

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

MAIARA LAÍS DE SOUZA

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE BENFOTIAMINA E ÁCIDO ALFA-LIPÓICO NO
TRATAMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA EM MODELO
EXPERIMENTAL

Uberaba

2018

MAIARA LAÍS DE SOUZA

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE BENFOTIAMINA E ÁCIDO ALFA-LIPÓICO NO
TRATAMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA EM MODELO
EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Básica Experimental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^º. Dr. Guilherme Vannucchi Portari

Uberaba

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S716e Souza, Maiara Laís de
Efeitos da associação de benfotiamina e ácido alfa-lipóico no tratamento de doença hepática alcoólica em modelo experimental / Maiara Laís de Souza. – 2018.
63 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari

1. Doença hepática crônica induzida por substâncias e drogas. 2. Estresse oxidativo. 3. Antioxidantes. I. Portari, Guilherme Vannucchi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.36

MAIARA LAÍS DE SOUZA

Efeitos da associação de benfotiamina e ácido alfa-lipóico no tratamento de doença hepática alcoólica em modelo experimental.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Básica Experimental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

25 de junho de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr^a. Márcia Antoniazzi Michelin
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Nilson Penha Silva
Universidade Federal de Uberlândia

DEDICATÓRIA

À todos os tubarões em pele de lobo.

AGRADECIMENTOS

Talvez fazer os agradecimentos de uma dissertação seja a parte mais difícil da mesma, talvez por fugir tanto do contexto da obra, prezando de uma certa liberdade poética nesta página. E fazendo uso desta mesma liberdade irei agradecer ao que foi aprendido durante estes dois anos.

É complicado exercitar a gratidão diariamente, ainda mais por todo este tempo. Posso não ter agradecido a algum acontecimento e com certeza posso ter amaldiçoado algum infortúnio. Mas o objetivo aqui é construir a história deste trabalho. E prefiro acreditar em histórias que contenham heróis e não vilões.

Portanto, agradeço a cada situação cheia de pressa e pressão que me fizeram evoluir minha resiliência à reinvenção. Agradeço a cada situação complicada, de saia justa, estresse ou desentendimento com um colega do grupo de pesquisa, sem elas, não saberia como lidar com o maior recurso desse mundo, pessoas. Agradeço a cada atraso que me ensinou ao mesmo tempo que paciência é a mãe dos ensinamentos, e também que ordem é progresso.

Agradeço a cada protocolo que falhou e me ensinou duas coisas: que o fracasso é sucesso quando aprendemos com ele, e que o insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçarmos com mais inteligência e preparo. Agradeço a presença de cada erro, tropeço, trancos e barrancos durante este período, sem eles não saberia que dor é sim obrigatória, porém a escolha de continuar sofrendo é minha.

Gratidão à Kátia, Larissa, Álisson, Ricardo, Renata e Sarah; parceiros de jornada que se tornaram profundos conhecedores de piadas completamente sem graça, gentis a ponto de não me oferecerem nada com laticínios (na maior parte do tempo) e puderam me ajudar mesmo quando nem sabiam que estavam ajudando.

Meu muito obrigado a meu orientador por fornecer esta oportunidade, por toda confiança depositada durante o desenvolvimento do mesmo.

Agradeço à Arthur e Maira por serem os maiores patrocinadores positivos que já existiram na face da terra. E finalmente, agradeço infinitamente aos meus pais, Sérgio e Fátima, que me ensinaram que com disciplina, clareza e organização, é possível conquistar o que quiser.

“No coração da ciência existe um equilíbrio essencial entre duas atitudes aparentemente contraditórias: uma abertura para idéias novas, por mais bizarras ou contrárias à intuição que sejam, e o exame cético mais implacável de todas as idéias, antiga e novas. É assim que verdades profundas são separadas de disparates profundos”

Carl Sagan

RESUMO

Introdução: A doença hepática alcoólica (ALD) é resultante do consumo abusivo de álcool e sua evolução é resultado do estresse oxidativo desenvolvido por esta ingestão de etanol e seu metabolismo. A possibilidade do uso combinado de antioxidantes merece uma investigação mais profunda a fim de encontrar mais dados sobre sua utilização combinada. **Objetivos:** Avaliar a associação da benfotiamina (BT) com o ácido alfa lipóico (ALA) como tratamento aos danos hepáticos provocados pela ingestão crônica de etanol em modelo experimental. **Material e Métodos:** foram utilizados 32 ratos Wistar machos recém desmamados foram submetidos ao protocolo para o desenvolvimento de ALD e após 30 dias foram divididos em 4 grupos e receberam suplementação antioxidante por 14 dias: E (etanol), EA (etanol + ALA), EB (etanol + BT), EAB (etanol + ALA + BT). Ao fim do experimento, os animais foram eutanasiados e foi coletado o fígado para análise. **Resultados:** Não houve diferença entre consumo e evolução ponderal entre os grupos. Também não houve diferença em relação à concentração de tióis não-proteicos e atividade enzimática da superóxido dismutase e catalase. A concentração de vitamina E foi maior no grupo suplementado com ácido alfa lipóico, e o malondialdeído teve menor concentração no grupo EAB. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo permitem concluir que a suplementação combinada de dois antioxidantes pode trazer benefícios através da influência, exercida sobre componentes do sistema de defesa antioxidante não-enzimático, assim como sua ação direta através da doação de hidrogênio a espécies radicalares. Para elucidar esta questão, mais estudos futuros são necessários.

Palavras-chave: Doença Hepática Alcoólica. Estresse Oxidativo. Antioxidantes.

ABSTRACT

Introduction: Alcoholic liver disease (ALD) is a result of alcohol abuse and its evolution is a result of the oxidative stress developed by this ethanol intake and its metabolism. The possibility of the combined use of antioxidants merits further investigation in order to find more conclusive data on their combined use. Objectives: To evaluate the association between benfotiamine (BT) and alpha lipoic acid (ALA) as a treatment for liver damage caused by chronic ethanol ingestion in an experimental model. **Material and methods:** Thirty-two male Wistar rats, 60-90g, after a period of adjustment and adaptation to the liquid diet, and were submitted to protocol for the development of ALD and after 30 days were divided into 4 groups: E (ethanol) , EA (ethanol + alpha-lipoic acid), EB (ethanol + benfotiamine), EAB (ethanol + alpha-lipoic acid + benfotiamine) and received antioxidant supplementation for 14 days as a treatment. At the end of the experiment, the animals were euthanized and the liver were collected for analysis. **Results:** There was no difference between consumption and weight evolution between the groups. There was also no statistically significant difference in relation to the concentration of non-protein thiols and the enzymatic activity of superoxide dismutase and catalase. The concentration of vitamin E was higher in the group supplemented with alpha lipoic acid, and malondialdehyde had a lower concentration in the EAB group. **Conclusion:** The results of the present study allow to conclude that the combined supplementation of two antioxidants can bring benefits through the influence exerted on components of the non-enzymatic antioxidant defense system as well as its direct action through the hydrogen donation to radical species. To elucidate this issue, more future studies are needed.

Keywords: Alcoholic Liver Disease. Oxidative stress. Antioxidants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Formação mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS) via cadeia transportadora de elétrons.....	18
Figura 2 -	Etapas da lipoperoxidação.....	19
Figura 3 -	Integração do sistema antioxidante enzimático.....	23
Figura 4 -	Vias de oxidação do etanol no hepatócito.....	26
Figura 5 -	Reação de oxidação do etanol pela ADH.....	27
Figura 6 -	Delineamento experimental.....	38
Figura 7 -	Ganho de peso médio (em gramas) dos animais (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina) durante período experimental. ($p>0,05$).....	41
Figura 8 -	Ingestão semanal média de dieta líquida (mL) nos grupos (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina) durante período experimental. ($p>0,05$).....	41
Figura 9 -	Ingestão semanal média de etanol (g) nos grupos (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina) durante período experimental. ($p>0,05$).....	42
Figura 10 -	Concentração de MDA. $a= p<0,05$ em relação a EAB.....	42
Figura 11 -	Atividade enzimática. (A= atividade enzimática da SOD; B= atividade enzimática da CAT).....	43
Figura 12 -	Tióis não proteicos.....	43
Figura 13 -	Concentração de vitamina E. $a= p<0,05$ em relação a E; $b= p<0,05$ em relação a EA.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ações e mecanismos de enzimas antioxidantes.....	21
Tabela 2 - Ações e mecanismos de compostos antioxidantes não-enzimáticos.....	24
Tabela 3 - Dieta líquida de Lieber e DeCarli (1989) para 1kg de dieta.....	37

LISTA DE ABREVIACOES

4-HNE – 4-hidroxinonenal
ADH – lcool desidrogenase
ALA – cido alfa-lipóico
ALD – Doença Hepática Alcoólica
ANOVA – análise de variância
CAT – catalase
CEUA – Comissão de tica no Uso de Animais
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentao Animal
CYP2E1 – citocromo 2E1
DHLA – cido dihidrolipóico
DNA – cido desoxirribonucleico
GPx – glutaciona peroxidase
Grase – glutaciona redutase
GSH – glutaciona reduzida
GSSH – glutaciona oxidada
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HPLC – cromatografia luida de alta performance
KCl – cloreto de potsio
LPO – peroxidao lipóidica
MDA – malondialdeído
NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada)
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada)
NOAEL – Nível de Efeito Adverso Não Observado
OMS – Organizao Mundial da Saúde
PUFA – cido graxos polinsaturados
ROS – espécies reativa de oxigênio
SOD – superóxido dismutase
TBA – cido tiobarbitúrico
UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro
USP-RP – Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	CONSUMO DO ÁLCOOL E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE.....	15
1.2	RADICAIS LIVRES E DANO OXIDATIVO.....	17
1.3	SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
1.3.1	Enzimático.....	21
1.3.2	Não-enzimático.....	23
1.4	METABOLISMO E HEPATOTOXICIDADE DO ETANOL.....	25
1.5	BENFOTIAMINA E ÁCIDO ALFA LIPÓICO.....	28
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	OBJETIVO GERAL.....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	35
3.2	MATERIAL.....	35
3.3	MÉTODOS.....	35
3.3.1	Adaptação.....	35
3.3.2	Experimentação.....	35
3.3.3	Eutanásia e coleta de amostras.....	37
3.3.4	Delineamento experimental.....	38
3.4	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	38
3.4.1	Determinação de malondialdeído (MDA)	38
3.4.2	Determinação da atividade da catalase (CAT).....	38
3.4.3	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	39
3.4.4	Determinação de tióis não proteicos.....	39
3.4.5	Determinação de vitamina E.....	40
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4	RESULTADOS.....	41
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O álcool é consumido praticamente em todo o mundo. Segundo o Relatório Global sobre Álcool e Saúde da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 e as Estatísticas Mundiais de Saúde de 2017, estima-se que indivíduos com idade de 15 anos ou mais consumiram em torno de 6,4 litros de álcool em 2016, que equivalem a cerca de 13,9g por dia.

No Brasil, o consumo total estimado é equivalente a 8,9L por pessoa (WHO, 2017), quantidade superior à média mundial. Estima-se que homens consumam 13,6L por ano, e as mulheres, 4,2L por ano. Quando são considerados apenas os indivíduos que consomem álcool, esta média sobe para 15,1L de álcool por pessoa, sendo 8,9L para mulheres e 19,6L para homens, segundo levantamento da Secretaria Nacional Antidrogas de 2007. E de acordo com este mesmo estudo, 52% dos brasileiros acima de 18 anos bebem (pelo menos 1 vez ao ano). Entre os homens são 65% e entre as mulheres 41%. Na outra ponta estão os 48% de brasileiros abstinentes, que nunca bebem ou que bebem menos de 1 vez por ano. No grupo dos adultos que bebem, 60% dos homens e 33% das mulheres consumiram 5 doses ou mais na vez em que mais beberam no último ano. Do conjunto dos homens adultos, 11% bebem todos os dias e 28% consomem bebida alcoólica de 1 a 4 vezes por semana (Secretaria Nacional Antidrogas, 2007).

Dados da OMS descrevem que cerca de 3,3 milhões de mortes mundiais anuais (5,9%) ocorrem em decorrências de doenças resultantes do uso de álcool; e no Brasil, a situação não é muito diferente já que o álcool esteve associado a 63% dos índices de cirrose hepática (OMS, 2014; Secretaria Nacional Antidrogas, 2007).

O consumo de bebidas alcoólicas é um comportamento adotado pela maioria das culturas. Seu uso é associado com celebrações, situações de negócio e sociais, cerimônias religiosas e eventos culturais. Por outro lado, o consumo nocivo de álcool é responsável por cerca de 3% de todas as mortes que ocorrem no planeta, incluindo desde cirrose e câncer hepático até acidentes, quedas, intoxicações e homicídios (MELONI e LARANJEIRA, 2004). Nos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, as bebidas alcoólicas são um dos principais fatores de doença e mortalidade, com seu impacto deletério sendo considerado entre 8% e 14,9% do total de problemas de saúde dessas nações (MELONI e LARANJEIRA, 2004; World Health Report, 2002).

1.1. CONSUMO DO ÁLCOOL E SUAS CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE

Tradicionalmente, os países onde o consumo de álcool é permitido são divididos em países “molhados” (culturas nas quais os índices de abstinência são baixos e o vinho é a principal bebida de escolha) e “secos” (a abstinência é mais comum, mas aqueles que bebem costumam consumir grandes quantidades). Essa tipologia vem perdendo força e sendo substituída por uma crescente homogeneização dos padrões do beber e das preferências por tipo de bebida alcoólica (BLOOMFIELD *et al.*, 2003). Atualmente, os pesquisadores direcionam sua atenção sobre outros comportamentos relacionados ao beber, como, por exemplo, a regularidade (frequência) com que se bebe, a quantidade do beber, a frequência do beber em “binge”, sendo representado pelo consumo de álcool acima de 5 doses para os homens e 4 doses para as mulheres. No caso, cada dose possui acima de 13g de álcool e o consumo é feito em um período de duas horas (GUNZARETH *et al.*, 2004; NAIMI *et al.*, 2003; CDC, 2012).

Além de consequências como acidentes e violência, existem outras como doenças cardiovasculares, sendo que sua relação com o consumo de álcool é um pouco complexa já que o efeito benéfico e cardioprotetor do consumo de baixas quantidades de álcool de determinada origem desaparece quando o consumo do mesmo é aumentado. Em adição, o consumo de álcool está relacionado com hipertensão arterial, fibrilação atrial e infarto independentemente da bebida alcoólica consumida. (ROERECKE e REHM, 2012).

O diabetes *mellitus* mostra uma relação dupla com o consumo alcoólico já que um perfil de consumo de baixo risco tende a ser benéfico e de médio ou alto risco, extremamente prejudicial (BALIUNAS *et al.*, 2009). Diferindo das patologias citadas, não há relação benéfica com o álcool nos casos de síndrome fetal alcoólica e complicações em partos prematuros, já que essas condições são diretamente induzidas pelo consumo alcoólico da gestante (FOLTRAN *et al.*, 2011), e em doenças infecciosas devido ao enfraquecimento do sistema imune pelo consumo de álcool, permitindo assim, o desenvolvimento de doenças como pneumonia e tuberculose (LÖNNROTH *et al.*, 2008).

Além disso, o consumo de álcool é considerado carcinogênico para as seguintes categorias de câncer: boca, nasofaringe, faringe, orofaringe, laringe, esôfago, cólon e reto, fígado, pâncreas e mama (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012). Neste último, o risco de desenvolvimento já é aumentado com o consumo de apenas uma dose por dia. (SEITZ *et al.*, 2012; REHM e SHIELD, 2013; NELSON *et al.*, 2013).

Apesar de todas essas relações já existentes, uma nova foi observada entre o consumo de álcool e o aumento de infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras

doenças sexualmente transmissíveis (BALIUNAS *et al.*, 2010; HAHN *et al.*, 2011). Alguns estudos detectaram que esta relação provavelmente ocorre devido às mudanças comportamentais ocasionadas pelo álcool, principalmente em relação ao comportamento sexual aumentando assim, o risco da prática de relações sexuais sem o uso de preservativos (REHM *et al.*, 2012).

Já as doenças gastrointestinais possuem uma relação exponencial com o consumo de álcool (REHM *et al.*, 2010), sendo quanto maior o consumo, maior o risco e agravamento do quadro da doença. Nos casos de cirrose hepática e pancreatite aguda ou crônica o consumo ou não de álcool é tão importante para o diagnóstico e tratamento que ambas doenças possuem classificações em subcategorias de “alcoólica” e “não-alcoólica” (IRVING *et al.*, 2009)

O termo Alcoholic Liver Disease (ALD) ou Doença Hepática Alcoólica engloba esteatose alcoólica, com ou sem fibrose significativa (em até 100% de usuários de álcool cuja ingestão seja maior do que 60 g / dia), esteato-hepatite alcoólica (entre 10 e 35%), e cirrose estabelecida em cerca de 15% (NICE Guidelines, 2010). A evolução natural da ALD parece progredir de um fígado normal, através de esteatose à fibrose e cirrose em alguns, porém não todos.

Em indivíduos que fazem uso abusivo do álcool as doenças hepáticas mais encontradas são:

- Esteatose alcoólica (fígado gorduroso). A deposição de gordura ocorre em quase todos os indivíduos que fazem uso abusivo e frequente do álcool. Contudo, é uma condição clínica que também pode ocorrer em indivíduos não alcoolistas, após um único episódio de uso abusivo do álcool. A esteatose corresponde ao primeiro estágio da doença hepática alcoólica. Caso o indivíduo pare de beber neste estágio, ele recuperará sua função hepática. A esteatose também pode ocorrer em indivíduos diabéticos, obesos, com desnutrição proteica severa e usuários de determinados medicamentos (MINCIS e MINCIS, 2010).
- Hepatite alcoólica: esta condição implica em inflamação com ou sem destruição do tecido hepático. Os sintomas incluem: perda de apetite, náusea, vômito, dor abdominal, febre e em alguns casos, confusão mental. Embora esta doença possa levar à morte, na maior parte das vezes ela pode ser revertida com a abstinência alcoólica. A hepatite alcoólica ocorre em aproximadamente 50% dos usuários frequentes do álcool (NIAAA, 1993).
- Cirrose alcoólica: É uma forma avançada de doença hepática decorrente de um dano progressivo das células hepáticas. A cirrose costuma ser diagnosticada em 15 a 30 %

dos usuários crônicos e abusivos do álcool. Um fígado cirrótico é caracterizado por uma fibrose extensa que compromete o funcionamento do fígado podendo inclusive prejudicar o funcionamento de outros órgãos como cérebro e rins. Embora a cirrose alcoólica possa levar o indivíduo à morte em função de suas complicações (ex. falha renal e hipertensão portal), ela pode ser estabilizada pela abstinência completa do álcool (MINCIS e MINCIS, 2010).

Estas três condições clínicas costumam estar sequencialmente relacionadas, de forma progressiva, da esteatose à cirrose. Contudo, alguns indivíduos podem desenvolver cirrose sem ter tido hepatite e algumas hepatites de início súbito e curso rápido levam à morte antes de desenvolver cirrose (MINCIS e MINCIS, 2010).

1.2. RADICAIS LIVRES E DANO OXIDATIVO

As moléculas, orgânicas e inorgânicas, e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, quimicamente muito reativas e com meia-vida curtíssima, embora, a presença dos radicais livres seja crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997).

Os mecanismos celulares de geração de radicais livres ocorrem, regularmente, nas mitocôndrias, membranas e no citoplasma. Tais mecanismos podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (KOURY e DONANGELO, 2003). Entretanto, a mitocôndria, devido a cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (GREEN *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Figura 1). A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo *c* removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O_2 para formar água (KOURY e DONANGELO, 2003). A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio

metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010).

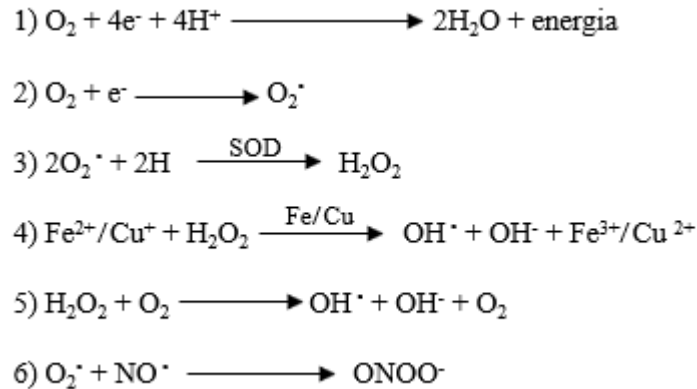


Figura 1. Formação mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS) via cadeia transportadora de elétrons.

Fonte: A autora.

Nota: 1) Redução tetravalente do oxigênio, por meio da qual recebe quatro elétrons (e^-) e quatro íons de hidrogênio (H^+), formando duas moléculas de água e liberando energia. 2) Geração do radical superóxido (O_2^\bullet) pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental. 3) Por meio de um processo denominado dismutação, o radical O_2^\bullet , ao receber íons de hidrogênio, gera peróxido de hidrogênio. Tal reação é catalisada pela superóxido dismutase (SOD). 4) Reação de Fenton: quando o H_2O_2 reage com os íons de ferro ou cobre é gerado o radical hidroxila (OH^\bullet). 5) Reação de Haber-Weiss: os referidos íons também podem catalisar a reação entre H_2O_2 e O_2^\bullet , gerando da mesma forma OH^\bullet . 6) O radical O_2^\bullet pode também reagir com óxido nítrico (NO^\bullet) gerando peroxinitrito (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Em decorrência da redução do O_2 são gerados os radicais superóxido (O_2^\bullet), hidroxila (OH^\bullet) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre, como mostrado na Figura 1 (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de OH^\bullet tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, já que pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares sendo potencialmente tóxico para as células (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Além da capacidade do O_2^\bullet em participar de reações de geração de OH^\bullet , pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico (NO^\bullet), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO^\bullet), também potencialmente reativa (GREEN *et al.*, 2004).

Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os torna potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais

se dá por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração de radical $\text{OH}\cdot$, por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical $\text{O}_2\cdot$, a fim de gerar, da mesma forma, o radical $\text{OH}\cdot$ (KOURY e DONANGELO, 2003).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de reações bioquímicas consequentes da ação das espécies radicalares sobre os ácidos graxos insaturados das membranas celulares resultando na destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos metabólicos de troca e finalmente, morte celular (LIMA e ABDALLA, 2001).

Os radicais que mais afetam os lipídeos são, principalmente, a hidroxila e a hidroperoxila (AYALA, MUÑOZ e ARQUÈLLES, 2014). A LPO talvez seja o evento primário responsável por desencadear sequência de lesões na célula. Por alterar as membranas resultam em problemas de permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outros componentes. E tudo resulta em alterações no ácido desoxirribonucleico (DNA) e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (LIMA e ABDALLA, 2001).

O processo pode ser descrito de maneira geral como o ataque à lipídeos, especialmente ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) por radicais livres, que envolve a retirada de um átomo de hidrogênio de um carbono, com a inserção de um oxigênio, que resulta na geração de radicais peroxilipídicos e hidroperóxido lipídicos (AYALA, MUÑOZ e ARQUÈLLES, 2014).

A LPO é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes (Figura 2), onde L representa o lipídio:

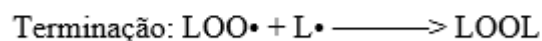
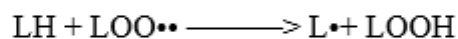
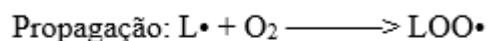
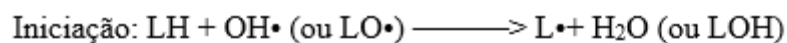


Figura 2. Etapas da lipoperoxidação.

Fonte: Adaptado de Ferreira e Matsubara, 1997.

Na fase de iniciação a hidroxila, por exemplo, sequestra o hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular, com conseqüente formação do radical lipídico (L•). Na primeira fase de propagação, o L• reage rapidamente com o oxigênio, resultando em um radical peroxila (LOO•) que sequestra o hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L•, que continua a reação em cadeia e um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da LPO ocorre apenas quando os radicais (L• e LOO•) propagam-se até a destruição dos mesmos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; AYALA, MUÑOZ e ARQUÈLLES, 2014; LIMA e ABDALLA, 2001).

A LPO pode formar produtos secundários, como aldeídos, durante seu processo. Entre os diferentes aldeídos formados, os principais são o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), sendo o primeiro considerado o mais mutagênico e o segundo, o mais tóxico (AYALA, MUÑOZ e ARQUÈLLES, 2014).

O MDA, como visto anteriormente, é o produto final formado no processo de LPO pelo ataque de espécies reativas de oxigênio e é considerado um marcador deste processo (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Utilizando o MDA como marcador e índice de peroxidação lipídica em indivíduos com doença hepática alcoólica, é possível encontrar uma correlação positiva entre os níveis de MDA e o aumento da gravidade da doença (MASALKAR e ABHANG, 2005).

1.3. SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO

O sistema de defesa antioxidante tem como função a inibição e/ou redução os danos causados pelos efeitos deletérios dos radicais livres e/ou espécies reativas. Estas ações podem ser alcançadas através de diferentes mecanismos de reação, seja impedindo a formação destes radicais (conhecido como sistema de prevenção); ou impedindo a ação destas moléculas (sistemas varredores); e finalmente, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas, conhecido como sistemas de reparo (BARBOSA *et al.*, 2010; KOURY e DONANGELO, 2003; CLARKSON e THOMPSON, 2000). É importante ressaltar que o estresse oxidativo não ocorre com a formação de radicais livres, mas sim de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante.

Este sistema de defesa é dividido em enzimático e não-enzimático, sendo que neste último, é composto por uma variedade de antioxidantes que podem ter origem endógena ou exógena/dietética. Estas substâncias podem agir de duas formas: diretamente, neutralizando a

ação dos radicais livres e espécies não-radicais; ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

1.3.1 Enzimático

Os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (Tabela 1). Estas enzimas atuam como mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicais que estão envolvidos com o início das reações em cadeia que resultam com a propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com danos oxidativos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Tabela 1. Ações e mecanismos de enzimas antioxidantes

Enzima	Ação
SOD	SOD-Cu/Zn (citoplasma) SOD-Mn (mitocôndria). Catalisa a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio.
CAT	Catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.
GPx	Catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água.

Adaptado de Barbosa *et al.*, 2008.

A CAT e GPx possuem um mesmo propósito, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação é de extrema importância, já que o peróxido através das reações de Fenton e Haber-Weiss, resulta na geração do radical OH•, como visto na Figura 1 (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Este mesmo radical (OH•) é considerado como o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade, possuindo uma vida média de 9-10 segundos, sendo dificilmente sequestrado pelos agentes antioxidantes. Devido à estas características a hidroxila é o radical mais propício para a produção de danos oxidativos e é o principal iniciador da peroxidação lipídica que tem como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares. Este mesmo radical ainda tem a capacidade de agir com proteínas realizando a alteração de sua função biológica e estrutura, e ainda pode atacar o DNA (WELCH *et al.*, 2002).

Tendo em vista a potencialidade dos radicais, em especial o $\text{OH}\cdot$, é de extrema importância um equilíbrio entre as enzimas antioxidantes para que a integralidade celular seja mantida. Logo, a GPx deve receber um olhar mais cuidadoso já que a sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutatona, por meio do controle da relação entre glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSH) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004; ROVER JR; HOEHR; VELLASCO, 2001).

É necessário levar em consideração que a atividade das enzimas em questão muitas vezes depende da participação de cofatores enzimáticos, especialmente antioxidantes de origem dietética. Estes cofatores podem diferir de acordo com os compartimentos celulares de ação das enzimas. A SOD, por exemplo, pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês (SOD-Mn). A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; GREEN *et al.*, 2004).

A Figura 3 mostra de maneira integralizada a ação do sistema antioxidante enzimático. Nela, vemos por meio da reação de dismutação, a SOD catalisando a geração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($\text{O}_2\cdot$). A CAT e GPx se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 , sendo que o acúmulo desta espécie reativa possibilita, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração de $\text{OH}\cdot$. A GPx reduz o H_2O_2 a água através da conversão de GSH em GSSH, em uma reação de oxidação que envolve a formação da ligação dissulfeto na forma dimérica oxidada desse peptídeo. Portanto é de extrema importância a ação da glutatona redutase (Grd) na recuperação da GSH, permitindo a manutenção do ciclo redox da glutatona e, conseqüentemente, do equilíbrio do sistema de defesa enzimático.

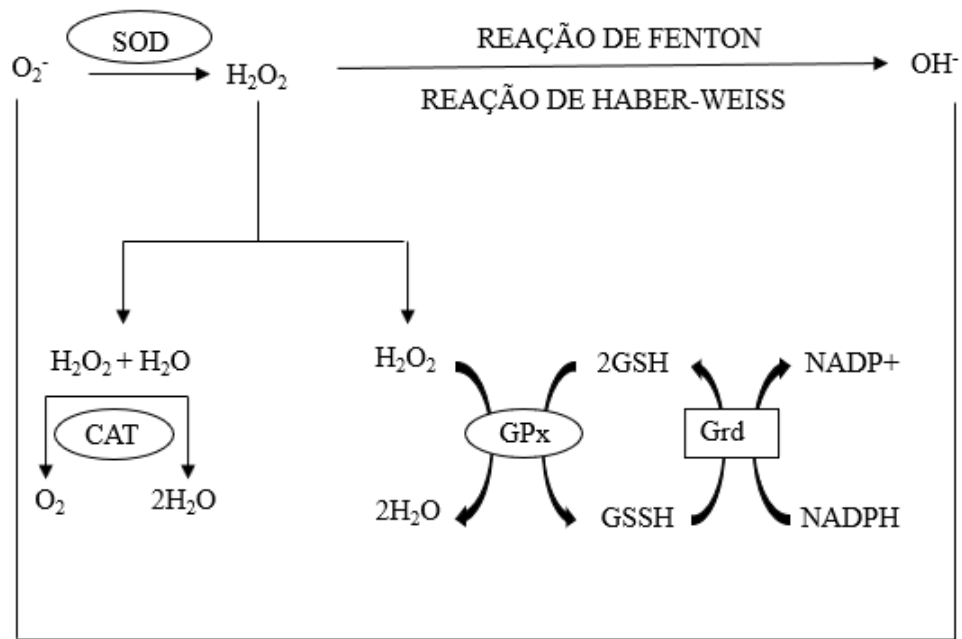


Figura 3. Integração do sistema antioxidante enzimático.

Nota: superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); oxigênio (O_2); radical superóxido (O_2^-); glutatona reduzida (GSH); glutatona oxidada (GSSH); glutatona redutase (Grd); água (H_2O); catalase (CAT); radical hidroxila (OH^-); glutatona peroxidase (GPx); nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, em sua forma oxidada ($NADP^+$); nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, em sua forma reduzida (NADPH).

Fonte: A autora.

1.3.2 Não-enzimático

O sistema antioxidante não-enzimático inclui, principalmente, compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais podemos destacar as vitaminas, minerais e compostos fenólicos (Tabela 2). O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno são compostos potencialmente antioxidantes. Assim como os carotenoides, sem atividade de vitamina A, como licopeno, luteína e zeaxantina. Já entre os minerais podemos destacar o zinco, selênio, cobre e magnésio (KRUGER *et al.*, 2015).

Tabela 2. Ações e mecanismos de compostos antioxidantes não-enzimáticos.

Antioxidante	Ação
Vitamina A	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA
Vitamina C	Redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em meio hidrofílico
Vitamina E	Proteção contra a peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana celular. Converte $O_2\bullet$ e H_2O_2 em espécies menos reativas
Cobre, zinco, magnésio e selênio	Cofatores de enzimas antioxidantes
Outros carotenoides	Proteção contra a oxidação de lipídeos
Fitoquímicos	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA

Adaptado de Barbosa *et al.*, 2008.

A vitamina C é um composto removedor de oxigênio que atua capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-o, conseqüentemente, indisponível para atuar como propagador da autooxidação (RAMALHO e JORGE, 2006). Além disso, tem o alto poder antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (OMONI e ALUKO, 2005; VALKO *et al.*, 2004).

Vitamina E, na sua forma ativa α -tocoferol, é encontrada em lipoproteínas e membranas, atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica, através do sequestro do radical peroxila (SOUSA *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos agem neutralizando ou sequestrando radicais livres e quelando metais de transição. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. A capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos (SOARES, 2002).

O mecanismo pelo qual os carotenóides protegem os sistemas biológicos dos radicais livres depende da transferência de energia do oxigênio excitado para a molécula do carotenóide (SOUSA *et al.*, 2007). Os carotenóides reagem principalmente com os radicais peróxidos e com o oxigênio molecular. Carotenóides como o β -caroteno e o licopeno,

exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoproteicas (SHAMI e MOREIRA, 2004), apesar de que já foi visto que o β -caroteno pode agir como pró-oxidante quando administrado com etanol (PORTARI *et al.*, 2003).

Usualmente, os estudos voltados à ação de compostos antioxidantes são limitados à avaliação de nutrientes e/ou alimentos isolados. Fato que resulta em uma limitação metodológica, uma vez que não é levado em consideração a interação entre os nutrientes e alimentos que podem atuar de forma sinérgica na proteção contra os danos oxidativos. Logo, é possível que ocorram erros na interpretação dos resultados referentes ao potencial antioxidante do composto estudado (BARBOSA *et al.*, 2010).

Para avaliar o potencial antioxidante *in vivo* dos compostos não-enzimáticos é necessário entender que sua ação depende de algumas variáveis, como: absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas; concentração plasmática ideal para desempenhar sua atividade antioxidante; tipos de radicais livres gerados no processo oxidativo; em qual compartimento celular foram gerados e como foram gerados (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Portanto, a ação de um composto antioxidante pode variar de acordo com o compartimento celular ou tecido no qual atua. Por exemplo, a vitamina C apresenta atividade antioxidante contra radicais livres gerados em meio hidrofílico. Em contrapartida, esta vitamina pode não ser capaz de inibir os radicais livres que propagam as reações de peroxidação lipídica em meios lipofílicos. Já os flavonóides possuem ação antioxidante em ambos os compartimentos celulares, lipofílico e hidrofílico (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

No estudo de Huang *et al.* (2002) a vitamina C foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante total do soro, fato que não ocorreu com a vitamina E. Os autores ressaltam que esse resultado reflete o fato de a vitamina C, ao contrário da E, possuir um melhor desempenho antioxidante em um ambiente hidrofílico.

1.4. METABOLISMO E HEPATOTOXICIDADE DO ETANOL

Os efeitos do álcool sobre o estresse oxidativo podem ser diretos ou ainda mediados por seus metabólitos secundários, sendo marcante sua atuação sobre a redução dos níveis plasmáticos ou séricos dos antioxidantes dietéticos, entre eles: α -tocoferol, ácido ascórbico e selênio (BARBOSA *et al.*, 2010).

Por ser uma substância solúvel em água e lipídios, o etanol pode difundir-se rapidamente através da membrana mucosa do esôfago e estômago. Depois de sua absorção o etanol aparece tanto no ar expirado como na urina, ele não é armazenado no corpo, logo qualquer quantidade ingerida será oxidada, sendo metabolizado completamente no fígado. (ANTIA e ABRAHAM, 1997; EASTWOOD e PASSMORE, 1986).

Na presença de intoxicação por etanol, os sistemas de oxidação do etanol são grandes fontes geradoras de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (ALBANO, 2006).

De maneira resumida, o hepatócito conta com três vias para a metabolização do etanol (Figura 4) que estão localizadas em diferentes compartimentos intracelulares: álcool desidrogenase (ADH) no citosol, citocromo P450 na mitocôndria e catalase nos peroxissomas (LIEBER, 2005; BANSAL et al., 2010). Cada uma destas vias poderia produzir radicais livres que afetam o sistema antioxidante e resultam na produção de acetaldeído. A via clássica do metabolismo do etanol, que é catalisada pela álcool desidrogenase para formar acetaldeído resulta na formação de radicais livres (SETSHEDI, WANDS e MONTE, 2010).

Quando consumido de forma moderada a maior parte do etanol é metabolizado pela álcool desidrogenase no fígado, já a via do citocromo P450 2E1 é induzida quando há consumo de álcool crônico, logo, este mecanismo se torna cada vez mais importante conforme o aumento do abuso de consumo alcoólico.

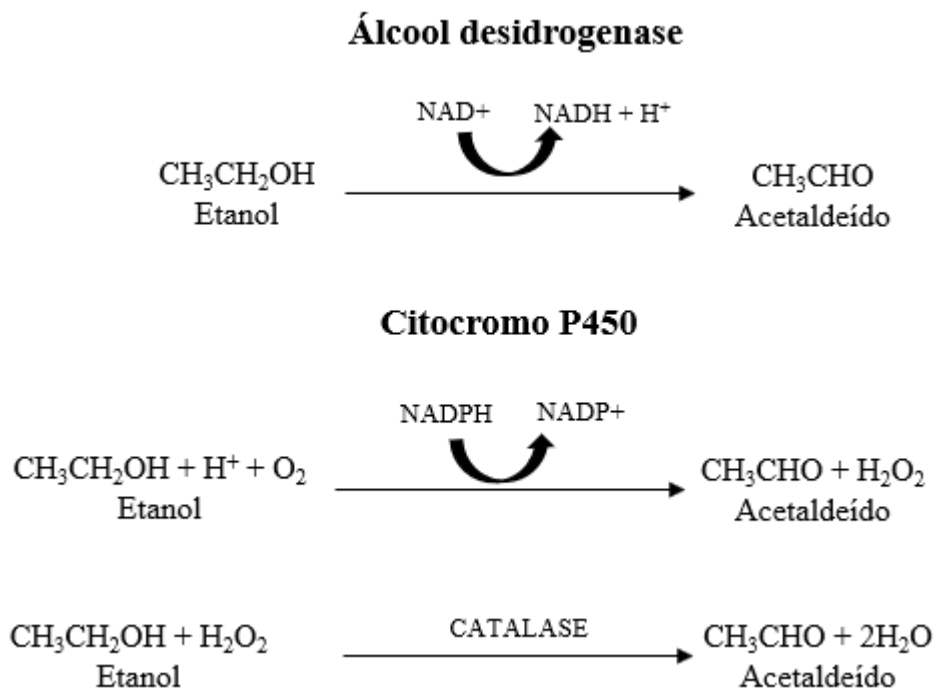


Figura 4. Vias de oxidação do etanol no hepatócito (Fonte: A autora).

Em adição a esta reação mitocondrial, o citocromo 2E1 (CYP2E1) também pode ser um catalizador para formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente nas formas de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxietila (CUNNINGHAM e BAILEY, 2001). Essas moléculas são altamente reativas, e como o acetaldeído, atacam macromoléculas ocasionando comprometimento ou perda funcional podendo resultar em até morte celular (PATEL *et al.*, 2005; PORTARI *et al.*, 2008).

Como visto na Figura 4, quando o etanol é oxidado a acetaldeído pela ADH, é gerada uma produção excessiva de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH), já que a nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada (NAD⁺) é reduzido a NADH durante a reação (Figura 5). Logo, a proporção de NADH / NAD⁺ se torna elevada no hepatócito, mais precisamente no citosol, gerando alterações metabólicas que incluem, por exemplo, a inibição do ciclo do ácido cítrico e da oxidação de ácidos graxos (LIEBER 2005; DAS e VASUDEVAN, 2007).

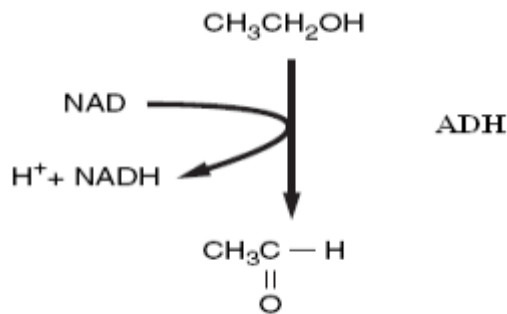


Figura 5. Reação de oxidação do etanol pela ADH (Adaptado Gramenzi *et al.*, 2006).

Os efeitos deletérios do etanol são atribuídos à indução destes processos metabólicos, que resultam no aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio (BRADFORD *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2005; STEWART *et al.*, 2004). Logo, o estresse oxidativo é um elemento essencial para o avanço da doença hepática alcoólica, pois desempenha um papel crítico no dano hepático além de gerar ROS em decorrência do metabolismo do etanol que oxidam estruturas, causam peroxidação lipídica e modificação de proteína podendo chegar ao ponto de causar dano ao DNA (DAS e VASUDEVAN, 2007).

Estudos sugeriram que o metabolismo do etanol além de estar diretamente relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, também está envolvido na depleção dos componentes do sistema antioxidante e aumento nos níveis de marcadores específicos, sobretudo malondialdeído (DAS e VASUDEVAN, 2007; LECOMTE *et al.*, 1994).

Huang et al. (2009), ratificaram o efeito do álcool sobre o estresse oxidativo, analisando em 76 indivíduos alcoólatras, marcadores específicos. Tal análise, quando comparada a do grupo controle (19 indivíduos saudáveis, não bebedores), mostrou níveis séricos significativamente maiores de malondialdeído, e menor atividade da superóxido dismutase.

O etanol ministrado de forma aguda em altas doses também aumenta a permeabilidade intestinal resultando em sensibilização da mucosa até endotoxemia (QU *et al.*, 2015) através de mecanismos dependentes de estresse oxidativo (YAMASHINA *et al.*, 2005). O estresse oxidativo contribui para dano hepatocelular e estimula a deposição de colágeno pelas células hepáticas estreladas (ZIMA *et al.*, 2005).

1.5. BENFOTIAMINA E ÁCIDO ALFA LIPÓICO

Em 1965, o Comitê de Pesquisa em Vitamina B no Japão forneceu informações detalhas sobre a história do beribéri, e agora já temos o conhecimento de que é causado pela deficiência de tiamina. A doença é conhecida desde a antiguidade e seu nome original era “*kakke*” e seus registros podem ser encontrados desde o ano de 808. O percentual da mortalidade da população japonesa declinou de 30% em 1920, para 0,5% em 1969 após a descoberta da etiologia da deficiência de tiamina (LONSDALE, 2006).

Com o passar do tempo, gradualmente ficou evidente que a ingestão de arroz polido causava beribéri, mas que a ingestão de gérmen ou farelo de arroz, cevada e feijão vermelho, mesmo se ingerido com o arroz polido, prevenia a doença. Funk e Cooper isolaram uma substância do resíduo do polimento do arroz e chamaram de “vitamina”, logo, com mais descobertas, esta substância foi chamada de tiamina (LONSDALE, 2006).

O alcoolismo é geralmente associado a uma séria deficiência de nutrientes e vitaminas (MANZARDO *et al.*, 2013). Os péssimos hábitos alimentares de indivíduos alcoólatras são compostos da combinação dos efeitos do álcool na absorção de nutrientes e a ingestão dos mesmo. (LIEBER, 2003).

Considerando que a ingestão inadequada é a principal causa de deficiência da tiamina nos países subdesenvolvidos, na maioria dos países do mundo existe uma relação estreita entre alcoolismo e síndrome de Wernicke-Korsakoff, sendo que esta relação o alcoolismo, que representa mais de 95% dos casos (THOMSON, 2000). Carl Wernicke descreveu pela primeira vez a desordem em 1881 em três casos, sendo dois associados à dependência crônica de álcool e um com vômitos persistentes após o envenenamento por ácido sulfúrico. Os sintomas que ele registrou incluíram distúrbios do movimento do olho, ataxia da marcha,

polineuropatia e alterações mentais, incluindo apatia, diminuição do tempo de atenção e tempo e espaço de desorientação (DAY *et al.*, 2004).

O trabalho de Alexander (1939) e, em seguida, Jolliffe (1941) estabeleceu o papel da deficiência de tiamina na causa e tratamento distúrbio. Sergei Korsakoff deu o primeiro relato abrangente da síndrome agora conhecida como psicose de Korsakoff em 1887. Ele descreveu uma série de características, incluindo delírio, mas a desordem passou a ser caracterizada por perda de memória recente, mas com relativa preservação de outras funções intelectuais. Os dois distúrbios foram reunidos por Victor e colaboradores em 1971 (DAY *et al.*, 2004).

Distúrbios neurológicos, e em especial a neuropatia diabética, têm sido tratados com vitamina B1, entretanto, a biodisponibilidade da administração oral de sais de tiamina hidrofílicos é baixa comparado à análogos lipofílicos (PORTARI, VANNUCCHI e JORDÃO JR; 2013).

Sabe-se que a tiamina livre é transportada através do plasma por transportadores de alta afinidade, mas a taxa de transporte é geralmente lenta. Por essa razão, uma variedade de derivados lipofílicos de tiamina foi sintetizada. Estes compostos podem facilmente difundir através do plasma membranas, evitando assim o sistema de transporte de necessário para tiamina livre. Uma vez incorporada as células, esses derivados lipofílicos podem ser rapidamente convertidos a tiamina através de processos enzimáticos ou não enzimáticos (VOLVERT *et al.*, 2008).

O primeiro derivado lipofílico de tiamina foi extraído de alho no início de 1950. Desde então, vários análogos desta molécula foram sintetizados com a esperança de que eles seriam melhores absorvidos e tivessem uma biodisponibilidade maior do que cloridrato ou mononitrato de tiamina. Esses dissulfetos lipofílicos são referidos como "alitiminas" (VOLVERT *et al.*, 2008).

Em 1954, Fujiwara descobriu um grupo de derivados de tiamina lipossolúveis, dentre eles, benfotiamina (S-benzoiltiamina monofosfato) é a mais efetiva e segura para uso, sua administração oral eleva os níveis de tiamina no sangue e em tecidos de forma mais eficaz do que os derivados solúveis. Isso acontece porque a benfotiamina é primeiramente desfosforilada nas vilosidades do intestino por uma fosfatase alcalina extracelular gerando um composto mais lipossolúvel, a S-benzoiltiamina, que se difunde facilmente pelas membranas das células intestinais e endoteliais e entra na circulação mesentérica sendo capturada pelo fígado, no qual é hidrolisada em tiamina por tioesterases dos hepatócitos (VOLVERT *et al.*, 2008).

As doses administradas variam de 300-450mg por dia, dividida em mais de uma dose. Também foram mostrados efeitos benéficos em estágios finais de doença renal e neuropatia alcoólica (ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW, 2006). E já foi demonstrado que a benfotiamina diminui danos oxidativos ao DNA induzido por agente mutagênico (4-nitroquinoline1-oxide- NQO), o que sugere uma ação antioxidante da benfotiamina (SCHMID *et al.*, 2008).

O uso da benfotiamina é mais indicado devido a sua melhor biodisponibilidade como antioxidante em comparação com a tiamina na forma de hidrocloreto, exercendo assim, um papel fundamental na preservação do sistema antioxidante hepático quando o mesmo sofre os efeitos da administração aguda de etanol similar à um “binge” alcoólico (PORTARI *et al.*, 2008).

A vitamina B1 (tiamina) é uma vitamina sulfurada solúvel em água que tem um papel essencial no metabolismo energético no ciclo da ácido tricarboxílico, atuando como coenzima para: a transcetolase, o α -cetoglutarato desidrogenase na mitocôndria e piruvato desidrogenase, que fazem parte do complexo multienzimático do ciclo do ácido cítrico (DEPEINT *et al.*, 2006a).

Como visto em parágrafos anteriores, a deficiência de tiamina é frequentemente relacionada ao consumo crônico de álcool. As circunstâncias que podem ser responsáveis por esta associação são: ingestão insuficiente de tiamina, diminuição da formação da coenzima ativa, redução dos estoques hepáticos e inibição do transporte intestinal de tiamina devido ao álcool (NETZEL *et al.*, 2000).

Trabalhos prévios mostraram que a tiamina (na forma de benfotiamina ou tiamina pirofosfato) teve um impacto positivo sobre a redução do dano oxidativo e/ ou sobre o aumento da atividade enzimática do sistema antioxidante (YILMAZ *et al.*, 2015; PORTARI *et al.*, 2016; MANZARDO *et al.*, 2013).

Além disso a tiamina (vitamina B1) tem papel chave no metabolismo dos carboidratos e é depletada pelo metabolismo do álcool, sendo interessante sua suplementação em quadros de ingestão crônica de etanol (PORTARI *et al.*, 2013; MARTIN *et al.*, 2003).

Para aumentar a formação de antioxidantes e os níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH, em sua forma reduzida), a tiamina usa a via da pentose fosfato. A forma ativa da tiamina é a pirofosfato que como cofator é essencial para a atividade da transcetolase no citosol e a piruvato desidrogenase, além de também ser cofator para uma série de desidrogenases: mitocondrial, α -cetoglutarato e cetoácidos de cadeia ramificada (YILMAZ *et al.*, 2015; DEPEINT *et al.*, 2006b).

A tiamina pirofosfato catalisa a descarboxilação oxidativa de α -cetoácidos liberando CO_2 . Estes cetoácidos incluem piruvato, α -cetogluturato e metabólitos de aminoácidos de cadeia ramificada, entre outros. Estes três complexos enzimáticos possuem estrutura e mecanismos similares. No processo, NAD^+ é convertido em NADH que pode ser reoxidado a NAD^+ pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria gerando três moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para cada NADH formado (DEPEINT *et al.*, 2006b).

Em adição, a tiamina pirofosfato também é cofator da transcetolase, uma enzima presente no citosol que catalisa a duas reações da via da pentose fosfato que possui um papel importante na produção de NADPH para manutenção do estado redox celular e níveis de glutatona (DEPEINT *et al.*, 2006b).

No trabalho de Mehta, Dedina e O'Brien (2011), a tiamina também diminuiu a toxicidade mitocondrial em hepatócitos que provavelmente estava conectada ao seu papel como coenzima mitocondrial para a piruvato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase, sendo que ambos podem terem sido desativadas pelas ROS (DEPEINT *et al.*, 2006b).

Em um modelo animal de intoxicação alcoólica aguda, suplementação de tiamina impediu alterações nos parâmetros relacionados à peroxidação lipídica, possivelmente devido à interação e regeneração da glutatona (PORTARI *et al.*, 2008). Além disso, a suplementação de tiamina foi eficaz no tratamento da hepato e neurotoxicidade em dois estudos, em que a intoxicação por etanol foi induzida por 90 dias de administração de álcool, seguido de 30 dias de abstinência e tratamento antioxidante (VIDHYA, RENJUGOPAL, INDIRA, 2013; AMBADATH, VENU, MADAMBATH, 2010).

O ácido alfa-lipóico (ALA) é um composto dissulfeto de oito carbonos que desempenha um papel metabólico como cofator do complexo da piruvato desidrogenase, além disso, é um poderoso antioxidante (KAYA-DAGISTANLI *et al.*, 2013). É sintetizado por plantas e animais e metabolizado primeiramente no fígado através da oxidação mitocondrial. ALA age como cofator de enzimas mitocondriais chaves que controlam a oxidação da glicose.

O ALA extingue uma série de ROS, quela metais de transição e previne peroxidação lipídica da membrana e dano proteico através de suas interações com a vitamina C e a glutatona. Também participa da reciclagem das vitaminas C e E, e aumenta os níveis de glutatona, além de poder passar a barreira hematoencefálica e ser capaz de reduzir o estresse oxidativo no cérebro através da redução dos níveis de peróxido de hidrogênio pela glutatona peroxidase (PEANA *et al.*, 2013).

Além disso, a ação benéfica do ALA pode ser resultado de sua capacidade de reduzir NADPH , restaurar o conteúdo de GSH/GSSH e aumenta a expressão mitocondrial de enzimas

antioxidantes chave, como a glutatona redutase. ALA tem uma atividade única como antioxidante pois é um antioxidante direto para a extinção de ROS em sua forma oxidada e reduzida, além de ser solúvel em água e lipídeos, portanto, possui ação antioxidante no citosol, assim como na membrana plasmática, soro e lipoproteínas, em contraste com a vitamina C, que é hidrofílica, e a vitamina E, que é hidrofóbica. ALA pode eliminar os radicais hidroxila, ácido hipocloroso e oxigênio singlete, e sua forma reduzida ácido dihidrolipóico (DHLA) elimina os radicais superóxido e os radicais peroxil, impedindo assim a peroxidação mediada por radicais livres das proteínas, e ainda tem a propriedade salubre de neutralizar os radicais livres sem se envolver no processo (GORACA *et al.*, 2011; MOINI, PACKER e SARIS, 2002).

ALA e DHLA têm sido considerados antioxidantes universais que agem tanto na fase aquosa quanto na membrana, e agem em sinergia com outros antioxidantes (como glutatona, vitamina C e vitamina E), e têm a capacidade de reciclar outros antioxidantes como ácido ascórbico e vitamina E (SILVA; PORTARI e VANNUCCHI, 2016).

Ambos têm propriedades universais, entre elas está incluso a capacidade de extinguir uma variedade de espécies reativas de oxigênio, inibir compostos geradores destas espécies e poupar outros antioxidantes (PACKER; WITT e TRITSCHLER, 1995). Além disso, o ALA também pode melhorar o estado do estresse oxidativo na célula através da eliminação de radicais livres, do bloqueio de dano ao DNA induzido pelo oxigênio singlete, do aumento dos níveis intracelulares de glutatona e da redução dos peróxidos lipídicos (TIBULLO *et al.*, 2017).

Já foi demonstrado que ALA tem efeitos benéficos em pacientes com estágio avançado de câncer devido ao aumento da atividade da glutatona peroxidase e diminuição do estresse oxidativo (MANTOVANI *et al.*, 2003). ALA é também utilizado como agente terapêutico em outras variadas condições relacionadas à doença hepática, incluindo danos ocasionados pelo álcool, danos ocasionados ao fígado por uma dieta rica em ácido graxos ômega-6, envenenamento por cogumelos e metais pesados (BUSTAMANTE *et al.*, 1998; GORACA *et al.*, 2011; KAYA-DAGISTANLI, *et al.*, 2013).

O ALA pode ser eficiente na prevenção do desenvolvimento de esteatose hepática e fibrose hepática (MIN *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2008). Também é usado para o tratamento de neuropatias diabéticas e doenças hepáticas (BUSTAMANTE *et al.*, 1998; STEVENS *et al.*, 2000; GORACA *et al.*, 2011).

No trabalho de Pari e Murugavel (2004) o tratamento com ácido α -lipóico e silimarina

mostrou um efeito protetor significativo, mantendo os níveis de antioxidantes não enzimáticos. Sugerindo até que sua associação com outro antioxidante foi capaz de fornecer proteção ao preservar a integridade da estrutura da membrana hepatocelular contra um agente oxidante e iniciador da peroxidação lipídica.

Também já foi mostrado em outro estudo mais recente o efeito sinérgico do ALA. Foi observado que a suplementação combinada de ALA associado ao exercício aeróbico aumentou os níveis de vitamina E que indica um efeito sinérgico da substância. A relativamente alta concentração de vitamina E no músculo esquelético foi devido à supressão do consumo de vitamina E por causa da eliminação de ROS realizada pelo ALA (CHAE, SHIN e KIM, 2008)

Em relação à segurança do uso oral de ALA, um estudo conduzido em ratos por dois anos, mostra o Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) de 60mg/kg/dia (CREMER *et al.*, 2006), que é um valor semelhante e compatível os valores encontrados por outros estudos feitos com ratos, com a duração do período experimental variando entre 28 dias e seis meses (CREMER *et al.*, 2006; FUKU *et al.*, 1972).

A possibilidade do uso combinado das substâncias citadas acima (benfotiamina e ácido alfa lipóico), com efeito benéfico em modelos experimentais de alcoolismo e tratamento com antioxidantes quando utilizadas separadamente, merecem uma investigação mais profunda a fim de encontrar dados mais conclusivos sobre sua utilização combinada.

A hipótese deste estudo é que a benfotiamina e o ácido alfa lipóico atuem como antioxidantes, de forma mais potente e eficaz quando combinados, auxiliando o sistema antioxidante hepático a combater os danos causados pelo consumo crônico de etanol.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar a associação da benfotiamina com o ácido alfa lipóico como tratamento aos danos hepáticos provocados pela ingestão crônica de etanol em modelo experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo através de marcador próprio;
- Verificar alterações na atividade enzimática da superóxido dismutase;
- Verificar alterações na atividade enzimática da catalase;
- Avaliar os níveis hepáticos de tióis não-proteicos
- Avaliar os níveis hepáticos de vitamina E.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram iniciados somente após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEUA/UFTM) sob protocolo de número 401 (Anexo A), por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Neste experimento todos os animais foram tratados de maneira adequada, evitando situações que gerassem desconforto, angústia e dor. Esses princípios foram empregados durante todo o experimento incluindo o processo de eutanásia. O alojamento proporcionou condições de vida adequadas às espécies, contribuindo para sua saúde e conforto. Seguindo todas as especificações da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008.

3.2 MATERIAL

Foram usados 32 ratos machos (BYKOV; JARVELAINEN, H.; LINDROS, 2003; SEGAWA *et al.*, 2008) sadios e recém-desmamados da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso entre 60-90g, procedentes do biotério geral da USP-RP (Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto) (Anexo B). Durante o período de experimentação, os animais foram mantidos em gaiolas semi-metabólicas, com um animal por gaiola, em ambiente silencioso com temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), foto-período artificial e automático de 12/12 horas tendo livre acesso à água e ao alimento.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Adaptação

Duração: 1 semana

Logo após o recebimento, os animais foram mantidos sob observação durante 7 dias para adaptação ao novo ambiente. O propósito da adaptação foi reduzir o estresse do animal de maneira que não interferisse no seu consumo de ração e água.

3.3.2 Experimentação

Duração: 47 dias

Os 32 ratos machos e sadios ficaram 7 dias em adaptação recebendo ração do biotério (AIN-93) e um período de 3 dias de adaptação à dieta líquida com etanol (Tabela 3) de Lieber

e DeCarli (1989), sendo que o etanol foi gradativamente introduzido na seguinte proporção: no primeiro dia a dieta continha 10% de calorias provenientes do etanol, no segundo dia 25% e no terceiro dia 35,5% (WIESER *et al.*, 2016). Após 30 dias, os animais foram divididos em 4 grupos, com 8 animais cada, sendo que o grupo EB (Etanol + Benfotiamina), EA (Etanol + ALA) e EAB (Etanol + ALA + Benfotiamina) tiveram suas dietas suplementadas com benfotiamina (100mg/L de dieta) e/ou ácido alfa-lipóico (500mg/L de dieta) (KOWLURU e ODENBACH, 2004; SUDESH *et al.*, 2000):

Grupo Etanol (E): Dieta controle contendo etanol (35,5% em relação ao valor calórico total);

Grupo Etanol + Benfotiamina (EB): Dieta contendo etanol (35,5% em relação ao valor calórico total) suplementada com benfotiamina (100mg/L de dieta);

Grupo Etanol + ALA (EA): Dieta contendo etanol (35,5% em relação ao valor calórico total) suplementada com ácido alfa-lipóico (500mg/L de dieta);

Grupo Etanol + ALA + Benfotiamina (EAB): Dieta contendo etanol (35,5% em relação ao valor calórico total) suplementada com benfotiamina (100mg/L de dieta); e ácido alfa-lipóico (500mg/L de dieta).

Os animais do grupo E serviram como controle para o desenvolvimento da doença hepática alcoólica e os animais dos grupos EB, EA e EAB receberam a dieta suplementada por 14 dias como forma de tratamento para a doença hepática alcoólica, sendo importante ressaltar que todas as dietas foram ofertadas *ad libitum*.

Tabela 3. Composição da dieta líquida de Lieber e DeCarli (1989) para 1kg de dieta

Ingredientes	Gramas	Kcal	Etanol	PTN (g)	CHO (g)	LIP (g)
Amido de Milho	16	56,2	0	0,1	13,9	0
Caseína (equivalente a 89,57% de proteína)	49,24	176,4	0	44,1	0	0
Cistina	0,5	2	0	0,5	0	0
Metionina	0,3	1,2	0	0,3	0	0
Sacarose	10,53	42,1	0	0	10,5	0
Celulose	10	0	0	0	0	0
Óleo de soja	38,89	350	0	0	0	38,89
Mistura Mineral	8,75	7,4	0	0	1,8	0
Mistura Vitamínica	2,5	9,8	0	0	2,4	0
Bitartarato de colina	0,25	0	0	0	0	0
Sorbato de Potássio	3,5	0	0	0	0	0
Etanol	50	355	50	0	0	0
TOTAL		1000	50	45	28,8	38,9
			35,5%	18%	11,5%	35%

Kcal: quilocaloria; PTN: proteína; CHO: carboidrato; LIP: lipídeos.

Durante toda fase de experimentação (47 dias) foi realizada a aferição do volume do bebedouro uma vez por dia para avaliar a quantidade de dieta ingerida e por consequência a quantidade de suplementação consumida, já a pesagem dos animais foi realizada uma vez por semana.

3.3.3 Eutanásia e coleta de amostras

No final da fase de experimentação os animais foram anestesiados com quetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg) e eutanasiados através de exsanguinação por punção cardíaca e laparotomizados para coleta do fígado. O mesmo foi prontamente pesado em balança analítica e após anotar as alíquotas foi imerso em nitrogênio líquido para congelamento instantâneo e posterior armazenamento em freezer a -20°C.

Após a coleta foram analisados: atividade hepática da catalase (CAT), atividade hepática da superóxido dismutase (SOD), tióis não protéicos, malondialdeído (MDA), níveis hepáticos de vitamina E.

3.3.4 Delineamento Experimental

O delineamento experimental é representado na Figura 6.

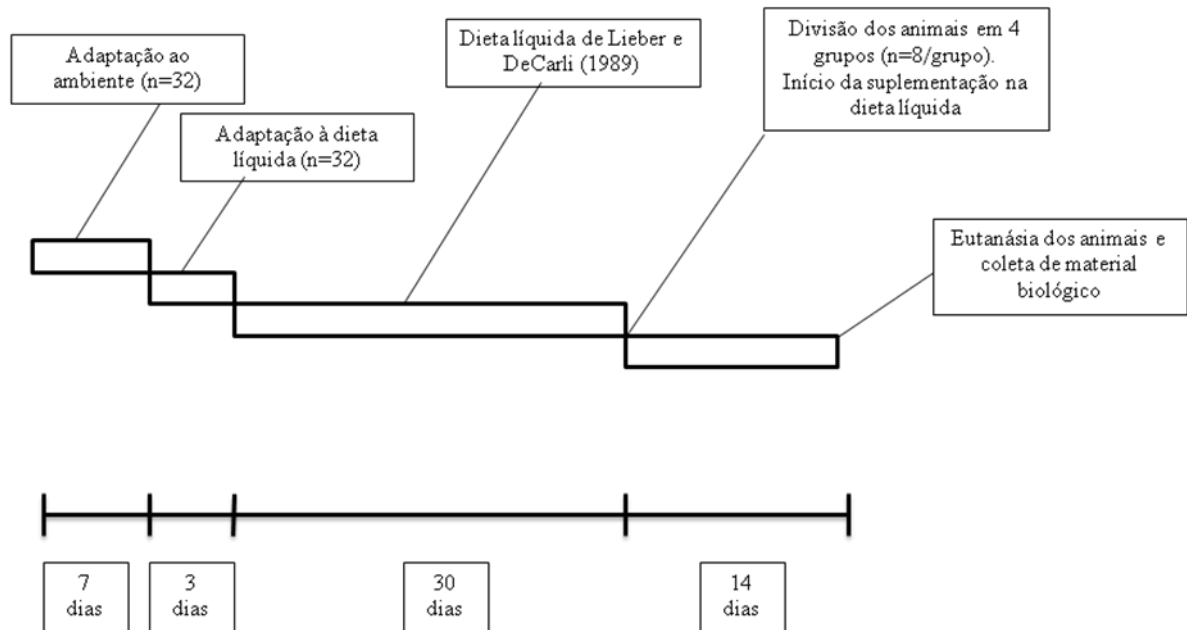


Figura 6. Delineamento experimental

3.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.4.1 Determinação de malondialdeído (MDA)

O fígado foi homogeneizado em cloreto de potássio 1,15% (KCl) e a determinação de MDA foi feita segundo o método de Tatum, Changchit e Chow (1990) que consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o aduto TBA-MDA extraído com isobutanol e identificado através de detector fluorimétrico na cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A fase móvel consistiu em tampão fosfato 50mM, metanol e acetonitrila (72:17:11) e os parâmetros de detecção foram 515nm (excitação) e 550nm (emissão).

3.4.2 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A amostra de fígado foi homogeneizada sob banho de gelo com tampão fosfato 50mM pH 7,0 em proporção de 1:40. A atividade da catalase foi determinada seguindo o método de Aebi (1984) o qual se baseia no acompanhamento da decomposição de H_2O_2 , determinada espectrofotometricamente a 240nm e tendo a absorvência registrada no tempo de 30 segundos. O meio de reação foi composto de 2000 μ L de homogenato hepático sendo que a reação foi

iniciada com adição de 1000 µL de H₂O₂ 30mM. Os valores foram expressos em U/ mg de proteína (Ptn).

3.4.3 Determinação da atividade da SOD

A atividade da SOD foi avaliada utilizando o método de inibição da autooxidação de pirogalol (MARKLUND e MARKLUND, 1974). A reação foi realizada em tampão Tris-Cl 50 mM/EDTA 1 mM pH 8,2. 1 mL de tampão foi adicionado a 50 µL de homogenato. Em seguida foi adicionado 1 mL de 0,2 mM de pirogalol/tampão potássio- fosfato 50 mM pH 6,5. A alteração dos valores de absorvência da solução foi observada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nm.

Para calcular a porcentagem de inibição da auto-oxidação de pirogalol foi usada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição da autooxidação do pirogalol} = \frac{(\Delta A_{\max})}{(\Delta A)} \times 100$$

Na fórmula, ΔA representa a alteração da absorvência da autooxidação do pirogalol no teste da amostra e ΔA_{\max} a alteração da absorvência da autooxidação do pirogalol no controle, onde o homogenato foi substituído por água destilada.

Logo, uma unidade de atividade de SOD representa a quantidade necessária para inibir a autooxidação de pirogalol em 50% por minuto. Os valores foram expressos em U/ mg de proteína (Ptn)

3.4.4 Determinação de tióis não proteicos

Os tióis não proteicos equivalem principalmente aos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A análise foi realizada por método colorimétrico que consiste na reação do grupo sulfidríla. O tecido foi homogeneizado com tampão EDTA 0,02M. Foram adicionados a 5mL de homogenato, 4mL de água destilada e 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Após 15 minutos de espera, a mistura foi centrifugada a 3000g por 15 minutos. Foram retirados 2mL do sobrenadante e misturados com 4 mL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 0,1 mL de ácido 5,5'-ditiobis-2- nitro-benzoico (DTNB). Posteriormente a mistura foi submetida à leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 412nm. A concentração foi calculada utilizando-se coeficiente de extinção molar de 13100 M.cm⁻¹ (SEDLAK; LINDSAY, 1968). As concentrações de tióis não protéicos foram representadas em relação à concentração de proteínas totais no tecido.

3.4.5 Determinação de vitamina E

A vitamina E também foi determinada através do HPLC, seguindo o método de Arnaud et al. (1991) com adaptações. Os fígados foram homogeneizados com água destilada e padrão interno (acetato de tocoferol 5mM) e adicionados de etanol e hexano. A mistura foi centrifugada e a fase superior foi extraída e secada com nitrogênio gasoso.

Em seguida, foi suspensa em fase móvel (acetonitrila /metanol/diclorometano; 65:10:25) e injetada para detecção a 292nm. Os resultados foram expressos em micromol por miligrama de massa fresca (MF).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados em planilhas e analisados utilizando as ferramentas estatísticas do software Graphpad Prism 6. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Previamente à aplicação dos testes estatísticos apropriados para a comparação entre os grupos experimentais, a normalidade da distribuição amostral e a homogeneidade da variância foram avaliadas pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e de *Bartlett*, respectivamente.

Os dados encontrados foram paramétricos para todos os parâmetros testados. Para avaliar a evolução ponderal e a progressão do consumo de dieta conforme as semanas no período experimental, foi utilizado teste ANOVA *two way* de medidas repetidas. Os demais dados foram comparados por ANOVA one-way utilizando-se do teste post hoc de *Tukey*. Os níveis de significância adotados foram de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

A evolução do peso dos animais durante período experimental está representada na Figura 7. Não foi observada diferença no ganho de peso entre os grupos ($p>0,05$).

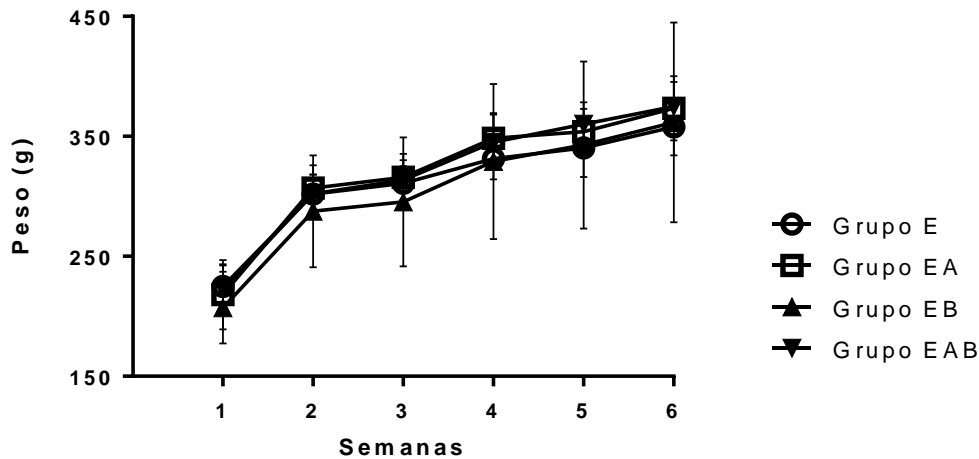


Figura 7. Ganho de peso médio (em gramas) dos animais (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina) durante período experimental ($p>0,05$).

A curva de ingestão semanal da dieta líquida nos grupos de animais está representada na Figura 8. Não foi observada diferença na ingestão entre os grupos durante as semanas ($p>0,05$). Também não ocorreram diferenças na ingestão semanal de etanol (Figura 9).

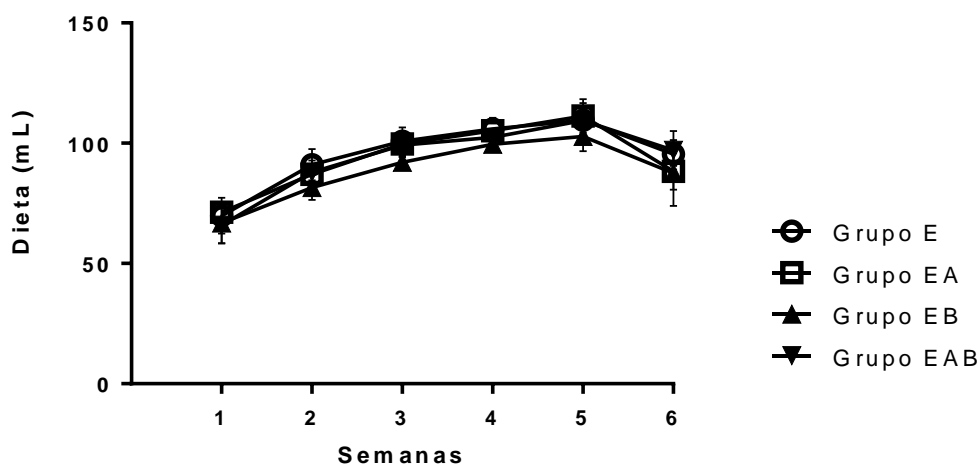


Figura 8. Ingestão semanal média de dieta líquida (mL) nos grupos (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina) durante período experimental ($p>0,05$).

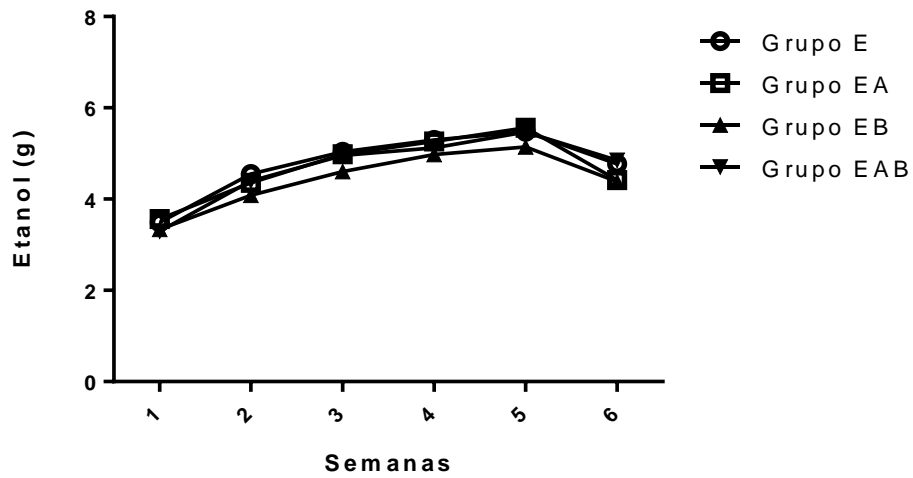


Figura 9. Ingestão semanal média de etanol (g) nos grupos (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina) durante período experimental ($p > 0,05$).

A concentração de MDA (Figura 10) foi menor no grupo EAB ($6,35 \pm 1,21$ nmol.mgPtn⁻¹) em relação ao controle E ($10,06 \pm 1,88$ nmol.mgPtn⁻¹). Os valores do grupo EAB também foram significativamente menores do que no grupo EA ($9,86 \pm 1,69$ nmol.mgPtn⁻¹).

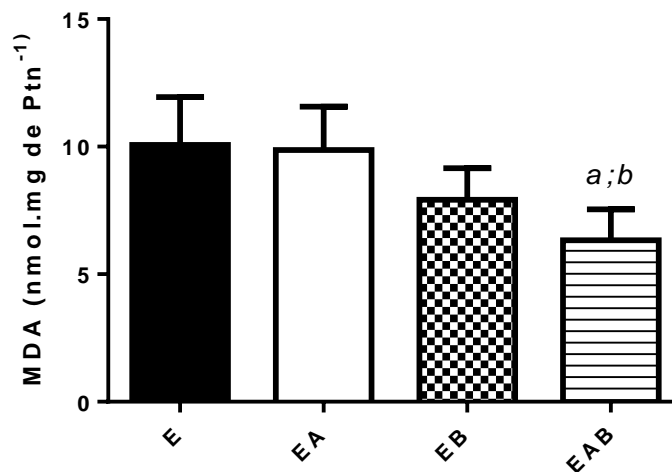


Figura 10. Concentração de MDA. $a = p < 0,05$ em relação a E; $b = p < 0,05$ em relação a EA. (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina).

As atividades enzimáticas (Figura 11), tanto da catalase (Figura 11A) quanto da superóxido dismutase (Figura 11B) não apresentaram diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$). Também não foram encontradas diferenças na concentração de tióis não protéicos (Figura 12) no tecido hepático($p>0,05$).

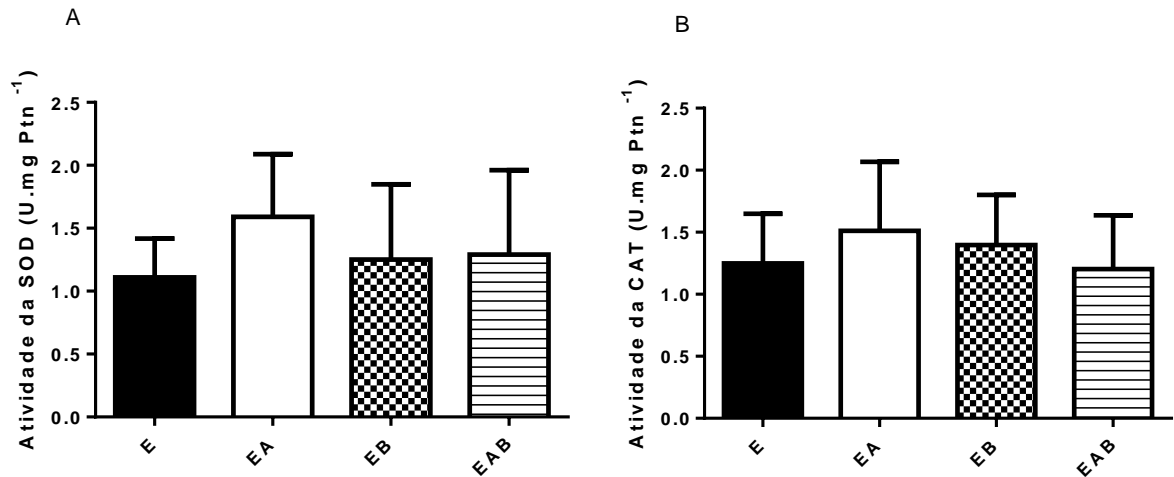


Figura 11. Atividade enzimática (A= atividade enzimática da SOD; B= atividade enzimática da CAT). (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina).

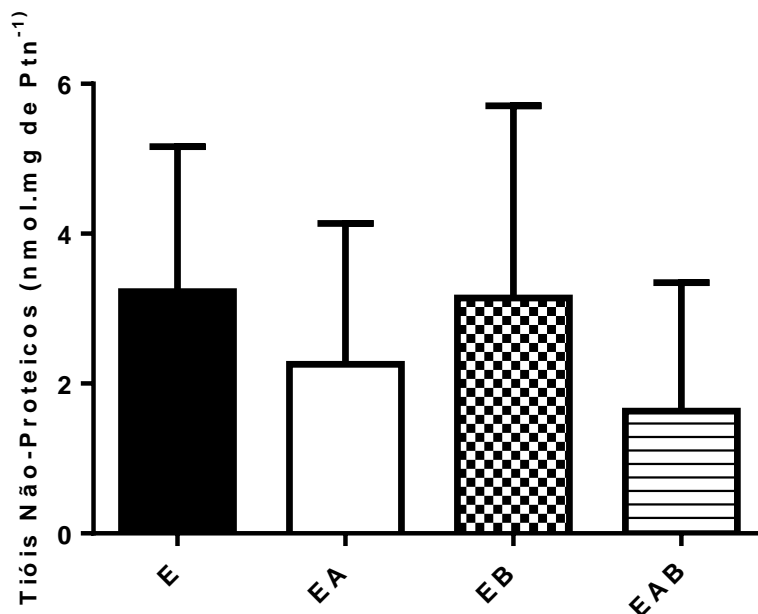


Figura 12. Tióis não-protéicos. (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina).

Os níveis de vitamina E (Figura 13) foram maiores no grupo EA ($2,35 \pm 0,23 \mu\text{mol.mg MF}^{-1}$) em relação ao E ($0,60 \pm 0,37 \mu\text{mol.mg MF}^{-1}$). Também foram maiores, em relação aos grupos EB ($1,00 \pm 0,94 \mu\text{mol.mg MF}^{-1}$) e EAB ($0,82 \pm 0,31 \mu\text{mol.mg MF}^{-1}$).

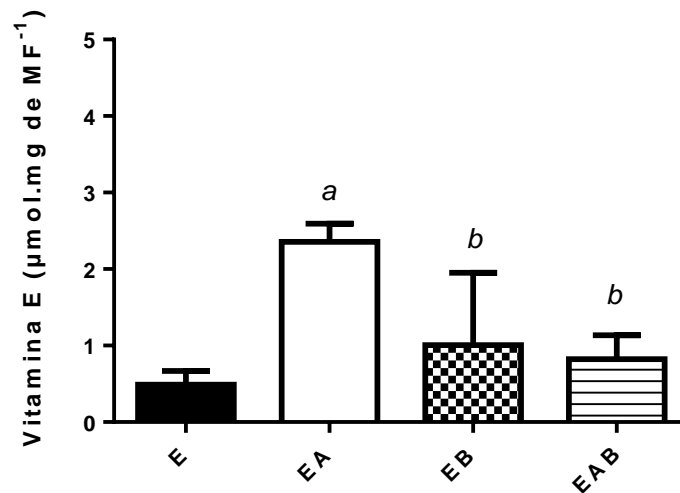


Figura 13. Concentração de vitamina E. *a*= $p < 0,05$ em relação a E; *b*= $p < 0,05$ em relação a EA. (Grupo E: controle, Grupo EA: etanol + ácido alfa lipóico, Grupo EB: etanol + benfotiamina, Grupo EAB: etanol + ácido alfa lipóico + benfotiamina).

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a associação de dois antioxidantes como tratamento aos danos hepáticos provocados pela ingestão crônica de etanol em modelo experimental animal. Os efeitos desta associação foram avaliados através de alguns níveis, como a atividade enzimática do sistema antioxidante, assim como o malondialdeído que sinaliza o estresse oxidativo.

Para isso, os animais foram submetidos a uma dieta com 35% das calorias provenientes do etanol, baseada no modelo de Lieber e DeCarli (1982), sem alterações para o grupo controle, e com alterações para os grupos suplementados, sendo a adição da suplementação única ou combinada de benfotiamina e ácido alfa-lipóico. Como os gráficos nas Figura 7 e Figura 8 mostram, não foi observada diferença no ganho de peso dos animais e no consumo de dieta ao longo das semanas de experimento e, a ingestão de etanol (Figura 9) também se manteve constante e sem diferenças entre os grupos.

O álcool pode afetar diversos órgãos. Já foi observado que danos ao fígado causados por ingestão alcoólica foram ocasionados pelo metabolismo oxidativo desta substância no fígado, já que 95% do álcool ingerido é metabolizado no fígado (LIEBER, 1997). Esta metabolização ocorre através de 3 vias principais, sendo a via da enzima álcool desidrogenase a mais importante, realizando a metabolização no citosol das células do fígado. O produto comum de todas as vias é a geração de radicais livres (LIEBER, 1997).

Estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio dos níveis de espécies pró-oxidantes e antioxidantes (com o aumento das espécies pró-oxidantes) que leva ao dano oxidativo de moléculas celulares. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são naturalmente gerados em pequenas quantidades durante reações metabólicas e contém pelo menos um oxigênio em sua estrutura molecular, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e óxido nítrico (NO) (SUGIMOTO e TAKEI, 2017).

Já os antioxidantes incluem a enzima superóxido dismutase, catalase, glutatona e glutatona peroxidase. A exposição ao etanol, seja ela aguda ou crônica, resulta na produção de ROS e na redução da atividade das enzimas do sistema antioxidante (SUGIMOTO e TAKEI, 2017).

ROS podem causar dano de várias formas, incluindo peroxidação lipídica (causada principalmente pelos radicais resultantes da metabolização do etanol pelo citocromo P450, que é a principal via de metabolização quando há cronicidade de ingestão), resultando na

destruição de membranas biológicas, e inibição da β -oxidação levando a um acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, resultando em esteatose hepática (REDDY e RAO, 2006; SAPKOTA e WYATT, 2015).

Na Figura 10 é mostrado que os níveis de MDA hepático foram menores no grupo EAB do que no grupo EA e no grupo E, porém, não houve diferença entre os níveis quando comparado com o grupo EB. Como visto anteriormente, o MDA é um subproduto da peroxidação lipídica e, portanto, um marcador de dano resultante de estresse oxidativo induzido pelo etanol. Os resultados do presente estudo sugerem que a presença da benfotiamina tenha colaborado para a diminuição dos níveis de MDA hepático.

A tiamina produz efeitos antioxidantes em aldeídos, polifenóis, ácido ascórbico e, similarmente ao ácido ascórbico e cisteína, impede a oxidação do grupamento sulfidril na células, além de ser efetiva ao combater produtos da LPO. O complexo de tiamina-ácido ascórbico inibe a oxidação de radicais livres, além disso, altos níveis de radicais livres no cérebro e produtos da LPO no fígado foram encontrados em ratos com deficiência de tiamina (LUKIENKO *et al.*, 2000).

Logo, o efeito antioxidante da tiamina é resultante de sua oxidação e que pode ocorrer através de duas vias independentes: a divisão do grupo NH_2 do anel de pirimidina com a formação de tiamina tricíclica ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$), e a abertura do anel tiazólico seguida da perda de $\text{H}^+ + \text{e}^-$, sendo que no segundo caso o OH^- pode ser integrado no componente tiazólico da tiamina (LUKIENKO *et al.*, 2000).

Entretanto, já foi visto que o ALA e DHLA podem atuar de forma sinérgica com outros compostos antioxidantes e podemos pensar nesta possibilidade devido ao resultado mostrado na Figura 10, onde o grupo EAB teve menor concentração de MDA e, portanto, menor dano oxidativo decorrente da LPO. Esta explicação é consistente com os resultados de outros estudos que relataram que a administração de ALA para ratos idosos aumentou os níveis de enzimas antioxidantes nas mitocôndrias e aumentou as concentrações de GSH e vitaminas C e vitamina E (ARIVAZHAGAN, RAMANATHAN e PANNEERSELVAM, 2001; CHAE, SHIN e KIM, 2008).

O ALA é solúvel em ambientes lipídicos e aquosos, sendo prontamente absorvido pela dieta, transportado pelas células e reduzido a DHLA (CHAE, SHIN e KIM, 2008). O DHLA é um dos poucos antioxidantes que é capaz de reagir com radicais peróxila de maneira tão rápida através de um mecanismo de transferência de hidrogênio. Isso está relacionado à estrutura única de DHLA que coloca o grupamento sulfidril e carboxilato ($-\text{COO}^-$) a uma distância ideal para “aprisionar” o radical peróxila e transferir um átomo de hidrogênio para

ele, que é exatamente da mesma forma como os locais ativos das enzimas antioxidantes funcionam, isto é, o catalisador está próximo do sítio reativo em um lugar ideal para a reação (CASTAÑEDA-ARRIAGA e ALVAREZ-IDABOY, 2014).

É possível observar que no presente estudo, níveis de vitamina E menores foram encontrados no grupo EAB (Figura 13). Isso pode ser explicado já que a vitamina E pode ter sido reduzida através da reciclagem do ubiquinol, ascorbato e GSH durante os ciclos redox do ALA e DHLA (CHAE, SHIN e KIM, 2008).

Também neste estudo, as avaliações do estado redox dos marcadores mostraram que a suplementação não promoveu alterações nas atividades da SOD, CAT e GSH (sendo este último o principal representante dos tióis não protéicos), como pode ser visto nas figuras 11 e 12.

É um resultado que difere de outros estudos (MASALKAR e ABHANG, 2005; BAILEY *et al.*, 2001; KESSOVA e CEDERBAUM, 2007) que mostram a diminuição da SOD, CAT e GSH quando o etanol é administrado, e o aumento quando o mesmo é retirado ou quando o tratamento é iniciado. Entretanto existem diversos motivos para tal. É necessário levar em consideração que a forma de administração do etanol e a composição dietética pode ter influência nos resultados, assim como o tempo de duração do experimento e, a possibilidade de adaptação fisiológica dos animais à administração do etanol (COUDRAY *et al.*, 1993). Contudo, existem relatos na literatura que mostram que a administração de etanol de maneira crônica ou aguda não alterou enzimas do sistema antioxidante (COUDRAY *et al.*, 1993; MACDONALD, 1973; MUNOZ *et al.*, 1987), mesmo quando a duração do experimento atingiu 30 semanas (DINU, NECHIFOR e MOVILEANU, 2005).

Como visto anteriormente neste trabalho, o beber em “*binge*” é um padrão de ingestão alcoólica que deve levar a concentração de álcool no sangue a 0,8g/L (NIAAA, 2016). Esta concentração é geralmente obtida após 4 doses para mulheres e 5 doses para homens no período de duas horas. Em modelos experimentais com animais, esta concentração pode ser atingida através da administração do etanol via gavagem, já que naturalmente os animais não consomem voluntariamente concentrações alcoólicas que produzam intoxicação (CRABBE, HARRIS e KOOB, 2011).

As divergências não ocorreram apenas em relação à atividade enzimática. Em relação a peroxidação lipídica alguns autores mostraram um aumento deste processo após a ingestão de álcool (SHAW *et al.*, 1998; MATSUMURU *et al.*, 1980; AKKUS *et al.*, 1997), enquanto outros mostraram um resultado contrário para mesma situação (DIANZANI, 1985; INOMATA, RAO e TSUKAMOTO, 1987; COUDRAY *et al.*, 1993).

O papel da SOD dependente de manganês (Mn-SOD), que é a principal enzima antioxidante celular, no estresse oxidativo induzido pelo álcool que resulta em danos ao fígado ainda é controverso. Um estudo mostrou que mutações no gene da Mn-SOD podem levar ao aumento da mesma, fato que resulta em um risco para doença hepática alcoólica severa em humanos (DEGUL *et al.*, 2001). Enquanto outros mostram a diminuição da expressão e atividade da Mn-SOD no fígado de ratos devido ao consumo de etanol (KOCH *et al.*, 2000).

A metabolização do etanol pela catalase é uma das principais vias citadas anteriormente. Nela, o etanol é oxidado pela catalase nos peroxissomas. Neste processo, inicialmente ocorre a oxidação do NADPH através da NADPH oxidase, com a formação de H_2O_2 , que através da influência da catalase, irá promover a oxidação do etanol (JORDÃO JR. *et al.*, 1998; KITSON e WEINER, 1996).

Contudo, é um processo limitado pela produção endógena de H_2O_2 , entretanto, a ingestão de etanol induz a uma maior atividade as NADPH-oxidase, contribuindo assim para maior formação de H_2O_2 , ampliando a atuação e significância desta via na metabolização do etanol (JORDÃO JR. *et al.*, 1998; LIEBER, 1997).

No trabalho de DeMaster, Kaplan e Chesler (1981), ratos machos Sprague-Dawley foram alimentados com uma dieta líquida contendo etanol por 40 dias e também não foram encontradas alterações na atividade da catalase quando comparado com o controle que não ingeriu etanol.

A glutathione (Figura 12) é um tripeptídeo, contendo cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos. Quando em baixa concentração existe um maior risco de estresse oxidativo (BRAY e TAYLOR, 1993; MEISTER, 1995). A glutathione está envolvida com uma função antioxidante interagindo com um radical livre resultando em glutathione oxidada (GSSG). O GSSG é reduzido, regenerando o GSH pela glutathione reductase, num processo que funciona às custas do NADPH (KRETZSCHMAR, 1996).

Em uma situação de intoxicação crônica com etanol, existe um aumento na formação de peróxidos lipídicos, que por sua vez, favorecem o consumo de GSH e sua oxidação para GSSG pela glutathione peroxidase (ALTOMARE, VENDEMIALE e ALBANO, 1988).

Como visto na Figura 13, os níveis de concentração de vitamina E no tecido hepático foram maiores no grupo EA, que foi suplementado com ácido alfa lipóico. E foram menores nos grupos EB e EAB, respectivamente, suplementados com benfotiamina e com a combinação de ácido alfa lipóico e benfotiamina.

A vitamina E consiste em uma família de quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, sendo o α -tocoferol a forma mais predominante da vitamina E em tecidos. Entretanto, resultados de estudos clínicos não endossam um efeito protetor do α -tocoferol na prevenção de doenças em indivíduos com ingestão e absorção adequada de nutrientes (JIANG, 2014). Uma explicação para tanto é que o α -tocoferol pode ser benéfico para indivíduos que tenham deficiência do mesmo e/ou de outros micronutrientes, que pode ser causado por baixa ingestão de vitamina E ou depleção da mesma devido à uma situação patológica ou má-nutrição associada com o uso de cigarros, alcoolismo e distúrbios de absorção (REITER, JIANG e CHRISTEN, 2007).

A função antioxidante da vitamina E é, basicamente, capturar radicais peroxila e alcoxila, levando ao término da reação em cadeia da peroxidação lipídica por formar um aduto que não é uma espécie radicalar. Nesse processo, o α -tocoferol doa um átomo de hidrogênio para estes radicais, que surgiram através da oxidação de ácidos graxos. O radical peroxila oxida a vitamina E, e produz o radical tocoferoxila, um radical estável (JORDÃO JR. *et al.*, 1998).

Diferentemente do encontrado no trabalho de Masalkar e Abhang (2005), o presente estudo sugere que níveis maiores de vitamina E (Figura 13), não estão relacionados a níveis menores de malondialdeído (Figura 10). Sendo que os resultados tanto de MDA quanto de vitamina E sugerem que a vitamina E foi utilizada como defesa antioxidante no grupo EAB para que o dano encontrado, marcado pelo MDA, fosse menor. O mesmo resultado foi observado em trabalhos prévios como o de Sadrzadeh, Nanji e Meydani (1994) e Jurczuk, Brzóška e Moniuszko-Jakoniuk (2007).

Nos trabalhos citados acima e no presente trabalho foi possível observar que a redução da concentração de vitamina E no fígado dos animais expostos ao etanol pode ter sido resultado de sua atuação na eliminação de ROS gerados durante a metabolização do etanol ingerido pelos animais, já que a vitamina E demonstra uma afinidade pelo radical hidroxietil gerado pelas enzimas microsossomais do fígado que envolve o CYP2E1 (SADRZADEH, NANJI e MEYDANI, 1994; JURCZUK, BRZÓSKA e MONIUSZKO-JAKONIUK, 2007).

Contudo, a vitamina E não previne a formação de espécies radicalares e também não evita a iniciação da oxidação de ácidos graxos, porém é capaz de parar a reação em cadeia da peroxidação lipídica (TRABER e STEVENS, 2011). A vitamina E é uma potente eliminadora de radical peroxila, sendo que quando estes são formados reagem 1000 vezes mais rápido com a vitamina E do que com os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (BUETTNER, 1993). O grupo hidroxila do tocoferol reage com o radical peroxil para formar um hidroperóxido

lipídico correspondente e o radical tocoferil, o qual reage com a vitamina C ou GSH e retornando a vitamina E a seu estado reduzido (TRABER e STEVENS, 2011).

Dessa forma, os resultados mostram que a suplementação de ácido alfa lipóico, benfotiamina e da combinação de ambas, não foi capaz de causar alterações na atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e níveis de glutathione reduzida. Entretanto, com os mesmos dados é possível sugerir que a suplementação combinada de antioxidantes contribuiu para a diminuição do dano oxidativo através da influência em componentes de defesa do sistema antioxidante não enzimático, assim como sua ação direta através da transferência de hidrogênio.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a suplementação combinada de dois antioxidantes pode trazer benefícios através da influência, exercida sobre componentes do sistema de defesa antioxidante não-enzimático, assim como sua ação direta através da doação de hidrogênio a espécies radicalares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods. Enzymol**, v.105, p.121-126, 1984.
- AKKUS, I.; GULTEKIN, F.; AKOZ, M.; CAGLAYAN, O.; CAN, G.; GUREL, A. Effect of moderate alcohol intake on lipid peroxidation in plasma erythrocyte and leukocyte and on some antioxidant enzymes. **Clin Chim Acta**, v. 266, p. 141-147, 1997.
- ALBANO, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. **Proc. Nutr. Soc.**, v.65, n.3, p.278-290, 2006.
- ALTERNATIVE MEDICINE REVIEW. Benfotiamine Monograph, v.11, n.3, p. 238-242, 2006.
- ALTOMARE, E.; VENDEMIALE, G.; ALBANO, O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases. **Life Sci.**, v. 43, n. 12, p. 991-998, 1988.
- AMBADATH, V.; VENU, R.G.; MADAMBATH, I. Comparative study of the efficacy of ascorbic acid, quercetin, and thiamine for reversing ethanol-induced toxicity. **J Med Food**, v. 13, n.6, p; 1485-1489, 2010.
- ANTIA, E.P.; ABRAHAM, P. Clinical Dietetics and Nutrition. **Oxford University Press**, p. 240–248, 1997.
- ARIVAZHAGAN, P.; RAMANATHAN, K.; PANNEERSELVAM, C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. **Chem Biol Interact**, v. 138, n. 2, p. 189-198, 2001.
- ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, S.; KIA, D.; FAVIER, A. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr**, v. 572, p. 103-116, 1991.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev**. 2014.
- BAILEY, S.M.; PATEL, V.B.; YOUNG, T.A.; ASAYAMA, K.; CUNNINGHAM, C. C. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/ glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. **Alcohol Clin Exp Res**, v.25, p.726-733, 2001.
- BALIUNAS, D. O.; TAYLOR, B. J.; IRVING, H.; ROERECKE, M.; PATRA. J.; MOHAPATRA, S.; REHM, J. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**. v. 32, p. 2123–2132, 2009.
- BALIUNAS, D.; REHM, J.; IRVING, H.; SHUPER, P. Alcohol consumption and risk of incident human immunodeficiency virus infection: a metaanalysis. **Int J Public Health**, v. 55, p. 159–66, 2010.
- BANSAL, S.; LIU, C.P.; SEPURI, N.B.; ANANDATHEERTHAVARADA, H.K.; SELVARAJ, V.; HOEK, J.; MILNE, G.L.; GUENGERICH, F.P.; AVADHANI, N.G. Mitochondria-targeted cytochrome P450 2E1 induces oxidative damage and augments alcohol-mediated oxidative stress. **J. Biol. Chem**, v. 285, n. 32, p.24604 – 24619, 2010.

- BARBOSA, K.B.F.; BRESSAN, J.; ZULET, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. **An Sist Sanit Navar**, v. 31, n.3, p. 259-280, 2008.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010 .
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v.12, n.12, p. 123-130, 1999.
- BLOOMFIELD, K.; STOCKWELL, T.; GMEL, G.; REHN, N. International comparisons of alcohol consumption. **NIAAA** (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism), 2003.
- BRAY, T. M.; TAYLOR, C. G. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 71, p. 746-751, 1993.
- BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys**, v.300, p. 535-543, 1993.
- BUSTAMANTE, J.; LODGE, J.K.; MARCOCCI, L.; TRITSCHLER, H.J.; PACKER, L.; RIHN, B.H. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, p. 1023–1039, 1998.
- BYKOV, I., JARVELAINEN, H., LINDROS, K. L-carnitine alleviates alcoholinduced liver damage in rats: role of tumour necrosis factor-alpha. **Alcohol Alcohol**, v. 38, i. 5, p. 400–406, 2003.
- CASTAÑEDA-ARRIAGA, R.; ALVAREZ-IDABOY, J.R. Lipoic acid and dihydrolipoic acid. A comprehensive theoretical study of their antioxidant activity supported by available experimental kinetic data. **J. Chem. Inf. Model**, v. 54, p. 1642-1652, 2014.
- Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: binge drinking. January 10, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/features/vitalsigns/bingedrinking/>.
- CHAE, C.H.; SHIN, C.H.; KIM, H.T. The combination of α -lipoic acid supplementation and aerobic exercise inhibits lipid peroxidation in rat skeletal muscles. **Nutr Res**, v. 28, n. 6, p. 399-405, 2008.
- CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr**, v.72, n.2, p.637-646, 2000.
- COUDRAY, C.; RICHARD, M.J.; FAURE, H.; FAVIER, A. Blood and liver peroxide status after chronic ethanol administration in rats. **Clin Chim Acta**, v. 219, p. 35-45, 1993.
- CRABBE, J. C.; HARRIS, R. A.; KOOB, G. F. Preclinical studies of alcohol binge drinking, **Ann. N. Y. Acad. Sci.** , v. 1216, p. 24–40, 2011.
- CREMER, D.R.; RABELER, R.; ROBERTS, A.; LYNCH, B. Long-term safety of α -lipoic acid (ALA) consumption: A 2-year study. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v. 46, p. 193–201, 2006.
- CUNNINGHAM, C.C.; BAILEY, S.M. Ethanol consumption and liver mitochondria function **Biol Signals Recept.**, v. 10, p. 271-282, 2001.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sci**, v.81, n. 3, p. 177-187, 2007.

DAY, E.; BENTHAM, P.; CALLAGHAN, R.; KURUVILLA, T.; GEORGE, S. Thiamine for Wernicke-Korsakoff Syndrome in people at risk from alcohol abuse. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, 2004.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI N.A. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v.15, n.4, p.316-328, 2005.

DeMASTER, E.G.; KAPLAN, E.; CHESLER, E. The differential response of tissue catalase activity to chronic alcohol administration in the rat. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 5, n. 1, p. 45-48, 1981.

DEPEINT, F., BRUCE, W.R., SHANGARI, N., MEHTA, R., O'BRIEN, P.J. Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. **Chem. Biol. Interact**, v. 163, n. 1, p. 113–132, 2006a.

DEPEINT, F., BRUCE, W.R., SHANGARI, N., MEHTA, R., O'BRIEN, P.J. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. **Chem. Biol. Interact**, v. 163, n. 2, p. 94–112, 2006b.

DIANZANI, M. U. Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. **Alcohol Alcohol**, v. 20, p. 161-173, 1985.

DINU, D.; NECHIFOR, M. T.; MOVILEANU, M. Ethanol-Induced Alterations of the Antioxidant Defense System in Rat Kidney. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 19, n. 6, p. 386-395, 2005.

EASTWOOD, M.A.; PASSMORE, R. Human nutrition and dietetics. **ELBS/ Charchill Livingstone**, p. 70–223, 1986.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FOLTRAN, F.; GREGORI, D.; FRANCHIN, L.; VERDUCI, E.; GIOVANNINI, M. Effect of alcohol consumption in prenatal life, childhood, and adolescence on child development. **Nutrition Review**, v.69, p.642–569, 2011.

FUKE, H.; KOKI, I.; WATANABE, N.; KUMADA, S. Acute, subacute and chronic toxicities of thioctic acid in rats. **Nippon Yakurigaku Zasshi** v. 68, n. 265, 1972.

GORACA, A.; HUK-KOLEGA, H.; PIECHOTA, A.; KLENIEWSKA, P.; CIEJKA, E.; SKIBSKA, B. Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential. **Pharmacol. Rep.**, v. 63, p. 849–858, 2011.

GRAMENZI, A.; CAPUTO, F.; BISELLI, M.; KURIA, F.; LOGGI, E.; ANDREONE, P.; BERNARDI, M. Review article: alcoholic liver disease-- pathophysiological aspects and risk factors, **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, n. 8, p. 1151-1161, 2006.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, n.1, p. 110-118, 2004.

GUNZARETH, L.; FADEN, V.; ZAKHARI, S.; WARREN, K. **National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) newsletter**. N. 3. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, 2004.

HAHN, J. A.; WOOLF-KING, S. E.; MUYINDIKE, W. Adding fuel to the fire: alcohol's effect on the HIV epidemic in Sub-Saharan Africa. **Current HIV/AIDS Rep.**, v. 8, p. 172–180, 2011.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, n.2, p.231-255, 2004.

HUANG, H.Y.; APPEL, L.J.; CROFT, K.D.; MILLER, E.R.; MORI, T.A.; PUDDEY, I.B. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v. 76, n. 3, p. 549-555, 2002.

HUANG, M.C.; CHEN, C.C.; PENG, F.C.; TANG, S.H.; CHEN, C.H. The correlation between early alcohol withdrawal severity and oxidative stress in patients with alcohol dependence. **Program of Neuropsychopharmacol Biology Psychiatry**, v.33, n.1, p.66-69, 2009.

INOMATA, T.; RAO, G.A.; TSUKAMOTO, H. Lack of evidence for increased lipid peroxidation in ethanol induced centrilobular necrosis in rat liver. **Liver**, v. 7, p. 233-239, 1987.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **A review of human carcinogens: personal habits and indoor combustions**, vol. 100, IARC, 2012.

IRVING, H. M.; SAMOKHVALOV, A. V.; REHM, J. Alcohol as a risk factor for pancreatitis. A systematic review and meta-analysis. **JOP**, v. 10, p.387–392., 2009.

JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. **Free Radic Biol Med**, v.72, p. 76-90, 2014.

JORDÃO, J. R. A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v.31, p.434-449, 1998.

JURCZUK, M.; BRZÓSKA, M.M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead- and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. **Food Chem Toxicol**, v. 45, n. 8, p; 1478-1486, 2007.

KAYA-DAGISTANLI, F.; TANRIVERDI, G.; ALTINOK, A.; OZYAZGAN, S.; OZTURK, M. The effects of alpha lipoic acid on liver cells damages and apoptosis induced by polyunsaturated fatty acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 84-93, 2013.

KESKOVA, I. G.; CEDERBAUM, A. I. Mitochondrial alterations in livers of Sod1^{-/-} mice fed alcohol. **Free Radic Biol Med**, v.42, p. 1470-1480, 2007.

KITSON, K. E.; WEINER, H. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present and future. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, p.82-92, 1996.

- KOCH, O.; FARRE, S.; DE LEO, M.E.; PALOZZA, P.; PALAZZOTTI, B.; BORRELO, S.; PALOMBINI, G.; CRAVERO, A.; GALEOTTI, T. Regulation of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in chronic experimental alcoholism: effects of vitamin E-supplemented and -deficient diets. **Alcohol Alcohol**, v.35, n. 2, p. 159-163, 2000.
- KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**, v.16, n. 4, p. 433-441, 2003.
- KOWLURU, R.A.; ODENBACH, S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. **Diabetes**, v. 53, p. 3233-3238, Dezembro, 2004.
- KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp Toxicol Pathol**, v. 48, p. 439-446, 1996.
- KRUGER, R.P.; FARINHA, J.B.; TEIXEIRA, B.C.; REISCHAK-OLIVEIRA, A. Estresse oxidativo e a função endotelial: efeitos do exercício físico associado à lipidemia pós-prandial. **J Vasc Bras**, v.14, n.4, Porto Alegre, 2015.
- LECOMTE, E.; HERBETH, B.; PIROLLET, P.; CHANCERELLE, Y.; ARNAUD, J., MUSSE, N. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. **Am J Clin Nutr**, v.60, n. 2, p. 255-261, 1994.
- LIEBER, C. S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. **Clin Chim Acta**, v. 257, p. 54–84, 1997.
- LIEBER, C. S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. **Alcohol Res Health**, v. 27, p. 220-231, 2003.
- LIEBER, C.S. Metabolism of Alcohol. **Clinics in Liver Disease**, v. 9, n. 1, p. 1-35, 2005.
- LIEBER, C.S.; DECARLI, L.M. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. **Alcohol Alcohol**, v. 24, n. 3, p. 197-211, 1989.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev bras ciênc farm**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LÖNNROTH, K.; WILLIAMS, B.; STADLIN, S.; JARAMILLO, E.; DYE, C. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis – a systematic review. **BMC Public Health**, v. 8, p.289, 2008.
- LONSDALE, D. A Review of the Biochemistry, Metabolism and Clinical Benefits of Thiamin(e) and Its Derivatives. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 3, n. 1, p. 49-59, 2006.
- LUKIENKO, P.I.; MEL'NICHENKO, N.G.; ZVERINSKII, I.V.; ZABRODSKAYA, S.V. Antioxidant properties of thiamine. **Bull Exp Biol Med**, v. 130, n. 9, p. 874-876, 2000.
- MACDONALD, C. M. The effects of ethanol on hepatic lipid peroxidation and on the activities of glutathione reductase and glutathione peroxidase. **Fed Eur Biochem Soc**, v. 35, p. 227-230, 1973.
- MANTOVANI, G.; MACCIÒ, A.; MADEDDU, C.; MURA, L.; MASSA, E.; GRAMIGNANO, G.; LUSSO, M.R.; MURGIA, V.; CAMBONI, P.; FERRELI, L. Reactive

oxygen species, antioxidant mechanisms, and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol**, v. 22, p. 17–28, 2003.

MANZARDO, A. M.; HE, J.; POJE, A.; PENICK, E. C.; CAMPBELL, J.; BUTLER, M. G. Double-blind, randomized placebo-controlled clinical trial of benfotiamine for severe alcohol dependence. **Drug Alcohol Depend.**, v. 133, n. 2, p. 562-570, 2013.

MARKLUND, S; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469-474, 1974

MARTIN, P. R.; SINGLETON, C. K.; HILLER-STURMHOFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. **Alcohol Res Health.**, v. 27, p. 134-142, 2003.

MASALKAR, P.D.; ABHANG, S.A. Oxidative stress and antioxidant status in patient with alcoholic liver disease. **Clin. Chem. Acta.**, v.355, n.1-2, p. 61-65, Amsterdam, 2005.

MATSUMURU, T.; SUETMATSU, T.; SATO, N.; KAMADA, T.; ABE, H. Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in man. **Adv Exp Med Biol**, v. 132, p. 287-293, 1980.

MEHTA, R.; DEDINA, L.; O'BRIEN, P. Rescuing hepatocytes from iron-catalyzed oxidative stress using vitamins B1 and B6. **Toxicol Vitro**, v. 25, n. 5, p. 1114-1122, 2011.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods Enzymol**, v. 251, p. 3-7, 1995.

MELONI, J.N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool. **Revista Brasileira Psiquiátrica**, v.26, p.7-10, 2004

MIN, A.K.; KIM, M.K.; SEO, H.Y.; KIM, H.S.; JANG, B.K.; HWANG, J.S.; CHOI, H.S.; LEE, K.U.; PARK, K.G.; LEE, I.K. Alpha-lipoic acid inhibits hepatic PAI-1 expression and fibrosis by inhibiting the TGF- signaling pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 393, p. 536–541, 2010.

MINCIS, M; MINCIS, R. Doença hepática alcoólica. **Rev Bras Med**, v. 67, Junho, 2010.

MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N.E. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.82, n. 1, p. 84-90, 2002.

MUNOZ, M. E.; MARTIN, M. I.; FERMOSO, J.; GONZALEZ, J.; ESTELLER, A. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and glutathione related enzyme activities in rat liver. **Drug Alcohol Depend**, v. 20, p. 221-226, 1987.

NAIMI, T., et al. Binge drinking among us adults. **JAMA**, v.289, issue 1, p.70-77, January 2003.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA). Drinking Levels Defined, 2016.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA). **Eighth Special Report to the U.S. Congress on Alcohol and Health**, NIH pub. No. 94-3699. Washington, 1993.

NELSON, D.E.; JARMAN, D. W.; REHM, J.; GREENFIELD, T. K.; REY, G.; KERR, W. C. Alcohol-attributable cancer deaths and years of potential life lost in the United States. **Am J Public Health**, p.641–648, 2013.

NETZEL, M.; ZIEMS, M.; JUNG, K.H.; NOLL, C.; BITSCH, I. Effect of high dose thiamine hydrochloride and S-benzylthiamine-O-monophosphate on thiamine status after chronic ethanol administration. **Biofactors**, v.11, p.111-113, 2000.

NICE Guidelines. **Clinical guideline 100 e alcohol use disorders: diagnosis and clinical management of alcohol-related physical complications**. RCP, 2010.

OMONI, A.; ALUKO, R. The anticarcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends Food Science Technology**, v. 16, n. 8, p. 344-350, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Relatório Global sobre Álcool e Saúde – 2014**. Genebra, Suíça, 2014.

PACKER, L. P.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic. Biol. Med**, v. 19, n. 2, p. 227-250, 1995.

PARI, L.; MURUGAVEL, P. Protective Effect of α -Lipoic Acid against Chloroquine-induced Hepatotoxicity in Rats. **J. Appl. Toxicol**, v. 24, p. 21–26, 2004.

PARK, K.G.; MIN, A.K.; KOH, E.H.; KIM, H.S.; KIM, M.O.; PARK, H.S.; KIM, Y.D.; YOON, T.S.; JANG, B.K.; HWANG, J.S.; KIM, J.B.; CHOI, H.S.; PARK, J.Y.; LEE, I.K.; LEE, K.U. Alpha-lipoic acid decreases hepatic lipogenesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent pathways. **Hepatology**, v. 48, p. 1477–1486, 2008.

PATEL, V.B.; WORRALL, J.; EMERY, P.W.; PREEDY, V.R. Protein adduct species in muscle and liver of rats following acute ethanol administration. **Alcohol Alcohol.**, v.40, n.6, p.485-493, Oxford, 2005.

PEANA, A.T.; MUGGIRONI, G.; FOIS, G.; DIANA, M. Alpha-lipoic acid reduces ethanol self-administration in rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 37, n. 11, p. 1816-1822, 2013.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **Int J Vitam Nutr Res**, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

PORTARI, G.V.; JORDÃO, A.A.; MEIRELLES, M.S.; MARCHINI, J.S.; VANNUCCHI, H. Effect of beta-carotene supplementation on rats submitted to chronic ethanol ingestion. **Drug Chem Toxicol**, v.26, p. 191-198, 2003.

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

PORTARI, G.V.; VANNUCCHI, H.; JORDÃO, A.A. Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration. **Eur. J. Pharm. Sci**, v. 48, n. 4, p. 799-802, 2013.

PORTARI, G.V.; OVIDIO, P. P.; DEMINICE, R.; JORDÃO, A. A. Protective effect of treatment with thiamine or benfotiamine on liver oxidative damage in rat model of acute ethanol intoxication. **Life Sci.**, v. 162, p. 21-24, 2016.

QU, B.G.; WANG, H.; JIA, Y.G.; SU, J.L.; WANG, Z.D.; WANG, Y.F.; HAN, X.H.; LIU, Y.X.; PAN, J.D.; REN, G.Y. Changes in tumor necrosis factor- α , heat shock protein 70,

malondialdehyde, and superoxide dismutase in patients with different severities of alcoholic fatty liver disease: A prospective observational study. **Medicine**. p.34, 2015.

RAMALHO, V.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REDDY, J. K.; RAO, M. S. Lipid metabolism and liver inflammation.II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, p. 852-858, 2006.

REHM, J.; TAYLOR, B.; MOHAPATRA, S.; IRVING, H.; BALIUNAS, D.; PATRA, J. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. **Drug Alcohol Review**, v. 29, p.437-445, 2010.

REHM, J.; SHIELD, K. D. Alcohol and mortality: global alcohol-attributable deaths from cancer, liver cirrhosis and injury in 2010. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 35. issue 2, p. 174-183, 2013.

REHM, J.; SHIELD, K. D.; JOHARCHI, N.; SHUPER, P. A. Alcohol consumption and the intention to engage in unprotected sex: systematic review and meta-analysis of experimental studies. **Addiction**. v. 107, p.51-59, 2012.

REITER, E.; JIANG, Q.; CHRISTEN, S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. **Mol Aspects Med**, v. 28, n. 5-6, p. 668-691, 2007.

ROERECKE, M.; REHM, J. Alcohol intake revisited: risks and benefits. **Curr Atheroscler Rep**. v. 14, p. 556-562, 2012.

ROVER JR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova**, v. 24, n.1, p. 112-119, 2001.

SADRZADEH, S.M.; NANJI, A.A.; MEYDANI, M. Effect of chronic ethanol feeding on plasma and liver alpha- and gamma-tocopherol levels in normal and vitamin E-deficient rats. Relationship to lipid peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v.47, n.11, p. 2005-2010, 1994.

SAPKOTA, M. WYATT, T. A. Alcohol, Aldehydes, Adducts and Airways. **Biomolecule**, v.5, n. 4, p. 2987-3008, 2015.

SCHMID, U.; STOPPER, H.; HEIDLAN, A.; SCHUPP, N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. **Diabetes Metabolic Research Review**, v.24, n.5, p.371-377, 2008.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n.10, p. 308-313, 2004.

SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS. **I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira** / Elaboração, redação e organização: Ronaldo Laranjeira ...[et al.] ; Revisão técnica científica: Paulina do Carmo Arruda Vieira Duarte. Brasília :, 2007

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of Total Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 1192-1205, 1968.

- SEGAWA, S.; WAKITA, Y.; HIRATA, H.; WATARI, J. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. **Int J Food Microbiol**, v.128, i. 2, p. 371-377, 2008.
- SEITZ, H. K.; PELUCCHI, C.; BAGNARDI, V.; LA VECCHIA, C. Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: update 2012. **Alcohol Alcohol**, v.47, p.204-212, 2012.
- SETSHEDI M.; WANDS J.R.; MONTE S.M. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, p.178–185, 2010.
- SHAMI, N.; MOREIRA, E. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.
- SHAW, S.; JAYATILLEK, E.; ROSS, W. A.; GORDON, E.; LIEBER, C. S. Lipid peroxidation as a mechanism of alcoholic liver injury: role of iron mobilization and microsomal induction. **Alcohol**, v. 5, n. 2, p. 135-140, 1998.
- SILVA, C.S.; PORTARI, G.V.; VANNUCCHI, H. **Antioxidant treatment and alcoholism**. In: VINOOD PATEL (Ed.). *Molecular aspects of alcohol and nutrition*. Estados Unidos: Elsevier, p. 119-131, 2016.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Ver Nutr**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- STEVENS, M.J.; OBROSOVA, I.; COA, X.; HUYSSEN, C.V.; GREENE, D.A. Effects of DL- α - lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism and oxidative stres in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 49, p. 1006–1015, 2000.
- STEWART, S. F.; VIDALI, M.; DAY, C.P.; ALBANO, E.; JONES, D.E. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease, **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 197-203, 2004.
- SUDESH, V.; CAROL, A.F.; SUSHIL, P.; LINDA, L.; VEERESH, G. Dietary α -lipoic acid supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 15, p. 567-573, 2000.
- SUGIMOTO, K.; TAKEI, Y. Pathogenesis of alcoholic liver disease. **Hepatol Res**, v. 47, v. 1, p. 70-79, 2017.
- TATUM, V. L.; CHANGCHIT, C.; CHOW, C. K. Measurement of Malondialdehyde by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Lipids**, v. 25, p. 226-229, 1990.
- THE WORLD HEALTH REPORT. **Reducing risks, promoting healthy life**. World Health Organization, 2002.
- THOMSON, A.D. Mechanisms of Vitamin Deficiency in Chronic Alcohol Misusers and the Development of the Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Alcohol Alcohol Suppl**, v. 35, n. 1, p. 2-7, 2000.

TIBULLO, D.; LI VOLTI, G.; GIALLONGO, C.; GRASSO, S.; TOMASSONI, D.; ANFUSO, C.D.; LUPO, G.; AMENTA, F.; AVOLA, R.; BRAMANTI, V. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. **Inflamm. Res**, v. 66, n. 11, p. 947-959, 2017.

TRABER, M.G.; STEVENS, J.F. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radic Biol Med**, v.51, n.5, p. 1000-1013, 2011.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Journal of Molecular Cell Biochemistry**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VIDHYA, A.; RENJUGOPAL, V.; INDIRA, M. Impact of thiamine supplementation in the reversal of ethanol induced toxicity in rats. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 57, n. 4, p; 406-417, 2013.

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

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; EDEN, M.E.V.; AUST, S.D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 7, p. 577-583, 2002.

WIESER, V.; ADOLPH, T.E.; ENRICH, B.; KULIOPULOS, K.; KASER, A.; TILG, H.; KANEIDER, N. C. Reversal of murine alcoholic steatohepatitis by pepducin-based functional blockade of interleukin-8 receptors. **Gut**, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva, 2017

YAMASHINA, S.; TAKEI, Y.; IKEJIMA, K.; ENOMOTO, N.; KITAMURA, T.; SATO, N. Ethanol-induced sensitization to endotoxin in Kupffer cells is dependent upon oxidative stress. **Alcohol. Clin. Exp. Res**, v. 29, n. 12, p. 246–250, 2005.

YILMAZ, I.; DEMIRYILMAZ, I.; TURAN, M. I.; ÇETIN, N.; GUL, M. A.; SÜLEYMAN, H. The effects of thiamine and thiamine pyrophosphate on alcohol-induced hepatic damage biomarkers in rats. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 4, p. 664-670, 2015.

ZIMA, T.; ALBANO, E.; INGELMAN-SUNDERBERG, M.; ARTEEL, G.E.; THIELE, G.M.; KLASSEN, L.W.; SUN, A.Y. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. **Alcohol. Clin. Exp. Res**, v. 29, n. 6, p. 1060–1065, 2005.

ANEXO A – Certificado de aprovação do projeto pela CEUA/UFTM



Ministério da Educação
 Universidade Federal do Triângulo Mineiro
 CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Rua Madre Maria José, nº122 - Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia
 CEP: 38025-100 - Uberaba - MG - Telefone: (034) 37006764 - E-mail: ceua@pesqpg.uftm.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da associação de benfotiamina e ácido alfa-lipóico no tratamento de doença hepática alcoólica em modelo experimental”, registrada com o nº 401, sob a responsabilidade de Guilherme Vannucchi Portari – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em 23/01/2017.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/02/2017 à 06/05/2017
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	32
Peso/idade	60-70 gramas / 20 dias
Gênero	Machos
Origem	Empresa ANILAB Animais de Laboratório, Rua Servidão Quatro, 292, São Domingos, Paulínia-SP

Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
 Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
 Coordenador da CEUA

ANEXO B – Comprovante de procedência do animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto
Serviço de Biotério

ATESTADO

Atesto para os devidos fins que os 32 (trinta e dois) ratos da linhagem Wistar com padrão sanitário do tipo convencional que acompanham este documento foram fornecidos pelo Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* da USP de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para o Dr. Guilherme Vannucchi Portari, CPF: 261.570.828-79, do Depto. de Nutrição da Universidade Federal do Triângulo Mineiro-MG para serem utilizados como modelos experimentais em pesquisas científicas e que, ao exame clínico, não apresentaram sintomatologia sugestiva de serem portadores de agentes infecciosos capazes de causarem dano à saúde de quem os manipular.

Por ser verdade,

Firmo o presente.

Ribeirão Preto, 19 de setembro de 2017

JOSÉ EDUARDO LAUS
Médico Veterinário - CRMV:1656
Serviço de Biotério da PUSP-RP