

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de Mestrado

Efeito antioxidante e hepatoprotetor do E-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol em um modelo de dano oxidativo induzido por tioacetamida em ratos.

Angélica Schiavom dos Reis

Pelotas, 2017

Angélica Schiavom dos Reis

Efeito antioxidante e hepatoprotetor do E-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol em um modelo de dano oxidativo induzido por tioacetamida em ratos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R375e Reis, Angélica Schiavom dos

Efeito antioxidante e hepatoprotetor do e-2-benzilide-o-4-fenil-1,3-disselenol em um modelo de dano oxidativo induzido por tioacetamida em ratos / Angélica Schiavom dos Reis ; Ethel Antunes Wilhelm, orientadora ; Cristiane Luchese, coorientadora. – Pelotas, 2017.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Selênio. 2. Tioacetamida. 3. Estresse oxidativo. 4. Fígado. 5. Antioxidante. I. Wilhelm, Ethel Antunes, orient. II. Luchese, Cristiane, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Angélica Schiavom dos Reis

Título: Efeito antioxidante e hepatoprotetor do E-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol em um modelo de dano oxidativo induzido por tioacetamida em ratos.

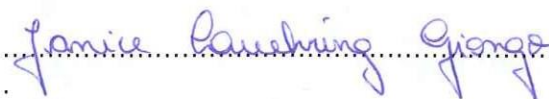
Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/09/2017

Banca examinadora:



.....Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.



.....Prof^a. Dr^a. Janice Luehring Giongo
Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.



.....Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher
Doutor em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

"Tu te tornas eternamente responsável pelo que cativas...Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram ao acaso."

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que sempre me guiou e me fez chegar até aqui.

À minha mãe Luiza, por todo esforço, incentivo e oportunidades que me dedicou. A meu pai José (*in memoriam*) e meu padrasto Nelson (*in memoriam*) por terem me dedicado amizade e apoio incondicional. Agradeço minha avó Leda e meu avô Luiz (*in memoriam*) pelos esforços, torcida e todas as orações.

Agradeço ao meu marido Paulo Renato. Obrigada por estar sempre ao meu lado, torcer e principalmente por acreditar em mim. Muito obrigado pelo carinho, pela confiança, a amizade e as palavras de incentivo. Essa conquista também é sua.

À minha orientadora, Ethel, muito obrigada pela confiança depositada em mim e por acreditar que no final tudo daria certo. Sou grata por sua dedicação, paciência e carinho.

A Cristiane, minha coorientadora e pessoa responsável por me inserir neste grupo de pesquisa do qual tanto me orgulho, obrigada pela oportunidade e tempo dedicado.

A todos colegas queridos do Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio), Anelise, Caren, Gabriela, Guilherme, Jaini, Karline, Marina, Milene e Renata agradeço a vocês pelo companheirismo, ajuda e carinho. Em especial a Ane e a Mikaela, meu muito obrigado pelo apoio, incentivo e amizade, foram fundamentais, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido. Obrigada a todos por fazerem meus dias mais alegres.

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade, espaço e recursos fornecidos para a realização desse trabalho. A CAPES, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho. Bem como, aos professores do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, por todos ensinamentos dispensados.

Enfim, deixo meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte de alguma forma desse trabalho.

RESUMO

REIS, Angélica Schiavom dos. **Efeito antioxidante e hepatoprotetor do E-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol em um modelo de dano oxidativo induzido por tioacetamida em ratos.** 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O fígado desempenha um grande número de funções para a homeostase do organismo, destacando-se no controle de produção de energia, defesa imunológica e reserva volêmica, demonstrando assim uma extraordinária pluralidade funcional. Entretanto, o ser humano está diariamente exposto a uma diversidade de compostos que causam danos no tecido hepático, tais como no uso de tintas, solventes orgânicos, reagentes químicos, fungicidas e na exposição ao cigarro. Diante disso, evidencia-se a necessidade da busca por terapias que previnam ou até mesmo revertam a intoxicação causada por estes compostos. Uma vez que o estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento e/ou manutenção de diversas patologias, principalmente nas doenças hepáticas, o uso de terapias antioxidantes deve ser considerado. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o possível efeito protetor do composto (E)-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol (BPD) contra o dano hepático induzido pela tioacetamida (TAA) em ratos *Wistar*. No primeiro dia de tratamento, os animais receberam a administração oral de BPD (10 ou 50 mg/kg). No segundo dia, os ratos receberam uma única injeção intraperitoneal de TAA (400 mg/kg). Vinte e quatro horas após a administração de TAA, foram realizadas determinações bioquímicas e análise histológica do fígado. O BPD (50 mg/kg) diminuiu a atividade plasmática das enzimas aspartato e alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase que se encontravam aumentadas pela exposição à TAA. O tratamento com BPD foi eficaz em proteger contra o aumento dos níveis de peroxidação lipídica, além de, atenuar a queda dos níveis de glutathiona e ácido ascórbico, bem como, a inibição da atividade da glutathiona peroxidase causada pela exposição à TAA. O BPD (50 mg/kg) protegeu contra a inibição da atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase hepática induzida por TAA. Por fim, o exame histopatológico do fígado mostrou que o BPD melhorou significativamente a lesão hepática induzida por TAA. Portanto, de acordo com os dados pode-se inferir que o BPD protegeu contra hepatotoxicidade e estresse oxidativo causado pela exposição à TAA em ratos.

Palavras-chave: selênio; tioacetamida; estresse oxidativo; fígado; antioxidante.

ABSTRACT

REIS, Angélica Schiavom dos. **Antioxidant and hepatoprotective effects of E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole in a model of oxidative damage induced by thioacetamide in rats.** 2017. 56 p. Dissertation (master's degree in biochemistry and bioprospecting) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The liver performs many functions for the homeostasis of the organism, standing out in the control of energy production, immune defense and volume reserve, thus demonstrating an extraordinary functional plurality. However, humans are exposed daily to a variety of compounds that cause damage to liver tissue, such as the use of paints, organic solvents, chemical reagents, fungicides, and exposure to cigarettes. In view of this, it is evident the need to search for therapies that prevent or even reverse the intoxication caused by these compounds. Since oxidative stress is involved in the development and / or maintenance of various pathologies, especially in liver diseases, the use of antioxidant therapies should be considered. In this context, the aim of this study was to investigate whether (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole (BPD) protects against hepatotoxicity induced by thioacetamide (TAA) in Wistar rats. On the first day of treatment, the animals received the oral administration of BPD (10 or 50 mg/kg). On the second day, the rats received a single intraperitoneal injection of TAA (400 mg/kg). Twenty-four hours after TAA administration, biochemical determinations and liver histological analysis were carried out. BPD (50 mg/kg) reduced plasma aspartate and alanine aminotransferases, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase activities increased by TAA exposure. Treatment with BPD was effective against increased lipid peroxidation levels and attenuated a decrease in hepatic reduced glutathione and ascorbic acid levels as well as an inhibition of glutathione peroxidase activity caused by TAA exposure. The inhibition of hepatic δ -aminolevulinic dehydratase activity induced by TAA was protected by BPD (50 mg/kg). Finally, histopathological examination of liver showed that BPD markedly ameliorated TAA-induced hepatic injury. In conclusion, BPD protected against hepatotoxicity and oxidative stress caused by TAA exposure in rats.

Keywords: selenium; thioacetamide; oxidative stress; liver; antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1	Estrutura química do (E)-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol (BPD).....	15
Figura 2	Localização do fígado no organismo humano.....	17
Figura 3	Indicadores bioquímicos de hepatotoxicidade.....	20
Figura 4	Estrutura do tetracloreto de carbono	22
Figura 5	Ativação metabólica do tetracloreto de carbono.....	23
Figura 6	Estrutura do paracetamol.....	24
Figura 7	Ativação metabólica do paracetamol.....	25
Figura 8	Estrutura da tioacetamida.....	26
Figura 9	Ativação metabólica da tioacetamida.....	27
Figura 10	Alguns fatores associados ao dano oxidativo.....	29

Artigo Científico

Figura 1	Chemical structure of BPD	36
Figura 2	Effect of BPD on the hepatic lipid peroxidation levels of rats exposed to TAA (thioacetamide).....	38
Figura 3	Effect of BPD on the hepatic ascorbic acid (AA) levels (A) and catalase (CAT) activity (B) of rats exposed to TAA.....	38
Figura 4	Effect of BPD on the hepatic reduced glutathione (GSH) levels (A), glutathione peroxidase (GPx) activity (B) and glutathione reductase (GR) activity (C) of rats exposed to TAA.....	39
Figura 5	Effect of BPD on the hepatic δ -Aminolevulinic dehydratase (δ -ALA-D) activity of rats exposed to TAA (thioacetamide).....	39
Figura 6	Photomicrography of the hepatic lobe segment (A) of a control animal, which shows a normal aspect; (B) of an animal exposed to TAA, which shows increased cell infiltration in the sinusoid capillaries and surroundings of the centrilobular veins (asterisk) and tissue disorganization (arrow); (C) of an animal treated with BPD at a dose of 50 mg/kg, which shows normal tissue appearance with the presence of normal hepatocyte strings and sinusoid capillaries, (D) of an animal treated with BPD at a dose of 10 mg/kg and exposed to TAA which shows the presence of cellular infiltration and vacuolization and (E) of an animal treated with BPD at a dose of 50 mg/kg and exposed to TAA, which shows normal histological architecture, without morphological alterations. Note the absence of cellular infiltration and vacuolization. H.E. 100X. Centrilobular vein (cv); Hepatocyte strings (arrow), cell infiltration (asterisk).....	40

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico

Tabela 1	Effect of BPD on ALT, AST, LDH and ALP activities of rats exposed to TAA.....	37
Tabela 2	Effect of treatment with BPD on histopathological scores in hepatic injury induced by TAA exposure in rats.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BPD	E-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol
CAT	Catalase
CH	Colesterol
CYP450	Citocromo P450
DL ₅₀	Dose que causa 50% de morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FA	Fosfatase alcalina
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione S-transferase
GR	Glutathione reductase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
TAA	Tioacetamida
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
γ-GT	γ- glutamil - transferase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	OBJETIVO GERAL	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1.	FÍGADO.....	17
3.2.	HEPATOTOXICIDADE.....	19
3.3.	MODELOS EXPERIMENTAIS DE HEPATOTOXICIDADE.....	21
3.3.1.	INDUTORES DE HEPATOTOXICIDADE MAIS UTILIZADOS..	22
3.3.1.1.	TETRACLORETO DE CARBONO (CCl ₄).....	22
3.3.1.2.	PARACETAMOL.....	24
3.3.1.3.	TIOACETAMIDA (TAA).....	26
3.4.	HEPATOTOXICIDADE X ESTRESSE OXIDATIVO.....	28
3.5.	COMPOSTOS CONTENDO Se X ATIVIDADE HEPATOPROTETORA.....	30
3.5.1.	E-2-BENZILIDENO-4-FENIL-1,3-DISSELENOL (BPD).....	32
4.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	34
5.	CONCLUSÕES.....	42
	PERSPECTIVAS.....	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO.....	56

1. Introdução

O fígado é o órgão responsável por desempenhar diversas funções essenciais para a manutenção do metabolismo corporal, dentre essas destaca-se a eliminação de metabólitos provenientes da biotransformação de xenobióticos (GHAFFARI; GHASSAM; PRAKASH, 2012; SILVERTHORN, 2010). Sendo assim, o fígado está particularmente suscetível aos danos causados por uma série de agentes tóxicos que podem ser tanto de origem exógena quanto endógena, como no caso das espécies reativas (LAM et al., 2016). Diante disso, evidencia-se a importância do uso de modelos animais para avaliar o potencial terapêutico de compostos com ação antioxidante na modulação do estresse oxidativo em injúrias hepáticas.

Uma das principais causas de morte no mundo é o câncer. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) ao menos 10 milhões de mortes são decorrentes desta doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014), destacando-se entre essas o câncer hepático como a terceira causa de morte. Ainda, outra doença hepática de grande relevância e que está associada a elevados índices de mortalidade é a cirrose que pode afetar de 20 a 99,3 pessoas em cada 100 mil habitantes (Ásia, África e América Latina) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Neste contexto, tendo em vista que as hepatopatias representam um grave problema de saúde mundial, diversos esforços têm sido dedicados com o objetivo de melhor compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos nessas doenças. É importante que estas hepatopatias sejam precocemente detectadas, e que se possibilite o desenvolvimento de terapias alternativas que busquem a cura ou, ao menos, a melhora dos sintomas, o que permite aos pacientes um aumento e melhora na sobrevida.

Os modelos de dano hepático em roedores são utilizados para elucidar os processos bioquímicos envolvidos nas hepatopatias. Neste contexto, o uso de substâncias indutoras de hepatotoxicidade proporcionam modelos estáveis e, além disso, diversos agentes químicos estão disponíveis para serem empregados com esta finalidade. Nesse sentido, a tioacetamida (TAA), que originalmente foi utilizada como fungicida em lavouras e solvente orgânico em indústrias, é foco de estudos experimentais pois produz lesão hepática em animais (BRUCK et al., 2007; CHU et

al., 2001), e o seu uso está bem padronizado para ratos (INGAWALE et al., 2014; LIEDTKE et al., 2013).

Logo após a administração, a TAA é metabolizada por enzimas do sistema CYP450, por meio de duas reações de oxidação. Primeiramente, a TAA é convertida em TAA-S-óxido (TASO) e, posteriormente na segunda reação, ocorre a oxidação do TASO em TAA-S-dióxido (TASO₂). Sendo assim, conhecendo-se a alta reatividade de TASO₂, torna-se evidente o envolvimento do estresse oxidativo em lesões hepáticas induzida por TAA. De fato, o TASO₂ liga-se covalentemente às macromoléculas originando citotoxicidade, comprometimento da função celular e necrose do hepatócito (CHILAKAPATI et al., 2005; INGAWALE et al., 2014; LIU et al., 2013; LOW et al., 2004; THIRUMALAI et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial são características relevantes na progressão de lesões hepáticas (CARVALHO et al., 2017; YANG et al., 2004). O dano que as espécies reativas causam às células e a estreita relação destas com diversas patologias, evidenciam a importância da busca por novas moléculas que possuam a capacidade de minimizar ou até mesmo prevenir os danos oxidativos. Logo, compostos antioxidantes apresentam-se como alternativas terapêuticas para o tratamento de injúrias hepáticas (TSAI et al., 2010).

Nesse sentido, destacam-se os compostos de selênio (Se) que apresentam diversas propriedades farmacológicas, dentre elas a antioxidante (NOGUEIRA; ROCHA, 2011). De fato, estudos têm demonstrado o potencial protetor de compostos de selênio contra lesões hepáticas induzidas por diferentes agentes tóxicos (ACKER et al., 2012; BASARSLAN et al., 2013; DE FREITAS, et al., 2009; HECK et al., 2017; IBRAHIM et al., 2010; WASSER et al., 2001; WILHELM et al., 2010a, 2011). Dentre estes compostos, destaca-se o disseleneto de difenila que possui atividade hepatoprotetora contra o dano hepático induzido por 2-nitropropano, cádmio e paracetamol em ratos (BORGES et al., 2005, 2008, WILHELM et al., 2009; WILHELM et al., 2010a). Adicionalmente, o (E)-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol (BPD) (Figura 1), um composto orgânico de Se com atividades antioxidante e anticonvulsivante (WILHELM et al., 2010b), provou ser efetivo contra o dano hepático induzido por 2-nitropropano em ratos (WILHELM et al., 2011). No entanto, o efeito do BPD contra a hepatotoxicidade induzida por outros agentes químicos ainda é desconhecido.

De acordo com Nogueira e colaboradores (2009), a hepatotoxicidade causada pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) foi potencializada pela administração repetida de disseleneto de difenila em ratos. Diante disso, evidencia-se a necessidade de utilizar mais de um modelo experimental, tanto na busca por novas drogas quanto no estudo dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia das injúrias hepáticas.

Assim, tendo em vista o efeito antioxidante e os resultados anteriores demonstrados pelo BPD contra a toxicidade induzida por 2-nitropropano, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito protetor deste composto de Se contra hepatotoxicidade aguda e estresse oxidativo induzido por TAA em ratos.

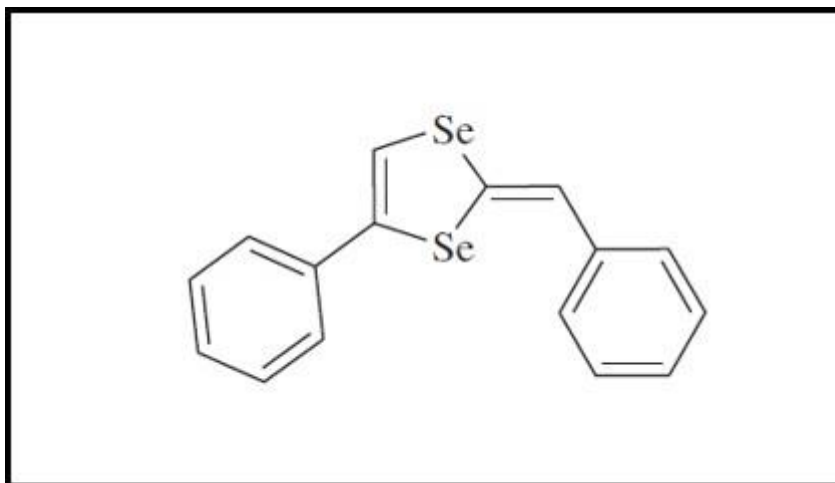


Figura 1. Estrutura química do (E)-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol (BPD).

2.Objetivos

Objetivo geral

Em virtude do grande número de funções vitais desempenhadas pelo fígado, a busca por terapias alternativas para a prevenção e combate de doenças hepáticas é constante. Tendo em vista as atividades biológicas já descritas para os compostos contendo selênio, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antioxidante e hepatoprotetora do BPD em um modelo de dano oxidativo induzido por TAA em ratos.

Objetivos específicos

Considerando os aspectos já relatados, os objetivos específicos deste trabalho envolveram:

- Avaliar o efeito hepatoprotetor do BPD através de marcadores bioquímicos de dano hepático agudo precoce.
- Determinar o efeito do BPD frente as alterações histopatológicas do fígado induzidas pela TAA.
- Investigar o efeito antioxidante do BPD sobre o dano oxidativo induzido por TAA.

3. Revisão Bibliográfica

Fígado

O fígado é o segundo maior órgão humano (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Pesa aproximadamente 1.500 g o que representa, em torno de 2,5 % do peso corporal de um adulto. Está localizado na porção superior direita da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, e apresenta quatro lobos (Figura 2).

Devido a sua localização, entre o sistema digestivo e o restante do organismo, o fígado recebe constantemente nutrientes e substâncias potencialmente tóxicas. O sangue arterial saturado com oxigênio chega ao fígado através da artéria hepática, enquanto que, por meio da veia porta, flui para o fígado, o sangue proveniente do intestino, baço e pâncreas. Logo após passar pelos sinusóides hepáticos, este sangue flui para as veias hepáticas e é novamente direcionado à circulação sistêmica por meio da veia cava (GUYTON; HALL, 1996).

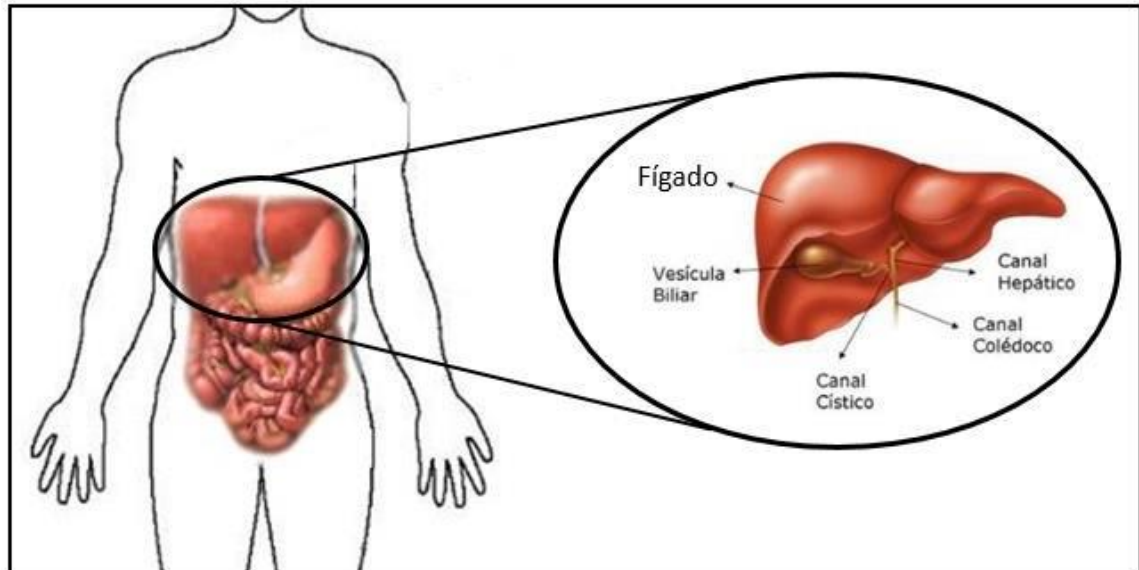


Figura 2. Localização do fígado no organismo humano.

Um grande número de funções vitais à saúde do organismo é desempenhado pelo fígado, sendo este o principal órgão metabólico. Este órgão destaca-se no controle de produção de energia, defesa imunológica e reserva volêmica (KALIL et

al., 2001). Desta forma, a compreensão da fisiologia hepática é de grande importância para a análise dos processos patológicos que o acometem.

Diante da grande complexidade do fígado, nenhum outro órgão pode compensar a sua extraordinária pluralidade funcional. Este órgão é composto por diferentes tipos celulares, destacando-se o hepatócito, responsável por regular o metabolismo, sintetizar proteínas e lipídeos, bem como produzir e excretar a bile (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010). Ainda, outros tipos de células que compõem o fígado são o colangiócito, responsável por modular o fluxo biliar (SIRICA et al., 2008), as células de Kupffer, macrófagos fixos nas membranas dos sinusóides, entre outras.

O fígado não apenas participa dos processos digestórios, como também, é responsável por desempenhar diversas funções metabólicas essenciais (GHAFFARI; GHASSAM; PRAKASH, 2012). Dentre estas, vale salientar, a eliminação de metabólitos provenientes da biotransformação de xenobióticos (SILVERTHORN, 2010), visto que, é um dos órgãos de preferência na recepção de substâncias ingeridas por via oral, como bebidas alcoólicas e fármacos (GU; MANAUTOU, 2012). O fígado é o principal órgão responsável pela detoxificação, além de, estar envolvido na manutenção da homeostase do organismo (CHATTERJEE; MITRA, 2015; INVERNIZZI, 2013; RASCHZOK et al., 2015).

A biotransformação de xenobióticos consiste na conversão de substâncias lipofílicas em substâncias polares, passíveis de excreção. A biotransformação é uma etapa crucial para a eliminação de compostos tóxicos. As reações envolvidas nesse processo podem ser agrupadas em duas fases distintas: Fase Pré-Sintética ou Fase I, onde ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise; e Fase Sintética, de Conjugação ou Fase II, onde ocorrem reações de conjugação.

Nesse sentido, a Fase I do metabolismo consiste em adicionar-se grupos polares, como por exemplo a hidroxila, às moléculas. Essas reações são catalisadas pelas enzimas do sistema CYP450, uma família de hemoproteínas ligadas à membrana, localizadas no retículo endoplasmático liso de hepatócitos. As enzimas do CYP450 utilizam a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+) como cofatores. No entanto, esse processo pode, além de, permitir a excreção de compostos, também, produzir compostos reativos nocivos. Caso isso ocorra, é imprescindível que essas moléculas sejam

metabolizadas pelas enzimas de Fase II, pois, devido a sua reatividade, podem causar danos às biomoléculas, tais como, o ácido desoxirribonucléico (DNA) e ao ácido ribonucléico (RNA) (LARSON, 2007).

As reações de Fase II, são reações de conjugação que envolvem a adição de grupos endógenos às moléculas reativas ou xenobióticos. Os grupos doados nas reações de conjugação incluem moléculas como o ácido glicurônico, a glutathione reduzida (GSH) ou sulfatos por meio das UDP-glicuronil transferases, da glutathione S-transferase (GST) e das sulfotransferases, respectivamente (LARSON, 2007). Ainda, cabe destacar que, as enzimas de Fase II do metabolismo protegem as células não somente contra compostos gerados na Fase I, como também, agem sobre as espécies reativas produzidas endogenamente.

Hepatotoxicidade

As desordens hepáticas são principalmente causadas pela exposição a substâncias químicas, xenobióticos, radiação, metais pesados, entre outros. Diante disso, vale salientar que diversos fatores de risco são associados a lesões no fígado, como o alcoolismo, idade, nutrição, gênero, polimorfismo genético das enzimas do sistema CYP450 e doenças hepáticas concomitantes (INGAWALE et al., 2014). De acordo com estudo realizado em alguns países europeus, entre os anos de 2005 e 2007 foram notificados um total de 600 casos de overdose associados à fármacos. Destes, um total de 114 casos foi de falência hepática aguda, os quais necessitaram de transplante do fígado devido à gravidade (GULMEZ et al., 2015).

Uma vez que diversas enzimas são produzidas no fígado e são distribuídas nas células hepáticas, a elevação dos níveis séricos destas enzimas são utilizadas como biomarcadores de dano hepático (Figura 3). O diagnóstico de dano hepático é realizado por meio de exames sorológicos específicos, dentre esses, a determinação dos níveis séricos das enzimas hepáticas, tais como, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), γ - glutamil-transferase (γ - GT) e lactato desidrogenase (LDH).

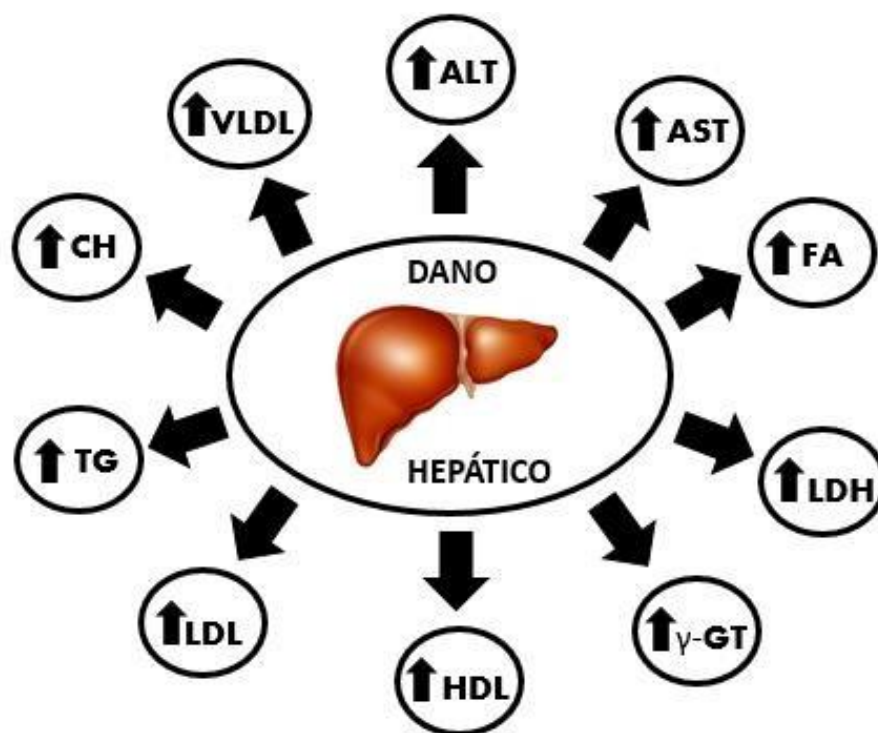


Figura 3. Indicadores bioquímicos de hepatotoxicidade (Adaptado a partir de Ingawale et al., 2013).

Além disso, dados sobre o perfil lipídico podem auxiliar no diagnóstico e desta forma são utilizados como marcadores (Figura 3). Os níveis de colesterol (CH), triglicerídeos (TG), lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ajudam a compreender o estado funcional do fígado e a detectar lesões hepáticas. A medida da totalidade de bilirrubina sérica e urinária e de ácido biliar também são parâmetros úteis para avaliar a capacidade do fígado (INGAWALE et al., 2014). Uma elevação nos índices das transaminases em conjunto com um aumento do nível de bilirrubina para mais do dobro, é considerada como um índice marcador de hepatite (REUBEN, 2004).

Os marcadores bioquímicos, anteriormente citados, podem delinear o tipo de dano, sua extensão e o prognóstico da doença hepática. Todavia, somente o uso de técnicas histopatológicas permitem a confirmação do dano e o diagnóstico final da lesão, auxiliando também na verificação da efetividade de terapias que protejam ou, até mesmo, revertam a desordem hepática (HENRY et al., 1999).

Modelos experimentais de hepatotoxicidade

Diversos modelos animais são utilizados para o estudo da hepatotoxicidade. Segundo Terblanche e Hickman (1991) alguns requisitos devem ser estabelecidos para que um modelo animal de dano hepático seja ideal. Entre estes, merece destaque, a reprodutibilidade, a reversibilidade, a morte causada por falência hepática, a oportunidade terapêutica, além do seguimento dos princípios éticos estabelecidos. Diante disso, o uso de modelos animais adequados é fundamental para a compreensão da patogênese das injúrias hepáticas. Além disso, estes modelos são indispensáveis para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos e para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação.

Ao se considerar modelos experimentais para avaliar o potencial hepatoprotetor *in vivo* de compostos bioativos, o ideal é selecionar modelos que não causem índices elevados de mortalidade dos animais. Diante disso, deve-se optar por utilizar a dose mínima capaz de provocar lesão possibilitando a reversão do dano causado e permitindo a avaliação do efeito hepatoprotetor (VIEIRA, 2014)

Neste contexto, um grande número de agentes químicos, drogas e toxinas podem ser utilizados com o objetivo de causar injúria hepática por diferentes mecanismos. Estes agentes podem prejudicar a homeostase estrutural e funcional do fígado, além de, produzirem metabólitos reativos, que reagem com proteínas hepáticas e levam a uma resposta imune específica. De fato, substâncias químicas, tais como, o CCl₄, 2-nitropropano e o álcool são utilizados em modelos de dano hepático bem estabelecidos (INGAWALE et al., 2014). De modo similar, fármacos são utilizados com igual finalidade, entre esses, o paracetamol, a cisplatina e a TAA (INGAWALE et al., 2014).

De fato, diversos fármacos estão relacionados às lesões hepáticas. Nos Estados Unidos (EUA) os antimicrobianos são responsáveis por mais de 46 % dos casos de lesão no fígado (CHALASANI et al., 2014), além disso, os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), as estatinas e os fitoterápicos, também tem seu uso associado ao desenvolvimento de hepatopatias (NAVARRO et al., 2014). Mecanismos multifatoriais estão correlacionados ao surgimento de injúrias hepáticas induzidas por drogas, entre esses, cabe destacar: as características químicas, a dose, a via de administração e a duração do tratamento.

Indutores de hepatotoxicidade mais utilizados

Tetracloroeto de carbono (CCl₄)

O CCl₄ (Figura 4) é um líquido volátil, não inflamável com odores distintos e imiscível em água. Consiste em um hidrocarboneto halogenado, utilizado em processos de síntese orgânica, na composição de desengordurante de metais, fluido de limpeza a seco, removedor de manchas de tecido, extintor de incêndio e pesticida (SINGH et al., 2012). Contudo, é um agente químico altamente tóxico e causa, principalmente, danos hepáticos e renais (BASU, 2003).

O CCl₄ é um dos indutores mais utilizados com a finalidade de causar lesões hepáticas em modelos animais (BRAUTBAR; WILLIAMS, 2002; INGAWALE et al., 2014; KEMELO et al., 2017; LU et al., 2017; SOKAR et al., 2017). A hepatotoxicidade decorrente do uso do CCl₄ é majoritariamente devido a ação dos seus metabólitos (NADA et al., 2010). Esses produtos são radicais instáveis que exibem forte afinidade às proteínas e lipídios presentes nas membranas celulares, além de, reagir com átomos de hidrogênio provenientes de lipídios insaturados, desencadeando peroxidação lipídica e, com isso, dano hepático (DEBNATH et al., 2013).

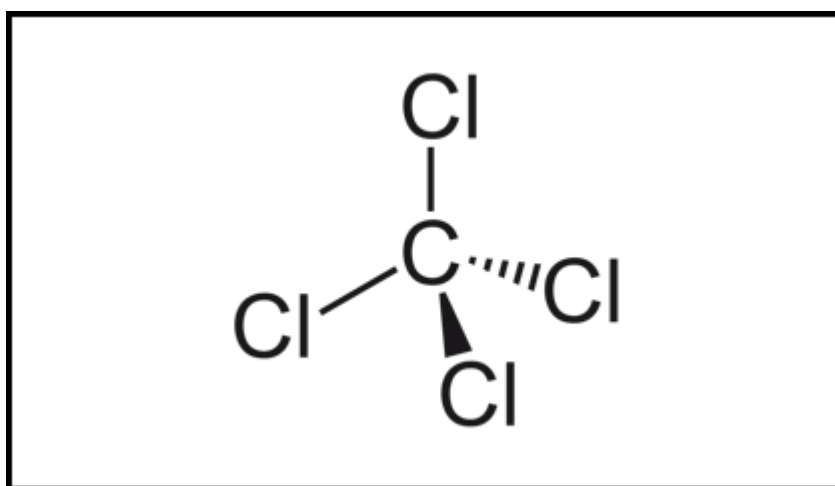


Figura 4. Estrutura do tetracloreto de carbono.

O estudo pioneiro caracterizando a hepatotoxicidade causada pelo CCl₄ foi descrito por Cameron e Karunaratne (1936). Desde então, muitos esforços estão

sendo direcionados na busca por uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo (DEBNATH et al., 2013; INGAWALE et al., 2014; NADA et al., 2010; WANG et al., 2005), de modo que, estabeleceu-se que a injúria hepática induzida pelo CCl₄ ocorre por meio de dois mecanismos. O primeiro se dá através da atividade do sistema CYP450, gerando espécies reativas, enquanto que, o segundo ocorre através da indução de resposta inflamatória das células de Kupffer, por meio da produção de fatores pró-inflamatórios (De MINICIS et al., 2013).

Nesse sentido, a hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄ tem sua gênese, mais especificamente, em uma reação de desalogenação redutiva catalisada por enzimas do sistema CYP450, sendo que o resultado desta biotransformação é a formação de um radical altamente reativo, o triclorometil (CCl₃•). Por sua vez o CCl₃• reage com o oxigênio produzindo um radical extremamente reativo, o triclorometil peróxido (CCl₃OO•) (Figura 5).

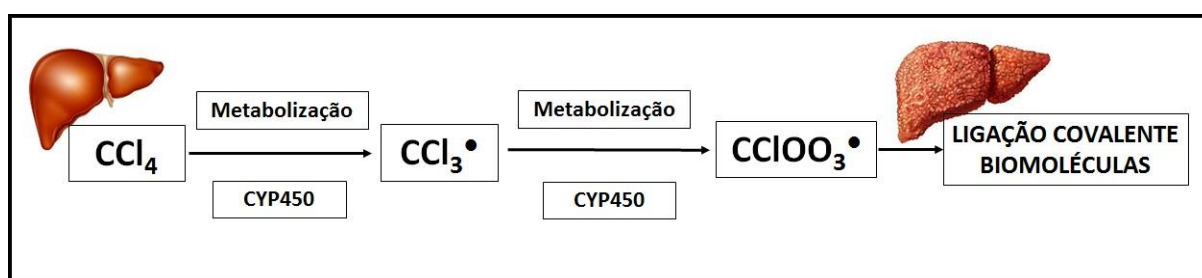


Figura 5. Ativação metabólica do tetracloreto de carbono.

Ambos radicais iniciam uma cadeia de reações que intervêm em biomoléculas, tais como, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos, aumentando a peroxidação lipídica e gerando desordem na fisiologia celular, esgotando o estoque de GSH com subsequente dano ou morte celular (LIMA et al., 2007; WEBER et al., 2003). Uma vez que a integridade da membrana celular é prejudicada pela peroxidação lipídica, as enzimas intracelulares, tais como as transaminases ALT e AST, são liberadas no plasma ocasionando a morte celular (KAUSHIK et al., 2013; LIU et al., 2013).

Adicionalmente, o CCl₄ provoca o bloqueio na síntese de lipoproteínas gerando acúmulo de gordura no fígado, visto que as lipoproteínas são moléculas responsáveis pelo transporte dos triglicerídeos para fora deste órgão. Devido a sua severa toxicidade, o uso do CCl₄ é restrito (WEBER et al., 2003). Entretanto, a

utilização deste composto em protocolos experimentais permite avaliar os mecanismos envolvidos na injúria hepática e suas consequências, tais como inflamação, esteatose, necrose, hepatite, fibrose, cirrose e carcinogênese (LIMA et al., 2007).

Paracetamol

O fármaco paracetamol (Figura 6), que possui ação analgésica e antipirética, é amplamente prescrito para o alívio de dores e redução da febre, devido a sua eficácia e segurança quando consumido em dose terapêutica, que corresponde a ingestão de 1-4 g/dia (KAPLOWITZ, 2001; RUMACK, 2004). Entretanto, altas doses de paracetamol geram *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina que conduz a lesões nos hepatócitos (SANZ-GARCIA et al., 2013). Sendo assim, uma overdose, decorrente da ingestão aguda ou cumulativa de doses entre 10-15 g deste fármaco, pode levar a uma injúria hepática grave ou fatal. Ainda, mesmo em dose terapêutica, o paracetamol pode levar a intoxicações em condições fisiológicas e ambientais específicas, tais como genética, alcoolismo, doença hepática pré-existente, entre outros (LARSON, 2007).

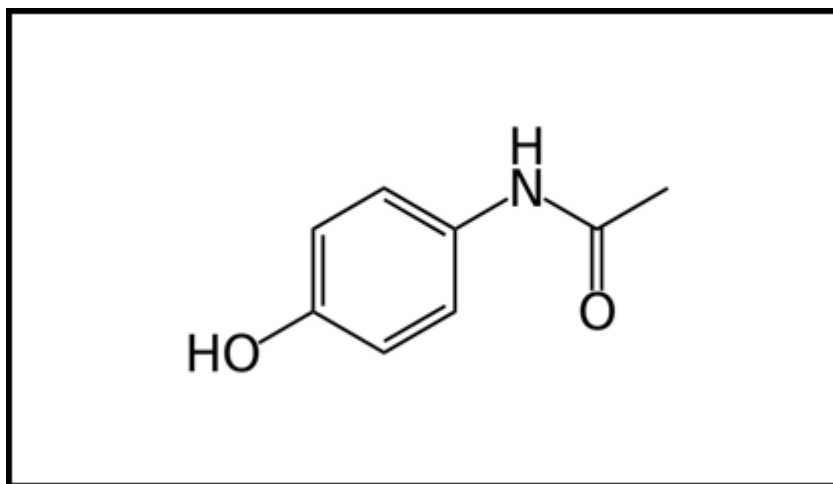


Figura 6. Estrutura do paracetamol.

A overdose de paracetamol também está associada a lesões hepáticas em roedores. Neste contexto, este modelo animal de hepatotoxicidade destaca-se como o de preferência para o estudo da patogênese da injúria hepática induzida por

drogas. O paracetamol é metabolizado pelo sistema CYP450 originando um metabólito reativo o *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina, o qual é responsável pelo início da lesão (NELSON, 1990) (Figura 7). Diante disso, após um episódio de overdose a quantidade de metabólitos reativos é suficiente para esgotar a GSH hepática disponível.

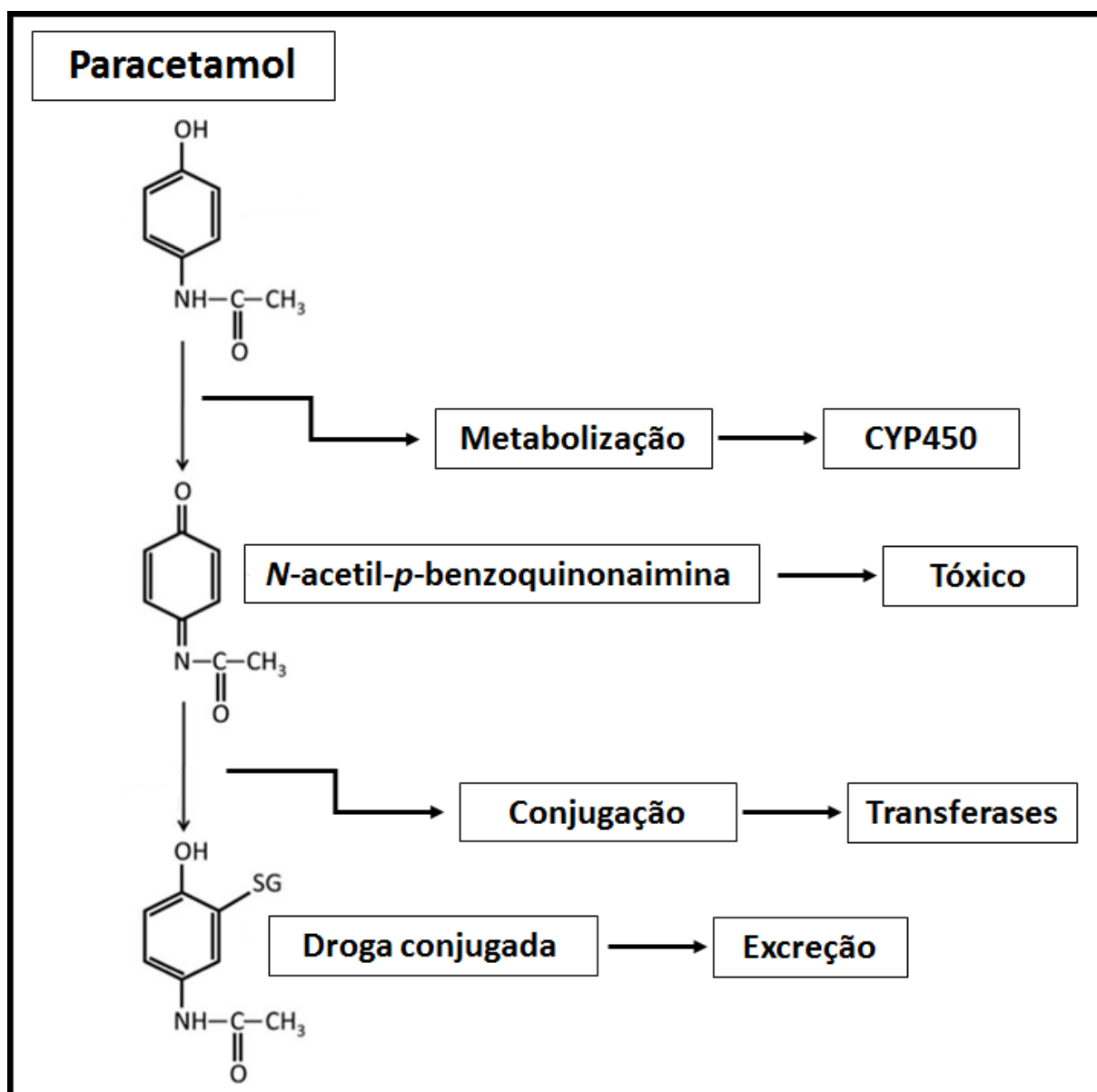


Figura 7. Ativação metabólica do paracetamol (Adaptado de Bandeira, 2017).

Por meio de técnicas histopatológicas, é possível observar em ordem cronológica os danos causados pelo paracetamol. Começando por perda de glicogênio e a vacuolização de hepatócitos, adicionalmente ocorrem modificações

nucleares e o surgimento de células picnóticas culminando em extensa necrose da região e morte celular (KAPLOWITZ, 2001). A patogênese da toxicidade hepática induzida por paracetamol, além de causar disfunção celular hepática e morte, envolve também a liberação de mediadores inflamatórios (INGAWALE et al., 2014; SUNDARIA et al., 2013).

Tioacetamida (TAA)

Evidente progresso na elucidação dos mecanismos envolvidos em injúrias hepáticas surgiram a partir de estudos moleculares, celulares e funcionais em modelos animais. De fato, as injúrias causadas por hepatotoxinas em modelos experimentais equiparam-se as injúrias causadas por diversas doenças hepáticas em humanos (BASKARANA et al., 2010). Diante disso, cabe salientar que a administração de TAA (Figura 8) em roedores é atual e frequentemente utilizada como modelo hepatotóxico, visto que produz danos ao fígado incluindo necrose, fibrose e cirrose (ALGANDABY et al., 2017; AL-ATTAR; AL-RETHERA, 2017; HAJOVSKY et al., 2012; INGAWALE et al., 2014; KAUR et al., 2017; LIEDTKE et al., 2013; PORTELA, 2014).

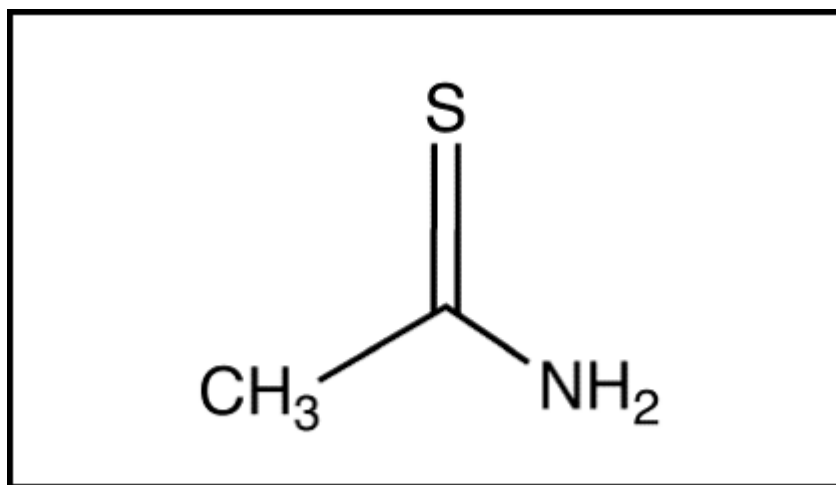


Figura 8. Estrutura da tioacetamida.

Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado uma similaridade significativa entre os padrões histológicos apresentados por modelos animais de cirrose e fibrose hepática com os padrões observados de cirrose, causada por hepatite viral, em humanos (AKHTAR; SHEIKH, 2013; KAWAI et al., 2012; LI et al.,

2002). Ao comparar modelos de cirrose hepática induzida com CCl_4 e TAA, evidencia-se uma fibrose mais acentuada e persistente na cirrose induzida por TAA (LIU et al., 2013). Ainda, a TAA altera o metabolismo lipídico e lipoprotéico, a síntese de ácidos graxos, o perfil de aminoácidos circulantes, bem como, o ciclo da ureia (DAVID et al., 2002; PORTELA, 2014).

Além disso, Lima e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de TAA por um período de quatorze semanas induziu lesões pré-neoplásicas, evidenciando o potencial carcinogênico deste composto. Nesse sentido, tem se destacado o envolvimento do estresse oxidativo como principal efeito carcinogênico da TAA, visto que esta causa danos sucessivos às biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos (De MINICIS et al., 2013). O dano causado pela TAA sobre o metabolismo de moléculas, como DNA e RNA, pode ser observado por meio de nucléolos aumentados e pela inibição no transporte de RNA do núcleo para o citoplasma (FONTANA et al., 1996; PORTELA, 2014).

É importante ressaltar que o efeito tóxico causado pela TAA é decorrente de ativação metabólica por meio de duas reações de oxidação realizadas por enzimas do sistema CYP450 (Figura 9). O metabólito TASO, é o produto da primeira reação de oxidação da TAA, enquanto que, na segunda oxidação o TASO é convertido no metabólito TASO_2 . Por sua vez, o TASO_2 , que é quimicamente reativo, liga-se covalentemente às macromoléculas originando citotoxicidade e levando a lesão celular com comprometimento da função celular e, por fim, necrose do hepatócito (CHILAKAPATI et al., 2005; INGAWALE et al., 2014; LIU et al., 2013; LOW et al., 2004; THIRUMALAI et al., 2011).

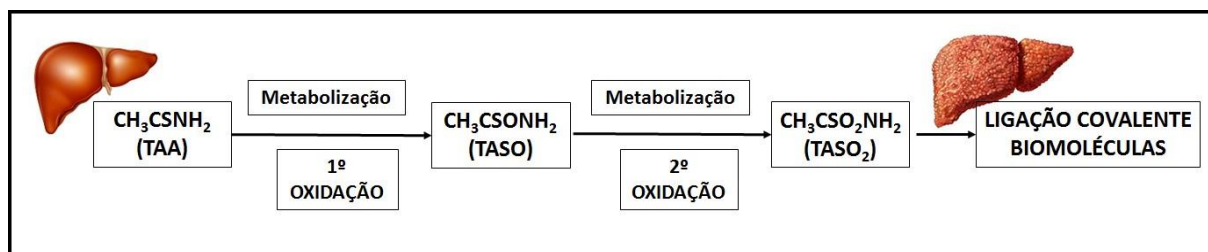


Figura 9. Ativação metabólica da tioacetamida (Adaptado de David, 2011).

Os metabólitos da TAA, TASO e TASO_2 , induzem necrose hepática uma vez que são espécies altamente reativas que se ligam às biomoléculas e modificam a

permeabilidade de membranas celulares. Deste modo, estes levam a um aumento na concentração citoplasmática de cálcio e no volume nuclear, um alargamento dos nucléolos, além de alterar a funcionalidade das mitocôndrias ocasionando a inibição da respiração celular, levando à morte da célula (AHMAD et al., 2002; PORTELA, 2014).

No entanto, as células hepáticas possuem a capacidade de converter o TASO em TAA, transformando a TAA em um inibidor da reação de oxidação do TASO em TASO₂. Diante do que foi exposto, torna-se evidente o motivo pelo qual a toxicidade ocasionada pela TAA é lenta, quando comparado a outros modelos de indução hepática (CHILAKAPATI et al, 2005; HAJOVSKY et al., 2012; SAWANT et al, 2006). Contudo, este intervalo de tempo adicional demonstra uma vantagem deste modelo, principalmente, nas investigações relacionadas aos mecanismos envolvidos na progressão da lesão após a administração do agente indutor até o seu metabolismo final. Isto permite um estudo da evolução temporal do avanço e do declínio da lesão hepática (CHILAKAPATI, 2007).

Hepatotoxicidade x Estresse oxidativo

Em 1985, Sies e colaboradores definiram o estresse oxidativo como um desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, sobrepondo-se os agentes oxidantes sobre as defesas antioxidantes. Essa definição serviu de base para o desenvolvimento de diversos estudos nesta área. Nesse sentido, estabeleceu-se que a atividade de diversas proteínas envolvidas na sinalização celular tem suas ações reguladas pelo balanço redox de seus resíduos tióis oxidáveis (BANDEIRA, 2017; RAY et al., 2012).

O estresse oxidativo está relacionado à atividade de espécies reativas, as quais são geradas fisiologicamente na mitocôndria durante o processo de respiração celular (CIRCU; AW, 2010; JAESCHKE et al., 2012; MELLO et al., 2016) e ainda podem ser formadas pelo sistema CYP450, visto que algumas drogas ao serem metabolizadas podem formar radicais instáveis, também, por neutrófilos e células de Kupffer. Diante disso, vale salientar que o excesso de espécies reativas é prejudicial às estruturas celulares, podendo causar danos às biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA.

Adicionalmente, o estresse oxidativo é um fator comum em grande parte das injúrias hepáticas, incluindo aquelas induzidas por radiação ionizante, toxinas, drogas e outros produtos químicos (CHEN et al., 2013) (Figura 10). Em condições fisiológicas adequadas, as espécies reativas produzidas pelo fígado, durante os processos metabólicos por exemplo, podem ser inativadas pelas defesas antioxidantes (VIDELA et al., 2004). Merece destaque, dentre essas, a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx), a GSH, bem como, as vitaminas A, C e E (MARÍ et al., 2010; SERVIDDIO et al., 2013).

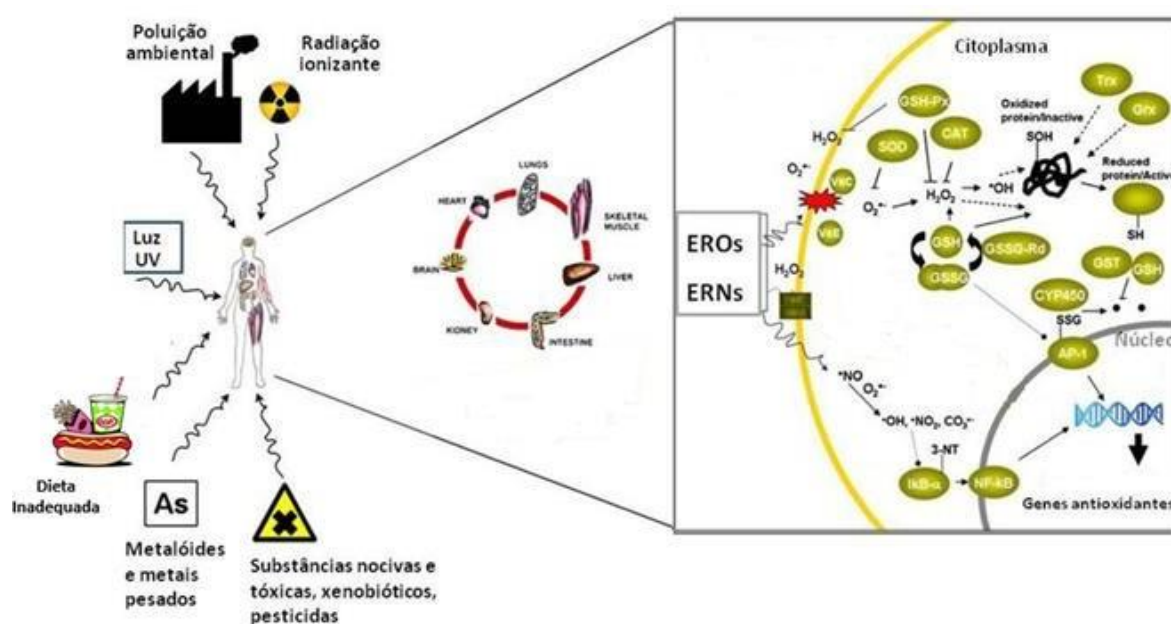


Figura 10. Alguns fatores associados ao dano oxidativo (Adaptado de David, 2011).

Segundo Lee e colaboradores (2001), o estresse oxidativo tem um papel fundamental no início e desenvolvimento das patologias hepáticas. Pode-se observar nos mais variados tipos de injúrias hepáticas um aumento na produção de espécies reativas e, associados a isso, uma queda nas defesas antioxidantes (MOHD HANAFIAH et al., 2013; POLI, 2000; TELL et al., 2013). Este quadro leva a danos no DNA culminando em apoptose, promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias e, eventualmente, inicia a mutação de células malignas (BHOGAL et al., 2010).

De modo similar, o estresse endoplasmático, resultante da expressão do gene da hepatite C, depleta o cálcio acumulado e aumenta a absorção deste pelas mitocôndrias, promovendo a geração de espécies reativas que induzem peroxidação

lipídica e dano celular (LAM et al., 2016; MIYANISHI et al., 2015). Neste contexto, cabe salientar que o processo de peroxidação lipídica está intimamente associado à hepatotoxicidade, visto que conduz à morte celular (SIES, 1985). Zheleva e colaboradores (2007) demonstraram uma hepatotoxicidade severa, devido ao processo peroxidativo. Hidrocarbonetos halogenados, cádmio, iodoacetamida e cloroacetamida, também causam hepatotoxicidade, principalmente, devido a indução de peroxidação lipídica.

Além disso, o malondialdeído (MDA), produto final da oxidação dos lipídios, promove a inflamação através da ativação de NF- κ B, o qual é responsável pela elevação do estímulo pró-colágeno e pró-fibrótico (LAM et al., 2016). Antioxidantes como o α -tocoferol podem bloquear a fibrogênese hepática (LEE et al., 2001). Os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelas espécies reativas, portanto, funcionam em vários tipos de processos degenerativos. Sendo assim, os antioxidantes são fundamentais na manutenção do status redox fisiológico (BANDEIRA, 2017).

Embora os compostos orgânicos de Se sejam reconhecidos por sua propriedade antioxidante, estes podem, também, causar toxicidade por oxidar grupos tióis endógenos tanto de aminoácidos quanto de proteínas. Diversos estudos tem demonstrado que a oxidação a grupos sulfrídricos mediada pelo Se pode produzir espécies reativas de oxigênio assim, sugere-se que o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos envolvidos na toxicidade causada por esses compostos (NOGUEIRA, et al., 2011). Meoti e colaboradores (2003) demonstraram que o disseleneto de difenila, um dos pioneiros dos compostos orgânicos de Se, quando administrado por via intraperitoneal obteve uma DL₅₀ de 65 mg/kg e 374 mg/kg para camundongos e ratos, respectivamente. A partir destes resultados os autores sugeriram que o disseleneto de difenila é mais tóxico para camundongos que para ratos.

Compostos contendo Se x Atividade hepatoprotetora

O Se é um elemento traço amplamente distribuído ao longo do corpo humano. De acordo com a OMS a ingestão diária recomendada de Se é de 16 mg, para mulheres, e 21 mg para homens (MLYNIEC et al., 2015). Este elemento é imprescindível para a síntese de selenocisteína, um aminoácido presente no sítio

ativo de selenoproteínas, tais como a GPx, tioredoxina redutase e selenoproteína P, conhecidas por proteger as células contra a peroxidação lipídica e dano oxidativo causado por espécies reativas (STEINBRENNER; SIES, 2013).

Neste contexto, evidencia-se que baixos níveis de selênio estão relacionados à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, entre essas, câncer, esclerose, doença cardiovascular, diabetes e cirrose (NAVARRO-ALARCÓN; LÓPEZ-MARTINEZ, 2000). De fato, os compostos contendo Se têm recebido a atenção dos pesquisadores por apresentarem síntese simples e atividades farmacológicas relevantes, visto que, alguns compostos possuem ação mimética à enzima GPx (BORTOLATTO et al., 2013; KUDVA et al., 2015; MULLER et al., 1984; NOGUEIRA; ROCHA, 2011; SARAIVA et al., 2016), ações antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória (PINZ et al., 2016; SILVA et al., 2017; WILHELM et al., 2014, 2017), ansiolítica e antidepressiva (REIS et al., 2017; SAVEGNAGO et al., 2008). Além disso, esta classe de compostos tem atraído o interesse devido a sua baixa toxicidade (SARI et al., 2014; WILHELM et al., 2009) e grande eficácia em vários modelos experimentais de injúria hepática (BORGES et al. 2005, 2008; DE FREITAS, et al., 2009; IBRAHIM et al., 2010; WILHELM et al., 2009, 2010a).

Inúmeros compostos de selênio têm exercido ações hepatoprotetoras efetivas em modelos experimentais, principalmente, devido à propriedade de mimetizar a ação dos grupos selenol/selenolato no balanço redox fisiológico (DE FREITAS, et al., 2009; IBRAHIM et al., 2010; WILHELM et al., 2010, 2011). De fato, compostos contendo Se protegeram contra lesões hepáticas induzidas por diferentes agentes tóxicos (COSTA et al., 2013; CARVALHO et al., 2017; FAN et al., 2012; MAHMOUD et al., 2012; SURHIO et al., 2017). No entanto, este efeito protetor depende do agente químico indutor de dano. Estudos têm demonstrado que, entre os compostos orgânicos de selênio, o disseleneto de difenila possui atividade hepatoprotetora contra o dano hepático induzido por 2-nitropropano, cádmio e paracetamol em ratos (BORGES et al., 2005, 2008, WILHELM et al., 2009). Por outro lado, a hepatotoxicidade causada pelo CCl₄ foi potencializada pela administração repetida de disseleneto de difenila em ratos (NOGUEIRA et al., 2009).

Segundo Costa e colaboradores (2013), o disseleneto de difenila, preveniu contra a peroxidação lipídica hepática, além de proteger contra a redução nos níveis de ácido ascórbico e tiol não protéico induzidos pela exposição ao paraquat. Ainda,

a inibição da atividade da GST, em ratos expostos ao paraquat, foi normalizada pelo pré-tratamento com o composto. Assim sendo, os autores demonstraram que o disseleneto de difenila foi eficaz em proteger contra as alterações hepáticas induzidas por paraquat em ratos. E, adicionalmente, evidenciaram que o efeito protetor pode ser devido as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do disseleneto de difenila.

Outros disselenetos também demonstraram ação protetora contra o dano hepático causado pela exposição ao glutamato monossódico (QUINES et al., 2007); 2-nitropropano (IBRAHIM et al., 2010); clorpirifós (ACKER et al., 2012); CCl₄ (FILHO et al., 2013). Além disso, diversos autores têm demonstrado o efeito hepatoprotetor do ebselen em diferentes modelos experimentais (BASARSLAN et al., 2013; TANAKA et al., 2002; WASSER et al., 2001).

Paralelamente aos compostos orgânicos, os compostos inorgânicos contendo Se também se mostram eficientes para o tratamento de lesões hepáticas (ABOUL-SOUD et al., 2011; AMIN et al., 2017; MESSARAH et al., 2012; NEWAIRY et al., 2007; OZKOL et al., 2017; PENG et al., 2016; SURHIO et al., 2017; ZOU et al., 2016;). Assim, este conjunto de estudos revela que os compostos contendo Se são promissores alternativas terapêuticas para o tratamento e/ou prevenção de lesões hepáticas. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nestas ações e a segurança toxicológica destes compostos.

E-2-benzilideno-4-fenil-1,3-disselenol (BPD)

Diversos compostos heterociclos demonstram atividades farmacológicas, além de, representarem fármacos amplamente consumidos, tais como a dipirona, o metronidazol e a ribavirina. Com base na importância crescente da área de síntese de compostos heterociclos, um grande número de reações vem sendo desenvolvidas, e a preparação de novos compostos tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisa (ALVES et al., 2008; BARLUENGA et al., 2003; BEGNINE et al., 2017; DUARTE et al., 2017; YUE et al., 2006). Dentre estas inúmeras classes de compostos heterociclos que vem sendo preparadas, os compostos contendo enxofre e Se surgem como uma importante alternativa, que estimula testes bioquímicos e farmacológicos.

Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo das propriedades farmacológicas desta classe de compostos (PINZ et al., 2016; SILVA et al., 2017; WILHELM et al., 2010b, 2014). Dentre estes, destaca-se o composto BPD que apresenta efeito antioxidante e anticonvulsivante. De acordo com Wilhelm e colaboradores (2010a), o BPD reduziu a produção de espécies reativas e a peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio e malonato e ainda, protegeu contra convulsões e morte induzida por pilocarpina em camundongos. Adicionalmente, o BPD aumentou a latência para os episódios convulsivos induzidos pelo pentilenotetrazol e 4-aminopiridina. De acordo com os resultados, sugere-se que o efeito anticonvulsivante apresentado pelo composto, pode ser atribuído em parte, à sua atividade antioxidante (WILHELM et al., 2010a).

Após verificar o efeito farmacológico do BPD como anticonvulsivante, mais estudos foram realizados para avaliar o seu potencial toxicológico, antioxidante e hepatoprotetor em ratos. Os resultados revelaram que o BPD exerce atividade antioxidante *in vitro* e não apresenta toxicidade (WILHELM et al., 2010b). Adicionalmente, o BPD reduziu o dano hepático causado pelo 2-nitropropano, sendo que protegeu contra o aumento dos níveis de lactato desidrogenase, fosfatase alcalina e das aminotransferases, AST e ALT. Além disso, este composto foi eficaz em proteger contra as alterações histológicas induzidas pela exposição a este agente químico (WILHELM et al., 2010b). Uma vez que o dano hepático induzido por 2-nitroproano envolve o estresse oxidativo, verificou-se um aumento da peroxidação lipídica e a inibição/ redução de defesas antioxidantes (GPx, glutathione redutase (GR), GST, GSH) no fígado dos animais expostos a este agente químico. Ainda, o BPD foi capaz de proteger contra estas alterações, demonstrando que o seu potencial antioxidante contribui para seu efeito hepatoprotetor.

Assim, com base nestas promissoras propriedades farmacológicas exercidas pelo BPD, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo deste composto sintético em outros modelos experimentais, a fim de elucidar outras atividades e os mecanismos envolvidos nestas ações.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os principais resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra assim organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo.

O artigo científico encontra-se publicado na revista *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.



Antioxidant compound (*E*)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole protects rats against thioacetamide-induced acute hepatotoxicity

Angélica S. Reis, Mikaela P. Pinz, Cristiani F. Bortolatto, Cristiano R. Jesse, Lucielli Savegnago, Silvana Roman, Cristiane Luchese, and Ethel A. Wilhelm

Abstract: The aim of this study was to investigate whether (*E*)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole (BPD) protects against hepatotoxicity induced by thioacetamide (TAA). On the first day of treatment, male adult Wistar rats received BPD (10 or 50 mg·kg⁻¹). On the second day, the rats received a single intraperitoneal injection of TAA (400 mg·kg⁻¹). Twenty-four hours after TAA administration, biochemical determinations and liver histological analysis were carried out. BPD (50 mg·kg⁻¹) reduced plasma aspartate and alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and lactate dehydrogenase activities increased by TAA exposure. Treatment with BPD was effective against increased lipid peroxidation levels and attenuated a decrease in hepatic reduced glutathione and ascorbic acid levels as well as an inhibition of glutathione peroxidase activity caused by TAA exposure. The higher dose of BPD protected against the inhibition of hepatic δ -aminolevulinic dehydratase activity induced by TAA. Finally, histopathological examination of the liver showed that BPD markedly ameliorated TAA-induced hepatic injury. In conclusion, BPD protected against hepatotoxicity and oxidative stress caused by TAA exposure in rats.

Key words: selenium, thioacetamide, oxidative stress, liver, antioxidant.

Résumé : Ces travaux avaient pour but d'étudier si le (*E*)-2-benzylidène-4-phényl-1,3-disélenole (BPD) assure une protection contre l'hépatotoxicité provoquée par le thioacétamide (TAA). Des rats Wistar mâles adultes ont reçu du BPD (10 ou 50 mg·kg⁻¹) le premier jour du traitement. Le deuxième jour, les rats ont reçu une injection intrapéritonéale unique de TAA (400 mg·kg⁻¹). Nous avons procédé à des analyses biochimiques et à l'examen histologique du foie 24 heures après l'administration de TAA. Le BPD (50 mg·kg⁻¹) permettait d'atténuer les augmentations de l'activité de l'aspartate et de l'alanine aminotransférase, de la phosphatase alcaline et de la déshydrogénase lactique causées par l'exposition au TAA. Le traitement par le BPD était efficace contre l'augmentation des taux de peroxydation lipidique et atténuait la diminution des taux de glutathion réduit et d'acide ascorbique ainsi que l'inhibition de l'activité de la glutathion peroxydase causées par l'exposition au TAA. La dose de BPD la plus élevée assurait une protection contre l'inhibition de l'activité de la déshydrogénase δ -aminolévulinique hépatique provoquée par le TAA. Enfin, l'examen histopathologique du foie montrait que le BPD permettait d'atténuer de façon marquée les lésions hépatiques provoquées par le TAA. En conclusion, le BPD assurait une protection contre l'hépatotoxicité et le stress oxydatif causés par l'exposition au TAA chez le rat. [Traduit par la Rédaction]

Mots-dés : sélénium, thioacétamide, stress oxydatif, foie, anti-oxydant.

Introduction

The liver plays a key role in the metabolism and excretion of xenobiotics. Nevertheless, it is susceptible to damage from a number of drugs and toxins (Lee 2003). Rodent models of toxin-induced hepatotoxicity are used to elucidate the biochemical processes involved in many forms of hepatic disease and to evaluate the therapeutic potential of hepatoprotective candidates.

Among various toxicity models, thioacetamide (TAA), a thiono-sulfur-containing compound, is frequently used to produce liver injury in animals (Chu et al. 2001; Bruck et al. 2007). Shortly after administration, TAA undergoes extensive metabolism to acetamide and TAA-S-oxide by the mixed function oxidase system. The monooxygenase system further metabolizes TAA-S-oxide to TAA-S-dioxide, which binds to cellular macromolecules and may be responsible

for producing damage (Hunter et al. 1977; Porter and Neal 1978). Studies have demonstrated the involvement of oxidative stress in TAA-induced hepatic injury (Bruck et al. 2004; Reddy et al. 2004). In fact, the induction of oxidative stress and mitochondrial dysfunction are relevant features in the progression of liver injuries (Aboutwerat et al. 2003; Loguercio and Federico 2003; Yang et al. 2004). Consequently, it has been suggested that antioxidant compounds are useful in countering hepatotoxicity in different experimental models (Bruck et al. 2004, 2007; Tsai et al. 2010).

Organoselenium compounds are cellular defenses against oxidative stress, because of their property of imitating the redox physiological chemistry of selenol and selenolate groups. These compounds have been proven to protect against hepatic injury induced by toxic agents (de Freitas et al. 2009; Ibrahim et al. 2010;

Received 4 March 2016. Accepted 30 March 2017.

A.S. Reis, M.P. Pinz, L. Savegnago, C. Luchese, and E.A. Wilhelm. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil.

C.F. Bortolatto. Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênicos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brasil.

C.R. Jesse. Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Itaqui, CEP 97650-000, RS, Brasil.

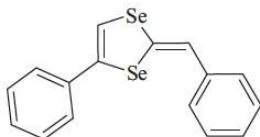
S. Roman. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Erechim, Fundação Regional Integrada, Ciências da Saúde, Erechim, CEP 99700-000, RS, Brasil.

Corresponding authors: Ethel Antunes Wilhelm (email: ethelwilhelm@yahoo.com.br) and Cristiane Luchese (email: cristiane_luchese@yahoo.com.br). Copyright remains with the author(s) or their institution(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from RightsLink.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 00: 1-7 (0000) dx.doi.org/10.1139/cjpp-2016-0118

Published at www.nrcresearchpress.com/cjpp on 13 July 2017.

Fig. 1. Chemical structure of (*E*)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole (BPD).



Wilhelm et al. 2010a, 2011). However, this protective effect depends on the chemical agent. In fact, among the organoselenium compounds, diphenyl diselenide has hepatoprotective activity against 2-nitropropane-, cadmium-, and acetaminophen-induced hepatic damage in rats (Borges et al. 2005, 2008; Wilhelm et al. 2009). Conversely, hepatotoxicity caused by carbon tetrachloride was potentiated by repeated administration of diphenyl diselenide in rats (Nogueira et al. 2009). In this sense, (*E*)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole (BPD), an organoselenium compound with antioxidant and anticonvulsant activities (Wilhelm et al. 2010b), has proved to be effective against liver damage induced by 2-nitropropane in rats (Wilhelm et al. 2011). However, the effect of BPD against hepatotoxicity induced by other chemical agents is not known.

In view of our interest in the pharmacology of organochalcogen compounds and the previous results obtained using BPD against 2-nitropropane toxicity, the present study aimed to investigate the protective effect of BPD against the acute hepatotoxicity and oxidative stress induced by TAA in rats.

Materials and methods

Animals

All experiments were conducted using male adult Wistar rats (200–250 g) from our own breeding colony. Rats were kept in a separate animal room at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12 h light : 12 h dark cycle, with lights on at 0700 and free access to food and water. Animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources. Experiments were performed in accordance with the guidelines laid down by the National Institutes of Health in the United States.

Drugs

TAA was purchased from Sigma Chemical Co, USA. BPD (Fig. 1) was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described (Schäfer et al. 2005). Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of BPD (99.9%) was determined by gas chromatography – mass spectroscopy. BPD and TAA were dissolved in canola oil and saline, respectively, as follows. For the BPD dose of $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, for every 0.05 g of BPD, 1 mL of canola was used, and it was administered at $1\text{ mL}\cdot(\text{kg body mass})^{-1}$. For TAA, for every 0.4 g of TAA, 1 mL of saline was used, and it was administered at $1\text{ mL}\cdot(\text{kg body mass})^{-1}$. All other chemicals were of analytical grade or obtained from standard commercial suppliers.

Treatment schedule

On the first day of treatment, the animals received BPD (10 or $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, intragastrically, i.g.) or canola oil ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.g.). On the second day, the rats received a single intraperitoneal (i.p.) injection of TAA ($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or saline ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.). Supportive therapy by subcutaneous administration of 5% dextrose ($25\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) and 0.9% NaCl with potassium ($20\text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$) was given every 12 h to avoid weight loss, hypoglycemia, and renal failure as described by Geller (1988).

To this end, animals were randomly divided into 6 groups of 5 animals each. The protocol of rat treatment was as follows: group I rats received canola oil and saline; group II and III rats

received BPD (10 and $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.g., respectively) and saline; group IV rats received canola oil and TAA; group V and VI rats received BPD (10 and $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.g., respectively) and TAA.

The doses of BPD and TAA were chosen based on previous studies (Pawa and Ali 2004; Wilhelm et al. 2011).

Biochemical determinations

Twenty-four hours after TAA administration, all rats were anesthetized (with ketamine and xylazine) for blood collection by heart puncture (hemolyzed plasma was discharged). After this procedure, rats were euthanized and livers were removed. Livers were homogenized in $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4; $1/10$, m/v) and centrifuged at 900g for 10 min to obtain the low-speed supernatant (S_1). S_1 was separated and used for biochemical assays, except when determining the levels of reduced glutathione (GSH), in which case samples of liver were homogenized in HClO_4 at a concentration of $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and centrifuged at $10\,000\text{g}$ for 10 min .

Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and lactate dehydrogenase activities (Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and lactate dehydrogenase (LDH) activities were used as the biochemical markers for early acute hepatic damage. Plasma enzymes AST, ALT, ALP, and LDH were determined spectrophotometrically according to Reitman and Frankel (1957) and Clarke and Payton (1983) using commercial kits (LABTEST, Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brazil). Enzymatic activities were expressed as units per litre.

Lipid peroxidation levels

An aliquot of S_1 ($200\text{ }\mu\text{L}$) was added to the reaction mixture containing $500\text{ }\mu\text{L}$ thiobarbituric acid (0.8%), $200\text{ }\mu\text{L}$ sodium dodecyl sulfate (SDS, 8.1%), and $500\text{ }\mu\text{L}$ acetic acid (pH 3.4) and was incubated for 2 h at 95°C . Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were determined as described by Ohkawa et al. (1979). Malondialdehyde (MDA), formed as an end product of the reaction, serves as an index of the intensity of lipid peroxidation. MDA reacts with thiobarbituric acid to generate a colored product that can be measured optically at 532 nm . Lipid peroxidation levels were expressed as nanomoles of MDA equivalents per gram of tissue.

Ascorbic acid levels

Ascorbic acid (AA), a nonenzymatic antioxidant defense, is involved in protection against the injurious effects of reactive species. Determination of AA levels was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001), with some modifications. Briefly, S_1 was precipitated in 10% trichloroacetic acid solution. An aliquot of S_1 following trichloroacetic acid precipitation ($300\text{ }\mu\text{L}$) at a final volume ($575\text{ }\mu\text{L}$) of the solution was incubated for 3 h at 37°C , and then $500\text{ }\mu\text{L}$ of H_2SO_4 ($65\% \text{ v/v}$) was added to the medium. The reaction product was determined using a color reagent containing dinitrophenyl hydrazine ($4.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and CuSO_4 ($0.075\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), absorbance measured at 520 nm . AA content is related to tissue amount ($\mu\text{mol AA}\cdot(\text{g tissue})^{-1}$).

Catalase activity

Catalase (CAT) is an enzymatic antioxidant defense involved in protecting against the injurious effects of reactive species. CAT activity was assayed spectrophotometrically using the method described by Aebi et al. (1995), which involves monitoring the disappearance of H_2O_2 in the presence of S_1 at 240 nm . An enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of $20\text{ }\mu\text{L}$ of S_1 and the substrate (H_2O_2) to a concentration of $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ in a medium containing $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.0). Enzymatic activity was expressed in units per milligram of protein (1 U decomposes $1\text{ }\mu\text{mol}$ of H_2O_2 per minute at pH 7 and 25°C).

Table 1. Effect of BPD on ALT, AST, LDH, and ALP activities of rats exposed to TAA.

Group	Enzyme activity (U·L ⁻¹)			
	ALT	AST	LDH	ALP
Control	25.66±3.05	107.66±12.50	253.33±61.17	215.11±25.00
BPD 10	24.12±4.58	88.53±4.93	255.33±48.58	220.66±34.42
BPD 50	21.33±3.05	79.66±16.65	264.33±64.60	211.66±24.58
TAA	164.40±17.67*	275.20±40.10*	658.20±154.93*	406.10±92.81*
BPD 10 + TAA	113.60±35.36*	219.40±46.50*	547.20±204.72*	255.20±72.87*
BPD 50 + TAA	93.60±24.28*. ^a	139.80±55.20*. ^a	356.00±77.62*. ^a	239.60±58.36*

Note: Data are reported as means ± SD. BPD 10, BPD dose of 10 mg·kg⁻¹; BPD 50, BPD dose of 50 mg·kg⁻¹; BPD, (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole; TAA, thioacetamide.

*P < 0.05 compared with the control group.

^aP < 0.05 compared with the TAA group.

^aP < 0.05 compared with the BPD 10 + TAA group (ANOVA and Tukey's multiple comparison test).

Reduced glutathione levels

Reduced glutathione (GSH) is an important nonenzymatic antioxidant defense. GSH levels were determined fluorometrically following Hissin and Hilf (1976) using o-phthalaldehyde as fluorophore. S₁ (100 µL) was incubated with 100 µL of o-phthalaldehyde (0.1% in methanol) and 1.8 mL of phosphate buffer (0.1 mol·L⁻¹, pH 8.0) for 15 min at room temperature in the dark. Fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at an excitation wavelength of 350 nm and at an emission wavelength of 420 nm. GSH levels were expressed as nanomoles per gram of tissue.

Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase (GPx) protects against the injurious effects of H₂O₂ and is an important enzyme in maintaining the intracellular concentration of GSH. GPx activity in S₁ of liver was assayed spectrophotometrically using the method described by Wendel (1981), through the GSH-NADPH – glutathione reductase (GR) system, by measuring the dismutation of H₂O₂ at 340 nm. In this assay, the enzyme activity is measured indirectly by means of NADPH decay. H₂O₂ is decomposed, generating oxidized glutathione from reduced GSH. Oxidized glutathione is regenerated back to GSH by the GR present in the assay media, at the expense of NADPH. Enzymatic activity was expressed in nanomoles of NADPH per minute per milligram of protein.

Glutathione reductase activity

GR plays a role in maintaining adequate amounts of GSH. GR activity in S₁ was determined spectrophotometrically as described by Carlberg and Mannervik (1985). In this assay, oxidized glutathione is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which is followed by measuring absorbance at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. Enzymatic activity was expressed as nanomoles of NADPH per minute per milligram of protein.

Glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase (GST) plays a physiological role in initiating the detoxification of potential toxic agents and has antioxidant action. GST activity was assayed through the conjugation of GSH with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm as described by Habig et al. (1974). An aliquot of 100 µL of S₁ was added to potassium phosphate buffer (0.1 mol·L⁻¹; pH 7.4), with CDNB as substrate and GSH at 50 mmol·L⁻¹. Enzymatic activity was expressed in nanomoles of CDNB conjugated per minute per milligram of protein.

δ-Aminolevulinic dehydratase activity

δ-Aminolevulinic dehydratase (δ-ALA-D), a sulfhydryl- and Zn²⁺-containing enzyme, is highly sensitive to prooxidants and heavy metals. δ-ALA-D activity was assayed according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of formation of the product, porphobilinogen, except that sodium phosphate buffer (100 mmol·L⁻¹; pH 6.8) and δ-ALA (2.4 mmol·L⁻¹) were used. An aliquot of S₁ (200 µL)

was incubated for 3 h at 37 °C. The reaction product was determined using modified Erlich's reagent at 555 nm. Enzymatic activity was expressed as nanomoles of porphobilinogen per milligram of protein per hour.

Histological analyses

Liver samples were removed and subjected to histopathological analyses. Small pieces of liver tissues from individual rats were fixed in 10% formalin. For light microscopy examination, tissues were embedded in paraffin, sectioned at 4 µm, and stained with hematoxylin and eosin. Three animals per group were used to carry out a histological examination. The parameters were graded with a score of 0–3, with 0 indicating absence of injury, 1 indicating low injury, 2 indicating moderate injury, and 3 indicating intense liver injury.

Protein quantification

Protein concentration was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (1 mg·mL⁻¹) as the standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by GraphPad Prism 5 using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test when appropriate. Data from the experiments were expressed as means ± SD. Results with P < 0.05 were considered statistically significant.

Results

ALT, AST, ALP, and LDH activities

The effects of BPD on ALT, AST, LDH, and ALP activities of rats exposed to TAA are shown in Table 1. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test revealed that TAA increased plasma ALT activity 6.4-fold, and BPD, at a dose of 50 mg·kg⁻¹, partially attenuated this increase (ANOVA: $F_{[5,24]} = 23.49$, $P < 0.0001$) (Table 1).

Statistical analysis showed that TAA increased plasma AST activity (2.5-fold). BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹ but not 10 mg·kg⁻¹ was effective against the increase in AST activity in rats exposed to TAA (ANOVA: $F_{[5,24]} = 26.53$, $P < 0.0001$) (Table 1).

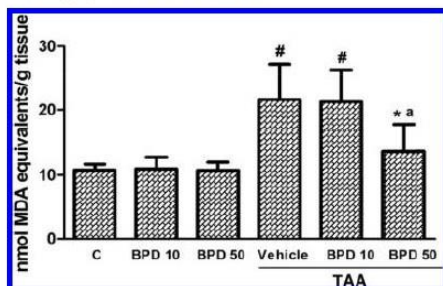
The one-way ANOVA of ALP activity data demonstrated that TAA increased ALP activity (1.9 times) in rat plasma, and BPD at both doses protected against this increase (ANOVA: $F_{[5,24]} = 8.95$, $P < 0.0001$) (Table 1).

The one-way ANOVA of LDH activity showed that TAA increased LDH activity 2.6-fold when compared with the control group. BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹ but not 10 mg·kg⁻¹ protected against the increase in LDH activity resulting from TAA exposure (ANOVA: $F_{[5,24]} = 29.22$, $P < 0.0001$) (Table 1).

Lipid peroxidation levels

One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test revealed that TAA increased lipid peroxidation levels in the livers of rats when compared with the control group. BPD protected against the in-

Fig. 2. Effect of BPD on hepatic lipid peroxidation levels of rats exposed to TAA. Data are reported as means $\pm$ standard deviation of 5 animals per group. #, $P < 0.05$ compared with the control group; *, $P < 0.05$ compared with the TAA group (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test). BPD, (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole; C, control; BPD 10, BPD at a dose of 10 mg·kg⁻¹; BPD 50, BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹; TAA, thioacetamide.



crease in lipid peroxidation levels caused by TAA exposure at the higher BPD dose only (ANOVA: $F_{[5,24]} = 10.67$, $P < 0.0001$) (Fig. 2).

AA levels

Statistical analysis demonstrated that TAA reduced AA levels, and only the higher dose of BPD protected against this effect (ANOVA: $F_{[5,24]} = 9.34$, $P < 0.0001$) (Fig. 3A).

CAT activity

No alteration was found in hepatic CAT activity independent of the experimental group (ANOVA: $F_{[5,24]} = 1.14$, $P > 0.05$) (Fig. 3B).

GSH levels

One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test indicated that TAA exposure reduced GSH levels in the livers of rats. The higher dose of BPD restored GSH content to control levels. At a dose of 10 mg·kg⁻¹, BPD treatment partially protected against the reduction of GSH levels induced by TAA (ANOVA: $F_{[5,24]} = 22.74$, $P < 0.0001$) (Fig. 4A).

GPx activity

TAA inhibited GPx activity, and BPD did not protect against this inhibition (ANOVA: $F_{[5,24]} = 8.486$, $P < 0.0001$) (Fig. 4B).

GR activity

TAA exposure inhibited hepatic GR activity, but neither a BPD dose of 10 nor 50 mg·kg⁻¹ protected against TAA inhibition (ANOVA: $F_{[5,24]} = 7.455$, $P < 0.001$) (Fig. 4C).

GST activity

GST activity was not altered in all experimental groups (ANOVA: $F_{[5,24]} = 0.1542$, $P > 0.05$) (data not shown).

δ -ALA-D activity

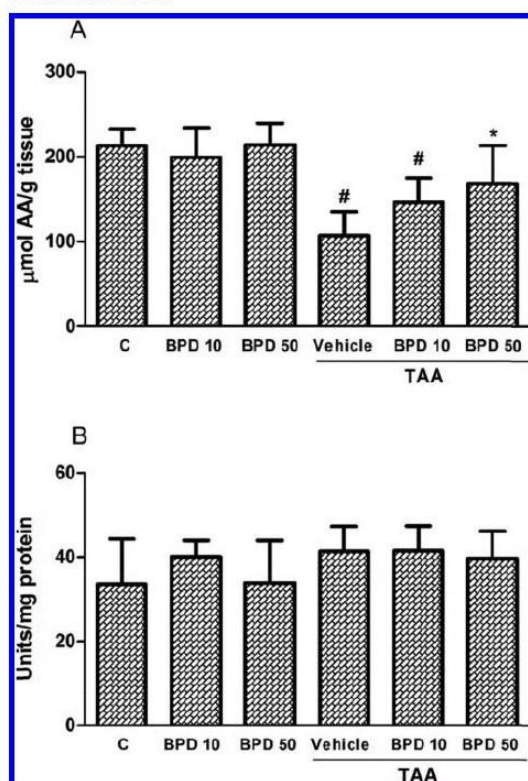
One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test showed that TAA inhibited δ -ALA-D activity and BPD at the higher dose only protected against this inhibition (ANOVA: $F_{[5,24]} = 17.34$, $P < 0.0001$) (Fig. 5).

Histological analysis

The severity of the liver morphological alterations caused by TAA exposure is shown in Fig. 6B and Table 2. Samples of liver tissue from rats exposed to TAA showed extensive injuries characterized by cellular infiltration (Fig. 6B, Table 2).

Samples of liver from rats treated with BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹ and exposed to TAA presented normal histological architecture, without morphological alterations (Fig. 6E). The ab-

Fig. 3. Effect of BPD on hepatic AA levels (A) and CAT activity (B) of rats exposed to TAA. Data are reported as means $\pm$ standard deviation of 5 animals per group. #, $P < 0.05$ compared with the control group; *, $P < 0.05$ compared with the TAA group (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test). AA, ascorbic acid; BPD, (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole; C, control; BPD 10, BPD at a dose of 10 mg·kg⁻¹; BPD 50, BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹; CAT, catalase; TAA, thioacetamide.



sence of cellular infiltration and vacuolization was observed in groups treated with BPD (50 mg·kg⁻¹) (Fig. 6E). Livers treated with BPD at a dose of 10 mg·kg⁻¹ showed the presence of cellular infiltration and vacuolization (Fig. 6D). Samples of liver from animals of the control group (Fig. 6A) or treated with BPD (50 mg·kg⁻¹) (Fig. 6C) showed normal histological architecture.

Discussion

The present study revealed the protective action of BPD, an organoselenium compound, against acute hepatotoxicity induced by TAA in rats. The administration of TAA induced hepatic injury, as demonstrated by histological alterations and an increase in plasma transaminases AST and ALT, as well as LDH and ALP activities. Moreover, lipid peroxidation levels increased, while antioxidant status was reduced, in the livers of rats exposed to TAA, suggesting that the cytotoxic effect was imposed by an oxidative insult. Biochemical and histological results found in this study demonstrated that BPD relieved TAA-induced hepatotoxicity.

An obvious sign of hepatic injury is the leakage of cellular enzyme into plasma (Schmidt and Schmidt 1967; Schmidt et al. 1975).

Fig. 4. Effect of BPD on hepatic GSH levels (A), GPx activity (B), and GR activity (C) of rats exposed to TAA. Data are reported as means $\pm$ standard deviation of 5 animals per group. #, $P < 0.05$ compared with the control group; *, $P < 0.05$ compared with the TAA (thioacetamide) group (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test). BPD, (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole; C, control; BPD 10, BPD at a dose of 10 mg·kg⁻¹; BPD 50, BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹; GSH, reduced glutathione; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; TAA, thioacetamide.

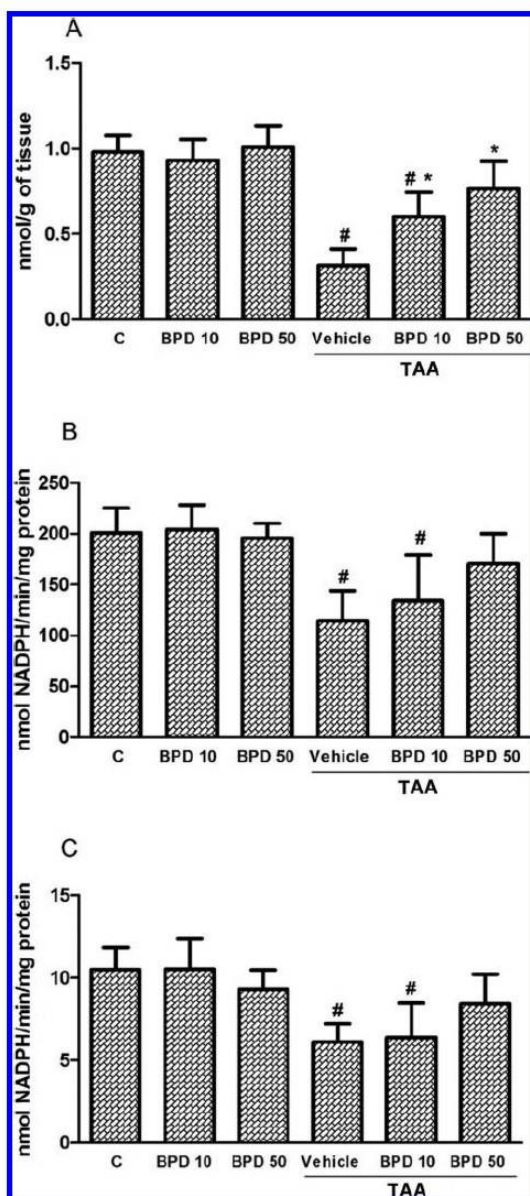
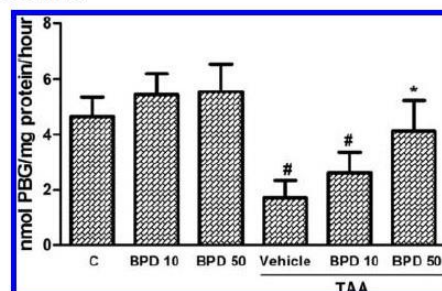


Fig. 5. Effect of BPD on hepatic δ -ALA-D activity of rats exposed to TAA. Data are reported as means $\pm$ standard deviation of 5 animals per group. #, $P < 0.05$ compared with the control group; *, $P < 0.05$ compared with the TAA group (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test). δ -ALA-D, δ -aminolevulinic dehydratase; BPD, (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole; C, control; BPD 10, BPD at a dose of 10 mg·kg⁻¹; BPD 50, BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹; TAA, thioacetamide.



When the hepatic cell membrane is damaged, a variety of enzymes normally located in the cytosol and organelles are released into the blood. Their estimation in the plasma is a useful quantitative marker for the extent and type of hepatocellular damage (Ansari et al. 1991). The present study revealed a significant increase in the activities of AST, ALT, LDH, and ALP in the plasma of rats exposed to TAA, indicating hepatocellular injury. The administration of BPD to rats preserved the structural integrity of the hepatocellular membrane, as demonstrated by the protection provided when compared with the enzyme activities in the hepatotoxin-treated rats. In a histopathological assessment, it was found that BPD treatment led to a decrease in hepatocellular injury. These results suggest that BPD was effective in protecting hepatocytes by accelerating the regeneration of parenchymal cells, thus protecting against membrane fragility and decreasing leakage of the marker enzymes into the circulation.

Reactive species are capable of binding to proteins or lipids, or abstracting a hydrogen atom from an unsaturated lipid, initiating lipid peroxidation and liver damage while playing a significant role in the pathogenesis of diseases (Brattin et al. 1985). In the present study, the high efficiency of TAA in producing a state of oxidative stress in rat livers was demonstrated by an increase in lipid peroxidation levels as well as a decrease in AA and GSH levels and GPx and GR activities.

GSH is a cellular tripeptide that plays a vital role in maintaining the oxidant-antioxidant balance in the tissue that is essential for normal cellular function. The tripeptide counteracts the damaging effect of the peroxides and hydroperoxides produced as a result of the oxidative stress. Severe depletion of GSH, which is considered the consequence or cause of oxidative stress, affects the activity of enzymes involved in its recycling such as GR and GPx. BPD could restore depleted levels of GSH, with a concomitant decrease in lipid peroxidation levels and restoration of GPx activity. BPD probably acted by restraining the production of reactive species, possibly owing to its antioxidant action. Once excessive reactive species production is inhibited, GSH starts accumulating in the cell or tissue to restore the normal tissue concentration. This is evident in rats treated with BPD followed by the induction of hepatic injury. Accordingly, antioxidants have been suggested as therapeutic modalities of liver injury in experimental models (Bruck et al. 2004, 2007; Tsai et al. 2010; Wilhelm et al. 2010a).

AA and CAT are important antioxidant defenses. AA exerts its biological effects primarily by acting as an enzyme cofactor and an antioxidant (Traber and Stevens 2011). In the present study, a depletion of hepatic AA levels was observed in rats exposed to

Fig. 6. Photomicrography of the hepatic lobe segment of (A) a control animal showing a normal aspect; (B) an animal exposed to TAA showing increased cell infiltration in the sinusoid capillaries and surroundings of the centrilobular veins and tissue disorganization; (C) an animal treated with BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹ showing normal tissue appearance with the presence of normal hepatocyte strings and sinusoid capillaries; (D) an animal treated with BPD at a dose of 10 mg·kg⁻¹ and exposed to TAA showing the presence of cellular infiltration and vacuolization; and (E) an animal treated with BPD at a dose of 50 mg·kg⁻¹ and exposed to TAA showing normal histological architecture, without morphological alterations. Note the absence of cellular infiltration and vacuolization. Hematoxylin and eosin staining; magnification 100×. cv, centrilobular vein; arrow, hepatocyte strings, *, cell infiltration. BPD, (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole; TAA, thioacetamide. [Colour online.]

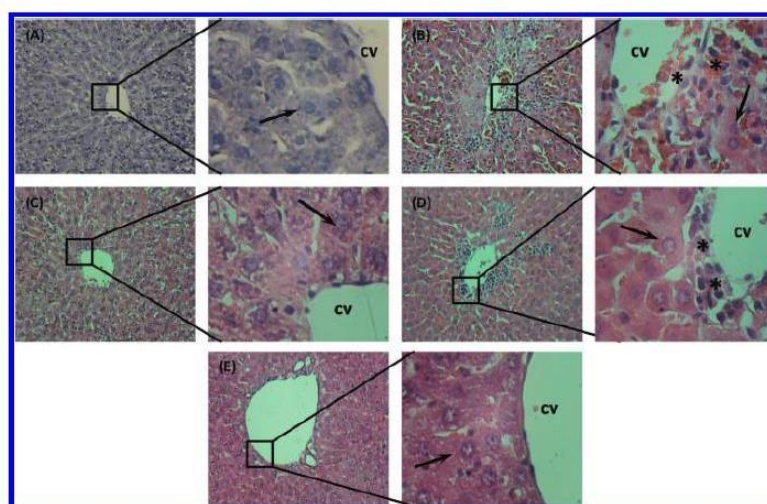


Table 2. Effect of treatment with BPD on histopathological scores in hepatic injury induced by TAA exposure in rats.

	Control	TAA	BPD 10	BPD 50	BPD 10 + TAA	BPD 50 + TAA
Vacuolization						
0	3	0	3	2	0	2
1	0	0	0	1	0	1
2	0	2	0	0	1	0
3	0	1	0	0	2	0
Cell infiltration						
0	3	0	2	1	0	3
1	0	0	1	2	1	0
2	0	0	0	0	2	0
3	0	3	0	0	0	0

Note: Grade designation of the histological findings: 0, injury absent; 1, low injury; 2, moderate injury; 3, intense injury. Each value represents the number of animals that showed grading changes. Each group consists of 3 animals. BPD, (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole; BPD 10, BPD dose of 10 mg·kg⁻¹; BPD 50, BPD dose of 50 mg·kg⁻¹; TAA, thioacetamide.

TAA, confirming the involvement of oxidative stress in this hepatic injury. BPD was effective against the decrease in AA levels resulting from TAA exposure owing to its antioxidant action. CAT is responsible for conversion of H₂O₂ to H₂O. In this experimental protocol, CAT did not seem to have been involved in the oxidative damage induced by TAA, since no change in its activity was found in animals exposed to this hepatotoxin, the reason being that GPx has a Km for H₂O₂ lower than that of CAT.

Our results revealed that δ-ALA-D is sensitive to the hepatotoxicity caused by TAA, given that δ-ALA-D activity was inhibited in rats exposed to this hepatotoxin. Since δ-ALA-D activity is susceptible to a variety of treatments associated with oxidative stress (Nogueira and Rocha 2010), the beneficial effect of BPD on this enzyme reinforced its protective effect against oxidative damage. In fact, the TAA-induced inhibitory effect on hepatic δ-ALA-D ac-

tivity could be due to oxidative insult or, alternatively, the reactive metabolite of TAA (TAA-S-dioxide) could also react directly with essential -SH groups of δ-ALA-D, inactivating the enzyme and causing oxidative stress. In accordance with the results demonstrated here, BPD protected against the inhibition of hepatic δ-ALA-D activity caused by another hepatotoxin (Wilhelm et al. 2011). The recognition of selenium as a nutritionally important trace element came with the discovery of its ability to prevent liver pathology (Schwarz and Fredga 1969). Therefore, selenorganic compounds have been extensively studied for their role in protecting against liver damage and the various clinical conditions in which hydroperoxides play a role (Wilhelm et al. 2010a, 2011; Nogueira and Rocha 2011).

The pharmacokinetic profile of BPD is not yet known. Indeed, it is important to elucidate the half-life of BPD and determine whether it is metabolized after 1 day. Based on our results, we cannot affirm whether this effect is exerted by BPD or its metabolite. However, our results clearly demonstrate the hepatoprotective effect of BPD treatment. In view of our continued interest in the pharmacology of this compound, further studies are required to elucidate the pharmacokinetic profile of BPD, and the development of future studies evaluating the effect of BPD using different treatment protocol is worthwhile.

In conclusion, BPD protected against the hepatotoxicity and oxidative stress caused by TAA exposure in rats. The antioxidant property of BPD is likely involved in its hepatoprotective effect.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this work.

Acknowledgements

Financial support provided by UFSM, UFPEL, FAPERGS (PG-001/2013; PRONUPEQ 16/2551-0000526-5) is gratefully acknowledged.

References

- ▶ Aboutwerat, A., Pemberton, P.W., Smith, A., Burrows, P.C., McMahon, R.F., Jain, S.K., and Warnes, T.W. 2003. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 1637: 142–150. doi:10.1016/S0925-4439(02)00225-9. PMID:12633902.
- Aebi, U., Chiu, W., and Milligan, R. 1995. Role of catalase on antioxidative defenses. *J. Struct. Biol.* 2: 117–118.
- ▶ Ansari, R.A., Tripathi, S.C., Patnaik, G.K., and Dhawan, B.N. 1991. Antihepatotoxic properties of picroliv: an active fraction from rhizomes of *Picrorhiza kurroa*. *J. Ethnopharmacol.* 34: 61–68. doi:10.1016/0378-8741(91)90189-K. PMID:1753788.
- ▶ Borges, L.P., Borges, V.C., Moro, A.V., Nogueira, C.W., Rocha, J.B., and Zeni, G. 2005. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology*, 210: 1–8. doi:10.1016/j.tox.2005.01.002. PMID:15804453.
- ▶ Borges, L.P., Brandão, R., Godoi, B., Nogueira, C.W., and Zeni, G. 2008. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chem.-Biol. Interact.* 171: 15–25. doi:10.1016/j.cbi.2007.09.005. PMID:17950719.
- ▶ Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3. PMID:942051.
- ▶ Brattin, W.J., Glende, E.A., Jr., and Recknagel, R.O. 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J. Free Radicals Biol. Med.* 1: 27–38. doi:10.1016/0748-5514(85)90026-1.
- ▶ Bruck, R., Aeed, H., Avni, Y., Shirin, H., Matas, Z., Shahmurov, M., et al. 2004. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J. Hepatol.* 40: 86–93. doi:10.1016/S0168-8278(03)00504-X. PMID:14672618.
- ▶ Bruck, R., Ashkenazi, M., Weiss, S., Goldiner, I., Shapiro, H., Aeed, H., et al. 2007. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. *Liver Int.* 27: 373–383. doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01453.x. PMID:17355460.
- ▶ Carlberg, I., and Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113: 484–490. doi:10.1016/S0076-6879(85)13062-4. PMID:3003504.
- ▶ Chu, C.J., Wang, S.S., Lee, F.Y., Chang, F.Y., Lin, H.C., Hou, M.C., et al. 2001. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Eur. J. Clin. Invest.* 31: 156–163. doi:10.1046/j.1365-2362.2001.00775.x. PMID:11168455.
- ▶ Clarke, P.M., and Payton, M.A. 1983. An enzymatic assay for acetate in spent bacterial culture supernatants. *Anal. Biochem.* 130: 402–405. doi:10.1016/0003-2697(83)90607-3. PMID:6346947.
- ▶ de Freitas, A.S., Funck, V.R., Rotta, M.S., Bohrer, D., Mörschbacher, V., Puntel, R.L., et al. 2009. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res. Bull.* 79: 77–84. doi:10.1016/j.brainresbull.2008.11.001. PMID:19047014.
- Geller, D. 1988. An improved rat model of hepatic encephalopathy due to fulminant hepatic failure: the role of supportive therapy. In *Advances in ammonia metabolism and hepatic encephalopathy: Proceedings of the 6th International Symposium on Ammonia*, Vaalsbroek Castle, Netherlands, 27–29 April 1987. Edited by P.B. Soeters, J.H.P. Wilson, A.J. Meijer, and E. Holm. Elsevier, Amsterdam. pp. 213–217.
- ▶ Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130–7139. PMID:4436300.
- ▶ Hissin, P.J., and Hilf, R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2. PMID:962076.
- ▶ Hunter, A.L., Holscher, M.A., and Neal, R.A. 1977. Thioacetamide induced hepatic necrosis. Involvement of the mixed function oxidase enzyme system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200: 439–448. PMID:839448.
- ▶ Ibrahim, M., Prigol, M., Hassan, W., Nogueira, C.W., and Rocha, J.B. 2010. Protective effect of binaphthyl diselenide, a synthetic organoselenium compound, on 2-nitropropane-induced hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem. Funct.* 28: 258–265. doi:10.1002/cbf.1645. PMID:20517888.
- ▶ Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, É.M.M., and Rocha, J.B.T. 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88: 119–125. doi:10.1034/j.1600-0773.2001.0192.x. PMID:11245406.
- ▶ Lee, W.M. 2003. Drug-induced hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* 349: 474–485. doi:10.1056/NEJMra021844. PMID:12890847.
- ▶ Loguercio, C., and Federico, A. 2003. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biol. Med.* 34: 1–10. doi:10.1016/S0891-5849(02)01167-X.
- ▶ Nogueira, C.W., and Rocha, J.B.T. 2010. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. *J. Braz. Chem. Soc.* 21: 2055–2071. doi:10.1590/S0103-50532010001100006.
- ▶ Nogueira, C.W., and Rocha, J.B.T. 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85: 1313–1359. doi:10.1007/s00204-011-0720-3. PMID:21720966.
- ▶ Nogueira, C.W., Borges, L.P., and Souza, A.C. 2009. Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *J. Appl. Toxicol.* 29: 156–164. doi:10.1002/jat.1394. PMID:18989868.
- ▶ Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3. PMID:36810.
- ▶ Pawa, S., and Ali, S. 2004. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 1688: 210–222. doi:10.1016/j.bbdis.2003.12.004. PMID:15062871.
- ▶ Porter, W.R., and Neal, R.A. 1978. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 6: 379–388. PMID:28917.
- ▶ Reddy, P.V., Murthy, C.R., and Reddanna, P. 2004. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci. Lett.* 368: 15–20. doi:10.1016/j.neulet.2004.06.046. PMID:15342125.
- ▶ Reitman, S., and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56–63. doi:10.1093/ajcp/28.1.56. PMID:13458125.
- ▶ Sassa, S. 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, 28: 133–145. PMID:7140716.
- ▶ Schäfer, S., Moser, C., Tirrée, J.J., Nieger, M., and Pietschnig, R. 2005. Synthesis and structures of cis- and trans-bis(alkynylselenolato) platinum(II) complexes. *Inorg. Chem.* 44: 2798–2802. doi:10.1021/jc048454a. PMID:15819568.
- Schmidt, E., and Schmidt, F.W. 1967. Guide to practical enzyme diagnosis. Boehringer Mannheim GmbH, West Germany. p. 15.
- Schmidt, E., Schmidt, F.W., Mohr, J., Otto, P., Vido, L., Wrogemann, K., and Herfarth, C. 1975. Liver morphology and enzyme release: further studies in the isolated perfused rat liver. In *Pathogenesis and mechanism of liver cell necrosis*. Edited by D. Keppler. Medical and Technical Publishing Co. Ltd., Lancaster. pp. 147–162. doi:10.1007/978-94-011-6618-8_14.
- ▶ Schwarz, K., and Fredga, A. 1969. Biological potency of organic selenium compounds. I. Aliphatic monoseleno- and diseleno-dicarboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 244: 2103–2110. PMID:5782002.
- ▶ Traber, M.G., and Stevens, J.F. 2011. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biol. Med.* 51: 1000–1013. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017.
- ▶ Tsai, M.K., Lin, Y.L., and Huang, Y.T. 2010. Effects of salvianolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242: 155–164. doi:10.1016/j.taap.2009.10.002. PMID:19822164.
- ▶ Wendel, A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77: 325–333. doi:10.1016/S0076-6879(81)77046-0. PMID:7329310.
- ▶ Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Leite, M.R., and Nogueira, C.W. 2009. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Pathophysiology*, 16: 31–37. doi:10.1016/j.pathophys.2008.12.002. PMID:19162454.
- ▶ Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Prigol, M., Alves, D., Schumacher, R.F., and Nogueira, C.W. 2010a. 3-Alkynyl selenophene protects against carbon-tetrachloride-induced and 2-nitropropane-induced hepatic damage in rats. *Cell Biol. Toxicol.* 26: 569–577. doi:10.1007/s10565-010-9164-4. PMID:20397041.
- ▶ Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Roman, S.S., Bortolatto, C.F., and Nogueira, C.W. 2010b. Anticonvulsant effect of (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole in a pilocarpine model in mice. *Life Sci.* 87: 620–627. doi:10.1016/j.lfs.2010.09.022. PMID:20888349.
- ▶ Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Bortolatto, C.F., and Nogueira, C.W. 2011. (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole has antioxidant and hepatoprotective properties against oxidative damage induced by 2-nitropropane in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25: 80–90. doi:10.1111/j.1472-8206.2010.00813.x. PMID:20141535.
- ▶ Yang, S., Tan, T.M., Wee, A., and Leow, C.K. 2004. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 220–229. doi:10.1007/s00018-003-3357-4. PMID:14745500.

5. CONCLUSÕES

- Através da determinação dos marcadores bioquímicos de dano hepático agudo precoce, evidenciou-se o efeito hepatoprotetor do BPD em ratos.
- O tratamento com o BPD protegeu contra as alterações histopatológicas do fígado induzidas pela TAA.
- O BPD exerceu efeito antioxidante frente ao dano oxidativo induzido por TAA.
- O BPD é um possível agente terapêutico promissor para o tratamento de patologias hepáticas.

PERSPECTIVAS

Mais estudos serão necessários para investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na propriedade hepatoprotetora do BPD. Além disso, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de outros compostos orgânicos de selênio, em especial os derivados de quinolina, em modelos de nocicepção e inflamação. Assim, buscaremos investigar o papel do envelhecimento na neuropatia induzida por quimioterápicos e o potencial terapêutico destes compostos. Paralelamente, será investigada a possível toxicidade após exposição crônica e se estes derivados de quinolina induzem dependência e/ou tolerância em animais.

REFERÊNCIAS

- ABOUL-SOUD, M. A.; AL-OTHMAN, A. M.; EL-DESOKY, G. E.; AL-OTHMAN, Z. A.; YUSUF, K.; AHMAD, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A. Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats. **The Journal of toxicological sciences**, v. 36, n. 3, p. 285-296, 2011.
- ACKER, C. I.; SOUZA, A. C. G.; DOS SANTOS, M. P.; MAZZANTI, C. M.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide attenuates hepatic and hematologic toxicity induced by chlorpyrifos acute exposure in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3481-3490, 2012.
- AKHTAR, T.; SHEIKH, N. An overview of thioacetamide-induced hepatotoxicity. **Toxin reviews**, v. 32, n. 3, p. 43-46, 2013.
- AHMAD, A.; PILLAI, K. K.; NAJMI, A. K.; AHMAD, S. J.; PAL, S. N.; BALANI, D. K. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 35-41, 2002.
- AL-ATTAR, A. M.; AL-RETHERA, H. A. Chemoprotective effect of omega-3 fatty acids on thioacetamide induced hepatic fibrosis in male rats. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 4, p. 956-965, 2017.
- ALGANDABY, M. M.; BREIKAA, R. M.; EID, B. G.; NEAMATALLAH, T. A.; ABDEL-NAIM, A. B.; ASHOUR, O. M. Icariin protects against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: Implication of anti-angiogenic and anti-autophagic properties. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 4, p. 616-624, 2017.
- ALVES, D.; REIS, J.S.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Synthesis of 3-alkynylselenophene derivatives by a cooper-free sonogashira crosscoupling reaction. **European Journal of Organic Chemistry**, v.2, p. 377-382, 2008.
- AMIN, K. A.; HASHEM, K. S.; ALSHEHRI, F. S.; AWAD, S. T.; HASSAN, M. S. Antioxidant and hepatoprotective efficiency of selenium nanoparticles against acetaminophen-induced hepatic damage. **Biological trace element research**, v. 175, n. 1, p. 136-145, 2017.
- BANDEIRA, A. C. B. **Avaliação do efeito protetor do licopeno em um modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos C57BL/6**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2017.
- BARLUENGA, J.; TRINCADO, M.; RUBIO, E.; GONZALEZ, J. M. IPy2BF₄-promoted intramolecular addition of masked and unmasked anilines to alkynes: direct assembly of 3-iodoindole cores. **Angewandte Chemie**, v. 42, p. 2406-2409, 2003.

BASARSLAN, F.; YILMAZ, N.; DAVARCI, I.; AKIN, M.; OZGUR, M.; YILMAZ, C.; ULUTAS, K. T. Effects of ebselen on radiocontrast media-induced hepatotoxicity in rats. **Toxicology and industrial health**, v. 29, n. 8, p. 746-752, 2013.

BASKARANA, Y.; PERIYASAMYB, V.; VENKATRAMANA, A. C. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v. 268, n. 3, p. 204-212, 2010.

BASU, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1, p. 113-127, 2003.

BEGNINI, K. R.; DUARTE, W. R.; SILVA, L. P.; BUSS, J. H.; GOLDANI, B. S.; FRONZA, M.; SEGATTO, N. V.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-1, 2, 3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 510-516, 2017.

BHOGAL, R.H.; CURBISHLEY, S.M.; WESTON, C.J.; ADAMS, D.H.; AFFORD, S.C. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. **Liver Transplantation**, v. 16, n. 11, p. 1303-1313, 2010.

BORGES, L.P.; BORGES, V.C.; MORO, A.V.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.; ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2005.

BORGES, L.P.; BRANDÃO, R.; GODOI, B.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chemico Biological Interactions**, v. 171, n. 1, p. 15-25, 2008.

BORTOLATTO, C.; CHAGAS, P. M.; WILHELM, E. A.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W. 2,2'-dithienyl diselenide, an organoselenium compound, elicits antioxidant action and inhibits monoamine oxidase activity in vitro. **Journal of 45Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 677-684, 2013.

BRAUTBAR, N.; WILLIAMS II, J. Industrial solvents and livertoxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 205, n. 6, p. 479-491, 2002.

BRUCK, R.; ASHKENAZI, M.; WEISS, S.; GOLDINER, I.; SHAPIRO, H.; AEED, H.; GENINA, O.; HELPERN, Z.; PINES, M. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. **Liver International**, v. 27, n. 3, p. 373-383, 2007.

CAMERON, G. R.; KARUNARATNE, W. A. E. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. **The Journal of Pathology**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 1936.

CARVALHO, N. R.; TASSI, C. C.; DOBRASCHINSKI, F.; AMARAL, G. P.; ZEMOLIN, A. P.; GOLOMBIESKI, R. M.; DALLA CORTE, C. L.; FRANCO, J. L.; MAURIZ, J. L.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SOARES, F. A. Reversal of bioenergetics dysfunction by

diphenyl diselenide is critical to protection against the acetaminophen-induced acute liver failure. **Life Sciences**, v. 180, p. 42-50, 2017.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-62, 2010.

CHALASANI, N. P.; HAYASHI, P. H.; BONKOVSKY, H. L.; NAVARRO, V. J.; LEE, W. M.; FONTANA, R. J. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. **The American journal of gastroenterology**, v. 109, n. 7, p. 950-66, 2014.

CHATTERJEE, R.; MITRA, A. An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer. **International immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 335-345, 2015.

CHEN, Y.; DONG, H.; THOMPSON, D.C.; SHERTZER, H.G.; NEBERT, D.W.; VASILIOU, V. Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 38-44, 2013.

CHILAKAPATI, J.; SHANKAR, K.; KORRAPATI, M. C.; HILL, R. A.; MEHENDALE, H. M. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. **Drug metabolism and disposition**, v. 33, n. 12, p. 1877-1885, 2005.

CHILAKAPATI, J.; KORRAPATI, M.C.; HILL, R.A. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. **Toxicology**, v. 230, n. 2, p.105-116, 2007.

CHU, C.J.; WANG, S.S.; LEE, F.Y.; CHANG, F.Y.; LIN, H.C.; HOU, M.C.; CHAN, C.C.; WU, S.L.; CHEN, C.T.; HUANG, H.C., LEE, S.D. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. **European journal of clinical investigation**, v. 31, n. 2, p. 156-163, 2001.

COSTA, M. D.; DE FREITAS, M. L.; DALMOLIN, L.; OLIVEIRA, L. P.; FLECK, M. A.; PAGLIARINI, P.; ACKER, C.; ROMAN, S. S.; BRANDÃO, R. Diphenyl diselenide prevents hepatic alterations induced by paraquat in rats. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 750-758, 2013.

DAVID, P.; ALEXANDRE, E.; CHENARD-NEU, M. P.; WOLF, P.; JAECK, D.; RICHERT, L. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase albuminaemic rats. **Laboratory animals**, v. 36, n. 2, p. 158-164, 2002.

DE FREITAS, A.S.; FUNCK, V.R.; ROTTA, M.S.; BOHRER, D.; MÖRSCHBÄCHER, V.; PUNTEL, R.L.; NOGUEIRA, C.W.; FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain research bulletin**, v. 79, n. 1, p. 77-84, 2009.

DE MINICIS, S.; KISSELEVA, T.; FRANCIS, H.; BARONI, G. S.; BENEDETTI, A.; BRENNER, D.; ALVARO, D.; ALPINI, G.; MARZIONI, M. Liver carcinogenesis:

rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, n. 6, p. 450-459, 2013.

DEBNATH, S.; GHOSH, S.; HAZRA, B. Inhibitory effect of *Nymphaea pubescens* Willd flower extract on carrageenan-induced inflammation and CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 59, p. 485-491, 2013.

DUARTE, L. F. B.; BARBOSA, E. S.; OLIVEIRA, R. L.; PINZ, M. P.; GODOI, B.; SCHUMACHER, R. F.; Luchese, C.; Wilhelm, E. A.; ALVES, D. et al. A simple method for the synthesis of 4-arylselanyl-7-chloroquinolines used as in vitro acetylcholinesterase inhibitors and in vivo memory improvement. **Tetrahedron Letters**, 2017.

FAN, C.; JIANG, J.; YIN, X.; WONG, K. H.; ZHENG, W.; CHEN, T. Purification of selenium-containing allophycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* and its hepatoprotective effect against t-BOOH-induced apoptosis. **Food chemistry**, v. 134, n. 1, p. 253-261, 2012.

FILHO, C.B.; DEL FABBRO, L.; BOEIRA, S.P.; FURIAN, A.F.; SAVEGNAGO, L.; SOARES, L.C.; BRAGA, A.L.; JESSE, C.R. Hepatoprotective effect of bis(4-methylbenzoyl) diselenide against CCl₄-induced oxidative damage in mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n.2, p. 152-158, 2013.

FONTANA, L.; MOREIRA, E.; TORRES, M. I.; FERNINDEZ, M. I.; RIOS, A.; MEDINA, F. S.; GIL, A. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicology**, v. 106, n. 1-3, p. 197-206, 1996.

GALICIA-MORENO, M.; GUTIERREZ-REYES, G. Papel des estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica. **Revista de Gastroenterología de México**, v. 79, n. 2, p. 135-144, 2014.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; PRAKASH, H. S. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptissuaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl₄ and H₂O₂. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 5, n. 11, p. 868 – 874, 2012.

GU, X.; MANAUTOU, J. E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 14, 2012.

GULMEZ, S. E.; LARREY, D.; PAGEAUX, G. P.; BERNUAU, J.; BISSOLI, F.; HORMANS, Y.; THORBURN, D.; MCCORMICK, P. A.; STRICKER, B.; TOUSSI, M.; LIGNOT-MALEYRAN, S.; MICON, S.; HAMOUD, F.; LASSALLE, R.; JOVÉ, J.; BLIN, P.; Nicholas Moor et al. Liver transplant associated with paracetamol overdose: results from the seven-country SALT study. **British journal of clinical pharmacology**, v. 80, n. 3, p. 599-606, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Overview of the circulation: medical physics of pressure, flow, and resistance. **Textbook of medical physiology**, v. 10, 1996.

HAJOVSKY, H.; HU, G.; KOEN, Y.; SARMA, D.; CUI, W.; MOORE, D. S.; STAUDINGER, J. L.; HANZLIK, R. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 9, p. 1955-1963, 2012.

HECK, S. O.; FULCO, B. C.; QUINES, C. B.; OLIVEIRA, C. E.; LEITE, M. R.; CECHELLA, J. L.; NOGUEIRA, C. W. Combined Therapy With Swimming Exercise and a Diet Supplemented With Diphenyl Diselenide Is Effective Against Age-Related Changes in the Hepatic Metabolism of Rats. **Journal of cellular biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1574-1582, 2017.

HENRY, J.B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 9ed. Sauders. p. 200-280. 1999.

IBRAHIM, M.; PRIGOL, M.; HASSAN, W.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. Protective effect of binaphthyl diselenide, a synthetic organoselenium compound, on 2-nitropropane-induced hepatotoxicity in rats. **Cell biochemistry and function**, v. 28, n. 4, p. 258-265, 2010.

INGAWALE, D. K.; MANDLIK, S. K.; NAIK, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 118-133, 2014.

INVERNIZZI, P. Liver auto-immunology: The paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. **Journal of autoimmunity**, v. 46, p. 1-6, 2013.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R.; RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. **Drug metabolism reviews**, v. 44, n. 1, p. 88-106, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 556, 2013.

KALIL, A. N.; COELHO, J.; STRAUSS, E. **Fígado e vias biliares: Clínica e cirurgia**. Ed. Revinter. RJ. p. 3-60, 2001.

KAPLOWITZ, N. Drug-induced liver disorders. **Drug safety**, v. 24, n. 7, p. 483-490, 2001.

KAUSHIK, V.; CHAUDHARY, G.; AHMAD, S.; SAINI, V.; PANDURANGAN, A. Diverse Sources of Hepatotoxicity in Rats - A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 21, n. 41, p. 254-259, 2013.

KAUR, V.; KUMAR, M.; KAUR, P.; KAUR, S.; SINGH, A. P.; KAUR, S. Hepatoprotective activity of Butea monosperma bark against thioacetamide-induced liver injury in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 332-341, 2017.

KAWAI, H. ISHIBASHI, T.; KUDO, N.; KAWASHIMA, Y.; MITSUMOTO, A. Behavioral and biochemical characterization of rats treated chronically with thioacetamide: proposal of an animal model for hepatic encephalopathy associated with cirrhosis. **The Journal of toxicological sciences**, v. 37, n. 6, p. 1165-1175, 2012.

KEMELO, M. K.; PIERZYNOVÁ, A.; CANOVÁ, N. K.; KUČERA, T.; FARGHALI, H. The involvement of sirtuin 1 and heme oxygenase 1 in the hepatoprotective effects of quercetin against carbon tetrachloride-induced sub-chronic liver toxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 269, p. 1-8, 2017.

KUDVA, A. K.; SHAY, A. E.; PRABHU, K. S. Selenium and inflammatory bowel disease. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, p. 71-77, 2015.

LAM, P.; CHEUNG, F.; TAN, H. Y.; WANG, N.; YUEN, M. F.; FENG, Y. Hepatoprotective Effects of Chinese Medicinal Herbs: A Focus on Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activities. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 4, p. 465, 2016.

LARSON, A. M. Acetaminophen hepatotoxicity. **Clinical Liver Disease**, v. 11, n. 3, p. 525-48, 2007.

LAUER, G. M.; WALKER, B. D. Hepatitis C virus infection. **New England journal of medicine**, v. 345, n. 1, p. 41-52, 2001.

LEE, K.S.; LEE, S.J.; PARK, H.J.; CHUNG, J.P.; HAN, K.H.; CHON, C.Y.; LEE, S.I.; MOON, Y.N. Oxidative Stress Effect on the Activation of Hepatic Stellate Cells. **Yonsei Medical Journal**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2001.

LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.

LIEDTKE, C.; LUEDDE, T.; SAUERBRUCH, T.; SCHOLTEN, D.; STREETZ, K.; TACKE, F.; TOLBA, R.; TRAUTWEIN, C.; TREBICKA, J.; WEISKIRCHEN, R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. **Fibrogenesis and tissue repair**, v. 6, n. 1, p. 19, 2013.

LIMA, C.F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; WILSON, C.P. Drinking of Salvia officinalis tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 3, p. 456-464, 2007.

LIMA T. C. **Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo de modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2008.

LIU Y.; MEYER, C.; XU, C.; WENG, H.; HELLERBRAND, C.; DIJKE, P. T.; DOOLEY, S. Animal models of chronic liver diseases. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 304, n. 5, p. G449-G468, 2013.

LOW, T.Y.; LEOW, C.K.; SALTO-TELLEZ, M.; CHUNG, M.C. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3960-3974, 2004.

LU, K. H.; WENG, C. Y.; CHEN, W. C.; SHEEN, L. Y. Ginseng essence, a medicinal and edible herbal formulation, ameliorates carbon tetrachloride-induced oxidative stress and liver injury in rats. *Journal of Ginseng Research*, 2017.

MAHMOUD, M. F.; FAHMY, A.; AUF, M. A. Evaluation of the hepatoprotective effect of green tea extract and selenium on CCL4-induced fibrosis. **e-SPEN Journal**, v. 7, n. 1, p. e23-e29, 2012.

MARÍ, M.; COLELL, A.; MORALES, A.; VON MONTFORT, C.; GARCIA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Redox control of liver function in health and disease. **Antioxidants and redox signaling**, v. 12, n. 11, p. 1295-1331, 2010.

MATTOS, A. A.; DANTAS-CORRÊA, E. Tratado de hepatologia. In: **Tratado de hepatologia**. Rubio, 2010.

MELLO, T.; ZANIERI, F.; CENI, E.; GALLI, A. Oxidative Stress in the Healthy and Wounded Hepatocyte: A Cellular Organelles Perspective. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2015.

MESSARAH, M. KLIBET, F.; BOUMENDJEL, A.; ABDENNOUR, C.; BOUZERNA, N.; BOULAKOUD, M. S.; EL FEKI, A. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 64, n. 3, p. 167-174, 2012.

MLYNIEC, K.; GAWEL, M.; DOBOSZEWSKA, U.; STAROWICZ, G.; PYTKA, K.; DAVIES, C. L.; BUDZISZEWSKA, B. Essential elements in depression and anxiety. Part II. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 187-194, 2015.

MIYANISHI, K.; HOKI, T.; TANAKA, S.; KATO, J. Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 3, p. 593, 2015.

MOHD HANAFIAH, K.; GROEGER, J.; FLAXMAN, A.D.; WIERSMA, S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333-1342, 2013.

MULLER, A.; CADENAS, E.; GRAF, P.; SIES, H. A novel biologically active seleno-organic compound I. Glutathione peroxidase like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ51 (Ebselen). **Biochemistry International**, v. 33, p. 3235-3239, 1984.

NADA, S.A.; OMARA, E.A.; ABDEL-SALAM, O.M.; ZAHRAN, H.G. Mushroom insoluble polysaccharides prevent carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3184-3188, 2010.

NAVARRO, V. J.; BARNHART, H.; BONKOVSKY, H. L.; DAVERN, T.; FONTANA, R. J.; GRANT, L.; REDDY, K. R.; SEEFF, L. B.; SERRANO, J.; SHERKER, A. H.;

STOLZ, A.; TALWALKAR, J.; VEGA, M.; VUPPALANCHI, R. Liver injury from herbals and dietary supplements in the U.S. Drug-Induced Liver Injury Network. **Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 1399-1408, 2014.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Science of the Total Environment**, v. 249, n. 1, p. 347-371, 2000.

NEWAIRY, A. A.; EL-SHARAKY, A. S.; BADRELDEEN, M. M.; EWEDA, S. M.; SHEWEITA, S. A. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. **Toxicology**, v. 242, n. 1, p. 23-30, 2007.

NELSON, S.D. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. **Seminars in liver disease**, v. 10, p. 267-278, 1990.

NOGUEIRA, C.W.; BORGES, L.P.; SOUZA, A.C. Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 156-164, 2009.

NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

OZKOL, H.; BULUT, G.; BALAHOROGLU, R.; TULUCE, Y.; OZKOL, H. U. et al. Protective Effects of selenium, N-acetylcysteine and vitamin E against acute ethanol intoxication in rats. **Biological trace element research**, v. 175, n. 1, p. 177-185, 2017.

PARNHAM, M.J.; GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 19, p. 3095-3102, 1987.

PENG, F.; GUO, X.; LI, Z.; LI, C.; WANG, C.; LV, W.; XIAO, F.; KAMAL, M.; YUAN, C. Antimutagenic Effects of Selenium-Enriched Polysaccharides from *Pyraacantha fortuneana* through Suppression of Cytochrome P450 1A Subfamily in the Mouse Liver. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1731, 2016.

PINZ, M.; SCHIAVON, A.; DUARTE, V.; ROCHA, M.; GOLDANI, B.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. 4-phenylselenyl-7 chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal Pharmacology**, v. 780, p. 122-128, 2016.

POLI, G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. **Molecular aspects of medicine**, v. 21, n. 3, p. 49-98, 2000.

PORTELA, T. C. L. **Aspectos morfológicos e moleculares do modelo experimental da tioacetamida no estudo da hepatocarcinogênese**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.

QUINES, C. B.; CHAGAS, P. M.; HARTMANN, D.; CARVALHO, N. R.; SOARES, F. A.; NOGUEIRA, C. W. (p-CIPhSe) 2 Reduces Hepatotoxicity Induced by Monosodium Glutamate by Improving Mitochondrial Function in Rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2017.

RASCHZOK, N.; SALLMON, H.; PRATSCHKE, J.; SAUER, I.M. Micrnas in liver tissue engineering—new promises for failing organs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 88, p. 67-77, 2015.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-90, 2012.

REIS A.S.; PINZ, M.; DUARTE, L. F. B.; ROEHRS, J. A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. **Journal of Psychiatric Research**, v. 84, p. 191-199, 2017.

REUBEN, A. Hy's law. **Hepatology**, v. 39, n. 2, p. 574-578, 2004.

RUMACK, B. H. Acetaminophen misconceptions. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 10-15, 2004.

SANZ- GARCIA C.; FERRER-MAYORGA, G.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, A.; VALVERDE, A. M.; MARTÍN-DUCE, A.; VELASCO-MARTÍN, J. P.; REGADERA, J.; FERNÁNDEZ, M.; ALEMANY, S. Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 15342-15351, 2013.

SAWANT, S.P.; DNYANMOTE, A.V.; WARBRITTON, A.; LATENDRESSE, J.R.; MEHENDALE, H.M. Type 2 diabetic rats are sensitive to thioacetamide hepatotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 211, n. 3, p. 221-232, 2006.

SARI, M. H. M.; SOUZA, A. C. G.; ROSA, S. G.; SOUZA, D.; RODRIGUES, O. E. D.; NOGUEIRA, C.W. Contribution of dopaminergic and adenosinergic systems in the antinociceptive effect of p-chloro-selenosteroid. **European Journal Pharmacology**, v. 725, p. 79-86, 2014.

SARAIVA, M. T.; KRÜGER, R.; BALDINOTTI, R. S. M.; LENARDÃO, E. J.; LUCHESE, C.; SAVEGNAGO, L.; WILHELM, E. A.; ALVES, D. 7-Chloroquinoline-1,2,3-triazoyl Carboxylates: Organocatalytic Synthesis and Antioxidant Properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 1, p. 41-53, 2016.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C. R.; PINTO, L. G.; ROCHA, J. B. T.; BARANCELLI, D. A.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. 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. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 88, p. 418-426, 2008.

SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. Free radical biology for medicine: Learning from nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 952-968, 2013.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological sciences**, v. 311, n. 1152, p. 617-31, 1985.

SILVA, V. D. G.; REIS, A. S.; PINZ, M.; DA FONSECA, C. A.; DUARTE, L. F. B.; ROEHRS, J. A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. et al. Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, 2017.

SILVERTHORN, D. U. Sistema digestório. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5ed. Rio Grande do Sul: Artmed, p. 698-723, 2010.

SINGH, A.; BHAT, T.; SHARMA, O. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. **Journal Clinical Toxicology**, 2011.

SIRICA, A.E.; NATHANSON, M.H.; GORES, G.J.; LARUSSO, N.F. Pathobiology of biliary epithelia and cholangiocarcinoma: proceedings of the Henry M. and Lillian Stratton Basic Research Single-Topic Conference. **Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 2040-2046, 2008.

SOKAR, S. S.; EL-SAYAD, M. E. S.; GHONEIM, M. E. S.; SHEBL, A. M. Combination of Sitagliptin and Silymarin ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 98-107, 2017.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 536, n. 2, p. 152-157, 2013.

SUNDARIA, K.; KARTHIKA, D.; ILAVENILB, S.; KALEESWARANB, B.; SRIGOPALRAMD, S.; RAVIKUMAR, S. Hepatoprotective and proteomic mechanism of *Sphaeranthus indicus* in paracetamol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. **Food Bioscience**, v. 1, p. 57-65, 2013.

SURHIO, M. M.; WANG, Y.; XU, P.; SHAH, F.; LI, J.; YE, M. Antihyperlipidemic and hepatoprotective properties of selenium modified polysaccharide from *Lachnum* sp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 88-95, 2017.

TANAKA, M.; TAKEZAWA, N.; KUMAI, T.; WATANABE, M.; MATSUMOTO, N.; NAKAYA, S.; KOBAYASHI, S. Ebselen protects against the reduction in levels of drug-metabolizing enzymes in livers of rats with deoxycholic acid-induced liver injury. **Pharmacology and Toxicology**, v. 91, n 2, p. 64-70, 2002.

TELL, G.; VASCOTTO, C.; TIRIBELLI, C. Alterations in the redox state and liver damage: Hints from the east basic school of hepatology. **Journal of hepatology**, v. 58, n. 2, p. 365-374, 2013.

TERBLANCHE, J.; HICKMAN, R. Animal models of fulminant hepatic failure. **Digestive diseases and sciences**, v. 36, n. 6, p. 770-774, 1991.

THIRUMALAI, T.; DAVID, E.; VIVIYAN, T.S.; ELUMALAI, E.K. Restorative effect of *Eclipta alba* in CCl₄ induced hepatotoxicity in male albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, n. 1, p. 304-307, 2011.

TSAI, M.; LIN, Y.L.; HUANG, Y.T. Effects of salvianolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 242, n. 2, p. 155-164, 2010.

VIEIRA, B. M. **Padronização de dose de tetracloreto de carbono em modelo de lesão hepática aguda por estresse oxidativo em ratos Wistar**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, 2014.

VIDELA, L.A.; RODRIGO, R.; ORELLANA, M.; FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; QUINONES, L.; VARELA, N.; CONTRERAS, J.; LAZARTE, R.; CSENDES, A. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clinical Science**, v. 106, n. 3, p. 261-268, 2004.

WANG, H.; WEI, W.; WANG, N.P.; GUI, S.Y.; WU, L.; SUN, W.Y.; XU, S.Y. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. **Life sciences**, v. 77, n. 15, p. 1902-1915, 2005.

WASSER, S.; LIM, G. Y.; ONG, C. N.; TAN, C. E. Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 16, n. 11, p. 1244-1253, 2001.

WATSON, J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. **Open biology**, v. 3, n. 1, p. 120144, 2013.

WEBER, L.W.D.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical reviews in toxicology**, v. 33, n. 2, p. 105-136, 2003.

WILHELM, E.A.; JESSE, C.R.; LEITE, M.R.; NOGUEIRA, C.W. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Pathophysiology**, v. 16, n. 1, p. 31-37, 2009.

WILHELM, E.A.; JESSE, C.R.; PRIGOL, M.; ALVES, D.; SCHUMACHER, R.F.; NOGUEIRA, C.W. 3-Alkynyl selenophene protects against carbon-tetrachloride-induced and 2-nitropropane-induced hepatic damage in rats. **Cell biology and toxicology**, v. 26, n. 6, p. 569-577, 2010a.

WILHELM, E.A.; JESSE, C.R.; ROMAN, S.S.; BORTOLATTO, C.F.; NOGUEIRA, C.W. Anticonvulsant effect of (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole in a pilocarpine model in mice. **Life sciences**, v. 87, n. 19, p. 620-627, 2010b.

WILHELM, E.A.; JESSE, C.R.; BORTOLATTO, C.F.; NOGUEIRA, C.W. (E)-2-benzylidene-4-phenyl-1,3-diselenole has antioxidant and hepatoprotective properties against oxidative damage induced by 2-nitropropane in rats. **Fundamental and clinical pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 80-90, 2011.

WILHELM, E.A.; MACHADO, N.C.; PEDROSO, A.B.; GOLDANI, B.S.; SEUS, N., MOURA, S.; SAVEGNAGO, L.; JACOB, R. G.; ALVES, D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3- triazolylcarboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. **RSC Advances**, v. 4, n. 78, p. 41437-41445, 2014.

WILHELM, E.A.; FERREIRA, A.T.; PINZ, M.P.; REIS, A.S.; VOGT, A.G.; STEIN, A.L.; ZENI, G.; LUCHESE, C. Antioxidant effect of quinoline derivatives containing or not selenium: Relationship with antinociceptive action quinolines are antioxidant and antinociceptive. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 457-467, 2017.

YANG, S.; TAN, T.M.; WEE, A.; LEOW, C.K. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 2, p. 220-229, 2004.

YUE, D.; YAO, T.; LAROCK, R. C. Syntheses of isochromenes and naphthalenes by electrophilic cyclization of acetylenic arenecarboxaldehydes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 3381-3388, 2006.

ZHELEVA, A.; TOLEKOVA, A.; ZHELEV, M.; UZUNOVA, V.; PLATIKANOVA, M.; GADZHEVA, V. Free radical reactions might contribute to severe alpha amanitin hepatotoxicity - a hypothesis. **Medical hypotheses**, v. 69, n. 2, p. 361-367, 2007.

ZOU, C.; QIU, Q.; CHEN, H.; DOU, L.; LIANG, J. Hepatoprotective effects of selenium during diabetes in rats. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 2, p. 114-123, 2016.

ANEXO

Pelotas, 08 de agosto de 2017

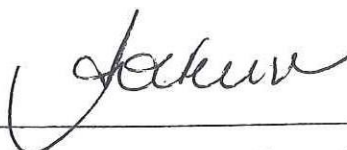
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito hepatoprotetor de compostos orgânicos de selênio em ratos**”, registrada com o nº 23110.005448/2017-24, sob a responsabilidade de **Ethel Antunes Wilhelm** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/07/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início: 08/2017 Término: 07/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattusnovergicus / Wistar
Nº de animais	32
Idade	3 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central da UFPeI

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 5448-2017).



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2017

Assinatura do Professor Responsável: _____