2006) verificaram o abrandamento do estresse oxidativo e restauro da função de miócitos cardíacos de camundongos diabéticos sem afetar a produção de AGEs ou proteínas carboniladas. De modo semelhante, WU & REN (2006) verificaram diminuição do estresse oxidativo

cerebral induzido pelo diabetes sem a participação da diminuição de AGEs.

As análises dos AOPP hepático e sérico revelaram a não influência da administração de etanol, visto que as concentrações do grupo E não apresentou diferença com o grupo C. No entanto, o tratamento com benfotiamina diminuiu as concentrações dos AOPP tanto hepáticas quanto séricas.

O conteúdo de proteínas carboniladas parece não se alterar em modelo agudo de intoxicação por etanol (OH et al., 1997; REILLY et al., 2000; KANBAGLI et al., 2002), visto neste estudo pela ausência de diferença entre os grupos C, E e T. No entanto o grupo tratado com benfotiamina apresentou diminuição na concentração hepática deste marcador de dano oxidativo em proteínas. REILLY et al. (2000) verificaram aumento significativo de proteínas carboniladas no fígado de ratos somente 24 horas após à exposição aos radicais hidroxila e superóxido. Dessa forma, os valores de proteína carbonilada encontrados no presente experimento após 6 horas da administração do etanol podem representar o início de um aumento na concentração, o qual foi parcialmente bloqueado pelo tratamento com benfotiamina.

Dos antioxidantes de membrana o α -tocoferol (vitamina E) é o mais importante na defesa contra o ataque dos radicais livres neutralizando os hidroperóxidos formados (JORDAO et al., 2004; DE CABO; BURGESS; NAVAS, 2006). Em modelos experimentais de

alcoolismo crônico parece estar bem estabelecida uma queda gradual dessa vitamina com o passar do período experimental refletindo um consumo frente à injúria provocada pelo metabolismo do etanol (PORTARI et al., 2003; THIRUNAVUKKARASU; ANURADHA; VISWANATHAN, 2003). Esse mesmo comportamento não é verificado nos modelos agudos em que se encontra, com dependência do tempo de coleta do material biológico e exposição ao tratamento, valores de vitamina E que podem refletir estados transitórios do metabolismo. Esse comportamento foi verificado neste estudo pois a concentração de vitamina E hepática manteve-se no grupo que recebeu benfotiamina como tratamento. Contrário ao esperado houve um aumento no grupo que não recebeu nenhum tratamento (grupo E). Esse aumento da vitamina no grupo E pode ser entendido como um efeito rebote, provocado pela injúria representada pelo aumento da peroxidação lipídica nesse grupo que estaria requisitando essa vitamina de outros compartimentos. Entretanto, no grupo que recebeu tratamento com benfotiamina verifica-se valores menores das TBARS livres. Tal explicação é reforçada pela correlação significativa verificada entre as concentrações das TBARS livres hepáticas e os valores de vitamina E hepáticos. Esta correlação pode ser entendida como uma menor produção de hidroperóxidos conseqüente ao seqüestro dos radicais livres pela alta concentração de tiamina e nos grupos que não tiveram essa proteção foi necessária a requisição de quantidade extra de vitamina E para bloquear a

peroxidação lipídica.

Dentre os antioxidantes hidrofílicos não enzimáticos a glutathiona reduzida (GSH) e a vitamina C são os mais importantes no restauro do radical tocoferila, gerado pela ação neutralizante da vitamina E sobre os hidroperóxidos. A queda na concentração hepática de GSH verificada nos grupos que receberam tratamento comparada com aqueles que não o receberam, podem ser indicativas de uma interação de radicais tiis, formados da interação direta da tiamina com radicais livres, com a GSH. Essa interação seria de um radical tiil ($TS\bullet$) com a GSH para formar um dissulfeto TSSG que, posteriormente, pela ação da enzima glutathiona redutase regeneraria a GSH e a tiamina (LUKIENKO et al., 2000; PORTARI et al., 2008).

Em relação à vitamina C hepática nossos dados diferem com alguns achados da literatura (THIRUNAVUKKARASU; ANURADHA; VISWANATHAN, 2003; JURCZUK; BRZOSKA; MONIUSZKO-JAKONIUK, 2007) principalmente devido a diferenças no tempo de estudo. Assim, THIRUNAVUKKARASU; ANURADHA & VISWANATHAN. (2003) verificaram em estudo crônico de 60 dias com administração de 3g de etanol/kg de peso/dia uma queda de 53% na concentração de vitamina C hepática dos ratos. JURCZUK; BRZOSKA & MONIUSZKO-JAKONIUK (2007) em estudo de 12 semanas com administração de 5 g de etanol/kg de peso/dia também verificaram diminuição de 17% em relação aos ratos controles. Para o período experimental de 6 horas representado pelo nosso estudo verificou-se um comportamento

semelhante ao encontrado para a vitamina E anteriormente discutida, em que um efeito rebote ficou evidenciado. Cabe ressaltar aqui que os ratos são capazes de sintetizar vitamina C e, provavelmente, o fizeram em resposta à injúria provocada pela administração de etanol, visto que todos os grupos que receberam etanol apresentaram vitamina C hepática aumentada.

Em suma, os principais achados desse estudo referem-se ao relevante aumento de tiamina hepática após tratamento com tiamina ou benfotiamina e o surpreendente aumento de tiamina livre e da forma difosfato nos estoques eritrocitários promovido pela administração da benfotiamina, com aumento de 100 vezes comparado com o grupo controle e de 25 vezes comparado com o tratamento com tiamina HCl. Além disso, por meio dos parâmetros estudados ficou demonstrada a participação da tiamina em sua forma não fosforilada como antioxidante hepático.

8. Conclusões:

Com os achados do presente estudo e discutidos anteriormente pode-se concluir que:

- No modelo experimental estudado a administração aguda de etanol atingiu níveis de intoxicação verificada pelas determinações de etanol sérico e hepático, sendo estes níveis modulados pela tiamina ou benfotiamina;
- O estresse oxidativo foi verificado através do aumento das TBARS e hidroperóxidos, sendo estes valores diminuídos pela administração de tiamina e benfotiamina;
- No sistema antioxidante hepático verificou-se a manutenção dos níveis de vitaminas E e C e com interação do GSH no restauro da tiamina, a qual atuou diretamente como antioxidante

Portanto, ficou evidente que tanto a tiamina como a benfotiamina exerceram um papel fundamental na preservação do sistema antioxidante hepático. Assim sendo, e principalmente pelo grande aumento dos valores eritrocitários de tiamina no grupo BE, a recomendação seria pela utilização de benfotiamina como antioxidante mais biodisponível que a tiamina.

Referências:

ABERLE, N. S., 2ND; BURD, L.; ZHAO, B. H.; REN, J. Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12. *Alcohol Alcohol.* Oxford, v. 39, n. 5, p. 450-4, 2004.

AHMED, N.; LUTHEN, R.; HAUSSINGER, D.; SEBEKOVA, K.; SCHINZEL, R.; VOELKER, W.; HEIDLAND, A.; THORNALLEY, P. J. Increased protein glycation in cirrhosis and therapeutic strategies to prevent it. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 1043, p. 718-24, 2005.

ALBANO, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc. Nutr. Soc.*, Wallingford, v. 65, n. 3, p. 278-90, 2006.

ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, S.; KIA, D.; FAVIER, A. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 572, n. 1-2, p. 103-16, 1991.

BATIFOULIER, F.; VERNY, M. A.; BESSON, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Determination of thiamine and its phosphate esters in rat tissues analyzed as thiochromes on a RP-amide C16 column. *J.*

Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., Amsterdam, v. 816, n. 1-2, p. 67-72, 2005.

BELTRAMO, E.; BERRONE, E.; TARALLO, S.; PORTA, M. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. *Acta Diabetol.*, Berlin, v. 45, n. 3, p. 131-41, 2008.

BERRONE, E.; BELTRAMO, E.; SOLIMINE, C.; APE, A. U.; PORTA, M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J. Biol. Chem.*, San Francisco, v. 281, n. 14, p. 9307-13, 2006.

BESSEY, O. A. Ascorbic acid. *Vitamin Methods*: Academic Press, 1960. p. 303.

BIELAWSKI, D. M.; ABEL, E. L. The effect of administering ethanol as single vs. divided doses on blood alcohol levels in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, Elmsford, v. 24, n. 4, p. 559-62, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-7, 1959.

BONJOUR, J. P. Vitamins and alcoholism. IV. Thiamin. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v. 50, n. 3, p. 321-38, 1980.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, New York, v. 52, p. 302-10, 1978.

CEYLAN-ISIK, A. F.; WU, S.; LI, Q.; LI, S. Y.; REN, J. High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Appl. Physiol.*, Bethesda, v. 100, n. 1, p. 150-6, 2006.

CIGHETTI, G.; DEBIASI, S.; PARONI, R.; ALLEVI, P. Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography mass spectrometry: What is needed for an accurate detection. *Anal. Biochem.*, New York, v. 266, n. 2, p. 222-229, 1999.

DE CABO, R.; BURGESS, J. R.; NAVAS, P. Adaptations to oxidative stress induced by vitamin E deficiency in rat liver. *J. Bioenerg. Biomembr.*, New York, v. 38, n. 5-6, p. 309-17, 2006.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, Heidelberg, v. 15, n. 4, p. 316-28, 2005.

FARKE, W.; ANDERSON, P. Binge drinking in Europe. *Adicciones*, Palma de Mallorca, v. 19, n. 4, p. 333-9, 2007.

FERNANDEZ-CHECA, J. C.; KAPLOWITZ, N.; COLELL, A.; GARCIA-RUIZ, C. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res. World*, Rockville, v. 21, n. 4, p. 321-4, 1997.

FRANK, T.; BITSCH, R.; MAIWALD, J.; STEIN, G. High thiamine diphosphate concentrations in erythrocytes can be achieved in dialysis patients by oral administration of benfontiamine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 56, n. 3, p. 251-7, 2000.

GONZALEZ, F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 569, n. 1-2, p. 101-10, 2005.

GYAMFI, M. A.; WAN, Y. J. The effect of ethanol, ethanol metabolizing enzyme inhibitors, and Vitamin E on regulating glutathione, glutathione S-transferase, and S-adenosylmethionine in mouse primary hepatocyte. *Hepatol. Res.*, Amsterdam, Mar 13 2006.

HAMMES, H. P.; DU, X.; EDELSTEIN, D.; TAGUCHI, T.; MATSUMURA, T.; JU, Q.; LIN, J.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.; HANNAK, D.;

NEUMAIER, M.; BERGFELD, R.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.*, New York, v. 9, n. 3, p. 294-9, 2003.

HERVE, C.; BEYNE, P.; DELACOUX, E. Determination of Thiamine and Its Phosphate-Esters in Human Erythrocytes by High-Performance Liquid-Chromatography with Isocratic Elution. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, msterdam, v. 653, n. 2, p. 217-220, 1994.

JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDERBAUM, A. I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.*, Cary, v. 65, n. 2, p. 166-76, 2002.

JONES, A. W.; JONSSON, K. A.; KECHAGIAS, S. Effect of high-fat, high-protein, and high-carbohydrate meals on the pharmacokinetics of a small dose of ethanol. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 44, n. 6, p. 521-6, 1997.

JORDAO, A. A., JR.; CHIARELLO, P. G.; ARANTES, M. R.; MEIRELLES, M. S.; VANNUCCHI, H. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v. 42, n. 3, p. 459-64, 2004.

JURCZUK, M.; BRZOSKA, M. M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead- and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v. 45, n. 8, p. 1478-86, 2007.

KALOUSOVA, M.; ZIMA, T.; POPOV, P.; SPACEK, P.; BRAUN, M.; SOUKUPOVA, J.; PELINKOVA, K.; KIENTSCH-ENGEL, R. Advanced glycation end-products in patients with chronic alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.*, Oxford, v. 39, n. 4, p. 316-20, 2004.

KANBAGLI, O.; BALKAN, J.; AYKAC-TOKER, G.; UYSAL, M. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v. 25, n. 11, p. 1482-4, 2002.

KARACHALIAS, N.; BABAEI-JADIDI, R.; KUPICH, C.; AHMED, N.; THORNALLEY, P. J. High-dose thiamine therapy counters dyslipidemia and advanced glycation of plasma protein in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 1043, p. 777-83, 2005.

KLOCKHOFF, H.; NASLUND, I.; JONES, A. W. Faster absorption of ethanol and higher peak concentration in women after gastric bypass surgery. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 54, n. 6, p. 587-91, 2002.

LAPOLLA, A.; REITANO, R.; SERAGLIA, R.; SARTORE, G.; RAGAZZI, E.; TRALDI, P. Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.*, Weinheim, v. 49, n. 7, p. 685-90, 2005.

LEVITT, M. D.; LI, R.; DEMASTER, E. G.; ELSON, M.; FURNE, J.; LEVITT, D. G. Use of measurements of ethanol absorption from stomach and intestine to assess human ethanol metabolism. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 273, n. 4 Pt 1, p. G951-7, 1997.

LI, Y. M.; CHEN, S. H.; YU, C. H.; ZHANG, Y.; XU, G. Y. Effect of acute alcoholism on hepatic enzymes and oxidation/antioxidation in rats. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, Qingchunru, v. 3, n. 2, p. 241-4, 2004.

LIEBER, C. S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res. Health*, Rockville, v. 27, n. 3, p. 220-31, 2003.

LIEBER, C. S.. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab. Rev.*, Philadelphia, v. 36, n. 3-4, p. 511-29, 2004.

_____. Metabolism of alcohol. *Clin. Liver Dis.*, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 1-35, 2005.

LIVY, D. J.; PARNELL, S. E.; WEST, J. R. Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol*, Fayetteville, v. 29, n. 3, p. 165-71, 2003.

LONSDALE, D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Oxford, v. 3, n. 1, p. 49-59, 2006.

LU, J.; FRANK, E. L. Rapid HPLC measurement of thiamine and its phosphate esters in whole blood. *Clin. Chem.*, Baltimore, v. 54, n. 5, p. 901-906, 2008.

LUKIENKO, P. I.; MEL'NICHENKO, N. G.; ZVERINSKII, I. V.; ZABRODSKAYA, S. V. Antioxidant properties of thiamine. *Bull. Exp. Biol. Med.*, New York, v. 130, n. 9, p. 874-6, 2000.

MASALKAR, P. D.; ABHANG, S. A. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 355, n. 1-2, p. 61-5, May 2005.

MCKILLOP, I. H.; SCHRUM, L. W. Alcohol and liver cancer. *Alcohol*, Fayetteville, v. 35, n. 3, p. 195-203, 2005.

MEHTA, R.; SHANGARI, N.; O'BRIEN, P. J. Preventing cell death induced by carbonyl stress, oxidative stress or mitochondrial toxins with vitamin B anti-AGE agents. *Mol. Nutr. Food Res.*, Weinheim, v. 52, n. 3, p. 379-85, 2008.

MIYATA, T.; KUROKAWA, K.; VAN YPERSELE DE STRIHOU, C. Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J. Am. Soc. Nephrol.*, Baltimore, v. 11, n. 9, p. 1744-52, 2000.

NANDI, D.; PATRA, R. C.; SWARUP, D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology*, Amsterdam, v. 211, n. 1-2, p. 26-35, 2005.

NAVASUMRIT, P.; WARD, T. H.; DODD, N. J.; O'CONNOR, P. J. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis*, New York, v. 21, n. 1, p. 93-9, 2000.

ODETTI, P.; GARIBALDI, S.; GURRERI, G.; ARAGNO, I.; DAPINO, D.; PRONZATO, M. A.; MARINARI, U. M. Protein oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. *Metabolism*, Philadelphia, v. 45, n. 11, p. 1319-22, 1996.

OH, S. I.; KIM, C. I.; CHUN, H. J.; LEE, M. S.; PARK, S. C. Glutathione recycling is attenuated by acute ethanol feeding in rat liver. *J. Korean Med. Sci.*, Seoul, v. 12, n. 4, p. 316-21, 1997.

OKAI, Y.; HIGASHI-OKAI, K.; E, F. S.; KONAKA, R.; INOUE, M. Potent radical-scavenging activities of thiamin and thiamin diphosphate. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, Mitake, v. 40, n. 1, p. 42-48, 2007.

OLIVEIRA, E. R.; LUIS, M. A. Alcohol-related disorders in a psychiatric emergency service. Ribeirao Preto, Brazil. *Cad. Saude Publica*, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 171-179, 1996.

ONETA, C. M.; SIMANOWSKI, U. A.; MARTINEZ, M.; ALLALI-HASSANI, A.; PARES, X.; HOMANN, N.; CONRADT, C.; WALDHERR, R.; FIEHN, W.; COUTELLE, C.; SEITZ, H. K. First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut*, London, v. 43, n. 5, p. 612-9, 1998.

OSAWA, T.; KATO, Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 1043, p. 440-51, 2005.

PASTINO, G. M.; CONOLLY, R. B. Application of a physiologically based pharmacokinetic model to estimate the bioavailability of ethanol in male rats: distinction between gastric and hepatic pathways of metabolic clearance. *Toxicol. Sci.*, Orlando, v. 55, n. 2, p. 256-65, 2000.

PATEL, V. B.; WORRALL, S.; EMERY, P. W.; PREEDY, V. R. Protein adduct species in muscle and liver of rats following acute ethanol administration. *Alcohol Alcohol.*, Oxford, v. 40, n. 6, p. 485-93, 2005.

POMERO, F.; MOLINAR MIN, A.; LA SELVA, M.; ALLIONE, A.; MOLINATTI, G. M.; PORTA, M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol.*, Berlin, v. 38, n. 3, p. 135-8, 2001.

PORTARI, G. V.; JORDAO JUNIOR, A. A.; MEIRELLES, M. S.; MARCHINI, J. S.; VANNUCCHI, H. Effect of beta-carotene supplementation on rats submitted to chronic ethanol ingestion. *Drug Chem. Toxicol.*, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 191-8, 2003.

PORTARI, G. V.; MARCHINI, J. S.; JORDAO, A. A. Validation of a manual headspace gas chromatography method for determining volatile compounds in biological fluids. *Lab. Med.*, Chicago, v. 39, n. 1, p. 42-45, 2008.

PORTARI, G. V.; MARCHINI, J. S.; VANNUCCHI, H.; JORDAO, A. A. Antioxidant effect of thiamine on acutely alcoholized rats and lack of efficacy using thiamine or glucose to reduce blood alcohol content. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v. 103, n. 5, p. 482-486, 2008.

REED, D. J. Mitochondrial glutathione and chemically induced stress including ethanol. *Drug Metab. Rev.*, Philadelphia, v. 36, n. 3-4, p. 569-82, 2004.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of

Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

REILLY, M. E.; MANTLE, D.; SALISBURY, J.; PETERS, T. J.; PREEDY, V. R. Comparative effects of acute ethanol dosage on liver and muscle protein metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 60, n. 12, p. 1773-85, 2000.

SANCHEZ-RAMIREZ, G. M.; CARAM-SALAS, N. L.; ROCHA-GONZALEZ, H. I.; VIDAL-CANTU, G. C.; MEDINA-SANTILLAN, R.; REYES-GARCIA, G.; GRANADOS-SOTO, V. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 530, n. 1-2, p. 48-53, 2006.

SCHUPP, N.; DETTE, E. M.; SCHMID, U.; BAHNER, U.; WINKLER, M.; HEIDLAND, A.; STOPPER, H. Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, Berlin, v. 378, n. 3, p. 283-91, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, New York, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol. Chem.*, Berlin, v. 387, n. 4, p. 349-60, 2006.

SHANGARI, N.; DEPEINT, F.; FURRER, R.; BRUCE, W. R.; O'BRIEN, P. J. The effects of partial thiamin deficiency and oxidative stress (i.e., glyoxal and methylglyoxal) on the levels of alpha-oxoaldehyde plasma protein adducts in Fischer 344 rats. *FEBS Lett.*, Amsterdam, v. 579, n. 25, p. 5596-602, 2005.

SINGLETON, C. K.; MARTIN, P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr. Mol. Med.*, Hilversum, v. 1, n. 2, p. 197-207, 2001.

STOYANOVSKY, D. A.; WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Interaction of 1-hydroxyethyl radical with glutathione, ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Free Radic. Biol. Med.*, Tarrytown, v. 24, n. 1, p. 132-8, 1998.

TAKABE, M.; ITOKAWA, Y. An experimental study of thiamine metabolism in acute ethanol intoxication. *Experientia*, Basel, v. 36, n. 3, p. 327-8, 1980.

_____. Participation of thiamin in hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v. 52, n. 3, p. 260-5, 1982.

TAKABE, M.; ITOKAWA, Y. Thiamin depletion after ethanol and acetaldehyde administration to rabbits. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, Tokyo, v. 29, n. 5, p. 509-14, 1983.

THIRUNAVUKKARASU, V.; ANURADHA, C. V.; VISWANATHAN, P. Protective effect of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds in experimental ethanol toxicity. *Phytother. Res.*, Chichester, v. 17, n. 7, p. 737-43, 2003.

THORNALLEY, P. J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int. Rev. Neurobiol.*, New York, v. 50, p. 37-57, 2002.

TUMA, D. J.; CASEY, C. A. Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. *Alcohol Res. Health*, Rockville, v. 27, n. 4, p. 285-90, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological

functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VOLVERT, M. L.; SEYEN, S.; PIETTE, M.; EVRARD, B.; GANGOLF, M.; PLUMIER, J. C.; BETTENDORFF, L. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol.*, London, v. 8, p. 10, 2008.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPEILLERE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A. T.; ZINGRAFF, J.; JUNGERS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, New York, v. 49, n. 5, p. 1304-13, 1996.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res. Health*, Rockville, v. 27, n. 4, p. 277-84, 2003.

_____. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v. 207, n. 2 Suppl, p. 70-6, 2005.

WU, S.; REN, J. Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product,

tissue factor and TNF-alpha. *Neurosci. Lett.*, Limerick, v. 394, n. 2, p. 158-62, 2006.

YOST, D. A. Acute care for alcohol intoxication. Be prepared to consider clinical dilemmas. *Postgrad. Med.*, New York, v. 112, n. 6, p. 14-6, 21-2, 2002.

ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 152/2006, sobre o projeto intitulado "*Avaliação do tratamento com tiamina, benfotiamina ou piridoxamina sobre sistema antioxidante hepático em modelos experimentais agudo e crônico de alcoolismo*", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **29 de janeiro de 2007**.

(We certify that the protocol nº 152/2006, about "*Evaluation of treatment with thiamine, benfotiamine or pyridoxamine on hepatic antioxidant system in acute and chronic ethanol models*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 01/29/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 31 de janeiro de 2007.

Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal