

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**A AÇÃO DA GLUTAMINA NA GASTROPATIA DA
HIPERTENSÃO PORTAL**

Camila A. Moraes Marques

Porto Alegre

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

**A AÇÃO DA GLUTAMINA NA GASTROPATIA DA
HIPERTENSÃO PORTAL**

Camila A. Moraes Marques

Orientadora: Prof^a Dr^a Norma Anair Possa Marroni

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*

Porto Alegre

2008

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer". (Albert Einstein)

Dedico este trabalho

Aos meus pais e irmã, pelo apoio e pelo amor incondicional;

Ao Cristian, pela nossa caminhada;

Ao Rafael, meu filho muito esperado;

À minha querida orientadora, Dr^a Norma Marroni, que foi um grande presente em um momento de tantas incertezas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda a confiança e apoio depositados em mim.

À Prof^a Dr^a Norma Marroni, pelo carinho, pela confiança, pelo estímulo. Por sempre saber quando preciso de um empurrão ou de uma mão amiga para seguir adiante. Ao Dr^o Cláudio Marroni, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Ao meu querido companheiro de projeto Douglas Simonetto, sempre presente, preocupado com dados, resultados, correções e sugestões. Afinal, era o “nosso trabalho”.

Ao doutorando Rafael Vercelino, meu amigo do coração, sempre disposto, seja no laboratório, em casa, nos finais de semana. Em qualquer momento, sempre foi um bom amigo e colega. Obrigada!!

Ao meu amigo e parceiro desde o início dessa jornada no PPGFisio, Éder Marcolin. Prova de mestrado, disciplinas, trabalhos, qualificação, seminários, experimentos. Posso dizer que somos irmãos de coração, pois estamos em todas juntos, muitas vezes rindo para não chorar, mas faz parte do show e estamos aí finalizando esta etapa.

À minha querida, Silvia Bona, que participou de todos os momentos deste experimento sempre com muita paciência e dedicação. Este trabalho também é teu.

Aos colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia – HCPA e de Estresse Oxidativo – ULBRA, Alexandre, Clarissa, Cíntia, Emanuelle, Graziella, Henrique, Juliana, Lidiane, Lúcia, Luiz, Maurício, Mônica, Néelson e Tiago. Obrigada pela disposição, sempre auxiliando quando necessário. Cada um de vocês participou um pouquinho deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS. Professores, colegas e funcionários. Em especial, Alice e Fabiana, sempre dispostas e amáveis.

Às minhas amigas e amigos que sempre me estimularam com palavras de incentivo e compreensão pela ausência em vários momentos: Miriane, Mireile, Paula, Sheila, Lizandra, Débora.

Ao Prof^o José Luís Mauriz, da Universidade de Leon, pelo interesse no trabalho, auxílio e apoio científico.

Ao Prof^o Dr^o Claudio Zettler, pela análise histológica, contribuindo para os resultados do experimento.

Aos Professores e amigos da Diretoria de Pós-Graduação da Universidade Luterana do Brasil, pelo incentivo e apoio que sempre me dispensaram.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	15
INTRODUÇÃO	19
1 REFERENCIAL TEÓRICO	22
1.1 Circulação venosa portal	22
1.2 Hipertensão Portal: complicação da Cirrose.....	24
1.3 Gastropatia da Hipertensão Portal.....	25
1.4 Óxido Nítrico (NO)	29
1.5 Estresse Oxidativo	30
1.6 Defesas Antioxidantes	32
1.7 Glutamina	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivo Específico	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Delineamento Experimental.....	41
3.2 Animais	41
3.3 Grupos Experimentais	42
3.4 Procedimentos Experimentais	42
3.4.1 Modelo Experimental de Hipertensão Portal (HP) por Ligadura Parcial de Veia Porta.....	42
3.4.2 Administração do veículo e da glutamina	45
3.4.3 Aferição da Pressão Venosa Portal, morte dos animais e obtenção das amostras de tecido e sangue.....	45
3.5 Avaliações bioquímicas	46
3.5.1 Preparação do homogeneizado.....	46

3.5.2 Dosagem de proteínas	47
3.6 Determinação do estresse oxidativo.....	47
3.6.1 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	47
3.6.2 Determinação da quimiluminescência (QL)	48
3.6.3 Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	49
3.6.4 Avaliação da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx)	50
3.6.5 Avaliação da atividade da enzima catalase (CAT).....	51
3.7 Medidas de Nitritos e Nitratos.....	51
3.8 Avaliação histopatológica dos tecidos	52
3.9 Análise estatística.....	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Alterações hemodinâmicas da pressão portal e glutamina.....	56
4.2 Testes de função hepática (TFH)	57
4.3 Determinação da lipoperoxidação na mucosa gástrica: substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL).....	57
4.4 Determinação da atividade antioxidante enzimática na mucosa gástrica....	59
4.4.1 Superóxido dismutase (SOD)	59
4.4.2 Glutaciona peroxidase (GPx).....	60
4.4.3 Catalase (CAT).....	61
4.5 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) através de nitratos totais	62
4.6 Avaliação histopatológica	63
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8 ANEXOS	88

RESUMO

A hipertensão portal é uma complicação da cirrose com alterações hemodinâmicas, que se caracterizam pelo aumento do fluxo sanguíneo e/ou aumento da resistência vascular no sistema porta. É uma das principais causas da mortalidade entre pacientes cirróticos, devido à hemorragia digestiva alta, provocada pelo surgimento de colaterais portossistêmicos, ou seja, o surgimento de varizes gastro-esofágicas. A glutamina é um aminoácido abundante encontrado no músculo, plasma e tecidos. Ela atua em resposta à ação celular, no sistema imune e serve como substrato para a síntese da glutatona. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da glutamina, por via intraperitoneal, em estômagos de ratos, com ligadura parcial de veia porta (LPVP), avaliando a pressão portal e o estresse oxidativo. Foram utilizados 24 ratos machos Wistar, pesando em média 300g, divididos em 4 grupos: 1. SO (controle); 2. SO + G: (controle tratado com glutamina), a partir do 8º dia, administração de glutamina (25mg/Kg); 3. LPVP: ligadura parcial da veia porta; 4. LPVP + G: ligadura parcial da veia porta e, a partir do 8º dia, administração de glutamina (25mg/Kg). No 15º dia, foi verificada a pressão portal por punção da veia mesentérica dos ratos, através de um polígrafo de pressão Lettica e após a retirada de sangue para as provas de integridade hepática e dos estômagos para as medidas de estresse oxidativo. Foram quantificados os valores de proteínas (Lowry et al, 1951), os níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (Bueges e Aust, 1978) e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (Mirsa e Fridovich, 1983), catalase (Boveris e Chance, 1973) e, glutatona peroxidase (Flohé et al., 1974) e avaliação de nitritos e nitratos pelo reagente de Griess (Granger, 1999) em homogeneizado dos estômagos desses animais. A histologia de estômago foi avaliada pela coloração de hematoxilina e eosina (HE). Foi observado um

aumento da pressão portal no grupo LPVP quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$) e uma redução significativa da pressão portal no grupo LPVP+G quando comparado ao grupo LPVP ($P < 0,05$). Houve também um aumento dos níveis de TBARS e QL e uma redução dos níveis de SOD no grupo LPVP, quando comparado aos grupos controles ($P < 0,05$), bem como uma melhora significativa destes valores no grupo tratado com glutamina ($P < 0,05$). Não houve diferença entre nenhum dos grupos em relação aos níveis séricos das enzimas hepáticas e dos níveis de catalase. Os níveis de glutathione peroxidase no grupo SO+G aumentaram significativamente em relação aos demais ($P < 0,05$). Na avaliação dos metabólitos do NO, observou-se um aumento dos níveis de NO no grupo LPVP em comparação ao grupo LPVP+G ($P < 0,05$). Na análise histológica do estômago observou-se edema e pontos de vasodilatação nos animais LPVP, enquanto no grupo LPVP+G houve redução do edema e da angiogênese. Para análise estatística, foi utilizado análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey-Kramer para múltiplas comparações, sendo o nível de significância adotado de 5% ($P < 0,05$). Este estudo sugere que a administração de glutamina, através da inibição do estresse oxidativo, reduz a pressão portal em animais com ligadura parcial de veia porta.

ABSTRACT

Portal hypertension is a complication of the cirrhosis that is characterized by the increase of the blood flow and/or of the vascular resistance in the portal system. It is one of the principal causes of mortality between cirrhotic patients due to the situation of high digestive hemorrhage in function of the appearance of portosystemic collaterals, characteristic of the gastropathy of portal hypertension. Glutamine is an abundant aminoacid found in the muscle, plasma and tissues. It acts in reply to cellular action, immune system and serves as substrate for glutathione. The objective of this study was to evaluate the action of glutamine, by intraperitoneal way in stomachs of animals with partial ligation of the portal vein (LPVP), evaluating the regulation of the portal pressure and the oxidative stress. 24 male Wistar rats were used, weighing on average of 300g, divided in 4 groups: 1. Sham Operated (SO); 2. LPVP: partial ligation of the portal vein; 3. SO+Glu: from the 8th day administration of glutamine (25mg/Kg); 4. LPVP+Glu: from the 8th day administration of glutamine (25mg/Kg). In 15th day was checked the pressure in the mesenteric vein of the rats through a polygraph of pressure Lettica. Blood samples was used to evaluate the hepatic function. The stomach was used to evaluate the oxidative stress. We quantified the values of proteins, the levels of substances that react to the thiobarbituric acid (TBARS) the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase and nitrites and nitrates levels by the Griess reaction in homogenized of the animals stomachs. We observed an increase of the portal pressure in the group LPVP when compared to the control group ($P < 0,05$) and a significant reduction of the portal pressure in the group LPVP+Glu comparing to the group LPVP ($P < 0,05$). There was also an increase of TBARS and chemiluminescence levels and a

reduction of SOD levels in the group LPVP when compared to the control groups ($P < 0.05$). The glutamine, when administered, reduced the values of TBARS in the group LPVP+Glu and increased the antioxidant enzymes. There was no difference between the groups regarding the plasmatic levels of hepatic function enzymes and catalase. The glutathione peroxidase levels in the group SO + G significantly increased compared to the other groups ($P < 0.05$). In the assessment of the NO metabolites, there was an increase in NO levels in the group LPVP compared to the group LPVP + G ($P < 0.05$). In histological analysis there was edema and points of vasodilation in animals LPVP, while in Group G + LPVP a reduction of edema and in the vessels growth. For statistical analysis we used analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test for multiple comparisons, and the level of significance of 5% ($P < 0.05$). This study suggests that the administration of glutamine, inhibiting the oxidative stress, reduces portal pressure in animals with partial ligation of the portal vein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Circulação venosa portal.....	24
Figura 2 - Aspecto característico em mosaico ou “pele de cobra”	28
Figura 3 - Sangramento das varizes gástricas	28
Figura 4 - Gastropatia severa, observando-se grande quantidade de “cherry red spots”	28
Figura 5 - Formação do óxido nítrico.....	29
Figura 6 - Formação de espécies ativas de oxigênio	31
Figura 7 - Modelo de ligadura parcial de veia porta.....	43
Figura 8 - Preparação para a cirurgia.....	44
Figura 9 - Laparotomia ventral e exposição das alças abdominais	44
Figura 10 - Identificação da veia porta	44
Figura 11 - Ligadura parcial da veia porta	44
Figura 12 - Polígrafo de pressão Lettica.....	46
Figura 13 – Média dos valores da pressão portal entre os grupos estudados	56
Figura 14 - Média dos valores dos testes de integridade hepática entre os grupos estudados.....	57
Figura 15 - Média dos valores de TBARS entre os grupos estudados	58
Figura 16 - Média dos valores de QL entre os grupos estudados	59
Figura 17 - Média dos valores da SOD entre os grupos estudados	60

Figura 18 - Média dos valores da GPx entre os grupos estudados	60
Figura 19 - Média dos valores da CAT entre os grupos estudados.....	61
Figura 20 - Média dos valores dos nitratos totais entre os grupos estudados	62
Figura 21 - Fotomicrografia de estômago de animais do grupo controle (SO) com coloração de hematoxilina-eosina: (A) em aumento (100x) e (B) em aumento (400x)	63
Figura 22 - Fotomicrografia de estômago de animais do grupo com ligadura parcial de veia porta (LPVP) com coloração de hematoxilina-eosina nos aumentos A (25x), B (100x), C (200x) e D (400x).....	64
Figura 23 - Fotomicrografia de estômago de animais do grupo LPVP tratado com glutamina (LPVP+G) com coloração de hematoxilina-eosina, nos aumentos A (25x) e B (100x)	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina-aminotrasferase
AST	Aspartato-aminotrasferase
°C	Graus Celsius
CAT	Catalase
cNOS	Óxido nítrico sintase dependente de cálcio
COX	Ciclooxigenase
cps	Contagem por segundo
CuSO ₄	Sulfato de cobre
CuZnSOD	SOD cobre e zinco
Cu ²⁺	Íon Cobre
e ⁻	Elétron
E	Edema
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro padrão da média
FA	Fosfatase alcalina
Fe ²⁺	Íon ferro
FeSOD	SOD ferro
g	Gramma
G	Glutamina
GHP	Gastropatia da hipertensão portal
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSH	Glutaciona Oxidada
GST	Glutaciona s-transferase
GPx	Glutaciona Peroxidase

HP	Hipertensão portal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
Kg	Quilograma
LDBC	Ligadura de Ducto Biliar Comum
H [•]	Átomo de Hidrogênio
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
KCl	Cloreto de Potássio
L	Litro
LPO	Lipoperoxidação
LPVP	Ligadura parcial de veia porta
LPVP+G	Ligadura parcial de veia porta tratado com glutamina
μ	Micra
μl	Microlitro
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MM	Muscular da mucosa
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol	Micromol
MnSOD	SOD manganês
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico

-	
ONOO	Peroxinitrito
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{·-}	Radical ânion superóxido
OH [·]	Radical Hidroxila
P	Fosfato
PAG	Glutaminase fosfato-dependente
pH	Potencial de Hidrogênio
pmol	picomoles
QL	Quimiluminescência
R	Radical
·ROO	Radical peroxil
ROOH	Peroxido orgânico
rpm	Rotação por minuto
RL	Radical Livre
SM	Submucosa
SO	Sham-operated - controle (simulação da cirurgia)
SO+G	Sham operated – controle tratado com glutamina
SOD	Superóxido Dismutase
t-BOOH	Hidroperóxido de tert-butila
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBA-RS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
TIH	Teste de integridade hepática
TNBS	Ácido trinitro benzosulfônico
U	Unidade
V	Vasodilatação
Zn ²⁺	Zinco

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A hipertensão portal (HP) é a síndrome clínica a qual é usualmente secundária à obstrução intra-hepática ou extra-hepática do fluxo portal. O aumento da resistência do fluxo sanguíneo portal é o fator primário da fisiopatologia da hipertensão portal (1).

O primeiro sangramento por varizes, confirmado por necrópsia, foi descrito em 1840, por Power, que não chegou a reconhecer a hepatopatia subjacente. Em uma série de 60 necrópsias, em 1900, Preble estabeleceu a relação entre cirrose, varizes e sangramento gastrointestinal. O termo hipertensão portal foi usado pela primeira vez por Gilbert e Villaret em 1906 (1).

A hipertensão portal se caracteriza por um aumento da pressão venosa portal, levando a uma conseqüente formação de vasos colaterais, como varizes esofágicas e gástricas, estimulando o desenvolvimento de uma circulação hiperdinâmica esplâncnica (2).

O termo gastropatia portal hipertensiva define o quadro de lesões nas mucosas esofágica e gástrica, que se desenvolvem em indivíduos com hipertensão portal. Estas lesões correspondem aos vasos dilatados da mucosa e submucosa sem a presença de inflamação. O óxido nítrico (NO) é o mediador central desta vasorreatividade e anormalidade angiogênica, que caracteriza a gastropatia portal hipertensiva (3).

O estresse oxidativo está envolvido neste modelo experimental, sendo que a formação de ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), ao reagir com o NO, forma o radical peroxinitrito ($\cdot ONOO$), um poderoso oxidante de proteínas. Na presença de íon hidrogênio (H^+), este pode formar o radical hidroxila ($\cdot OH$), que é altamente reativo e tóxico, aumentando ativamente a ação tóxica da reação entre NO e $O_2^{\cdot-}$, comprometendo ainda mais a integridade vascular (4).

Tendo em vista que na hipertensão portal há o envolvimento do estresse oxidativo e que a administração de glutamina em outro modelo experimental foi efetiva em reduzi-lo, pretendemos avaliar a ação antioxidante da glutamina em modelo experimental de ligadura parcial de veia porta (LPVP), analisando sua ação na pressão portal, integridade hepática, lipoperoxidação, atividade das enzimas antioxidantes, no comportamento do NO e nos aspectos histopatológicos da mucosa gástrica.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Circulação venosa portal

A circulação venosa portal engloba todas as veias que transportam sangue da porção abdominal do tubo digestivo, do baço, do pâncreas e da vesícula biliar (1). O sangue venoso, proveniente destas regiões, chega ao fígado pela veia porta. Desta forma, todo o sangue venoso drenado no trato gastrointestinal passa pelo território capilar sinusoidal hepático antes de atingir a circulação sistêmica. Esta particularidade anatômica é importante para as funções do fígado como principal órgão regulador da homeostase metabólica e como filtro de toxinas e de microorganismos provenientes da absorção intestinal (5)

A veia porta é formada pela união das veias mesentérica superior, esplênica e mesentérica inferior, que ao longo de seus trajetos, vão associando-se às veias gástricas e pancreatoduodenais (5). Estende-se até o hilo hepático, dividindo-se em ramo direito e esquerdo. Possuindo, desta forma, uma distribuição intra-hepática segmentar, acompanhando a artéria hepática (1)

O fígado recebe sangue da artéria hepática e da veia porta, o que representa cerca de 25% do débito cardíaco (cerca de 1.200 ml/min.). Deste total, cerca de 25% são representados pelo suprimento arterial e 75% pela veia porta (5). Este elevado volume sangüíneo é necessário para que o fígado realize todas as suas funções. O fluxo venoso portal possui duas características hemodinâmicas importantes, que são o alto fluxo sangüíneo com baixa resistência e baixa pressão. Em indivíduos adultos, a pressão portal é de cerca 7mmHg (1).

Em função de ser um conjunto de veias que se anastomosam em um mesmo local, sempre que houver uma obstrução na circulação portal, ocorrerá aumento da pressão e desenvolvimento de colaterais que contornarão o local da obstrução, desviando o sangue para a circulação sistêmica. A obstrução pode ser pré, intra ou pós-hepática (6).

Na obstrução intra-hepática, como na cirrose, ocorre inflamação, regeneração e necrose do tecido, alterando a estrutura morfológica do parênquima hepático, aumentando a resistência à passagem do fluxo sanguíneo e a conseqüente formação de colaterais portossistêmicos. Com a obstrução extra-hepática (pré ou pós hepática) da circulação portal, ocorre esplenomegalia, dilatação de vasos esplâncnicos, desenvolvendo uma circulação colateral expressiva que determina o aparecimento de varizes gastro-esofágicas, caracterizando a síndrome da hipertensão portal. (7).

A Síndrome da Hipertensão Portal (HP) é uma doença que se caracteriza pelo aumento da resistência à passagem do fluxo sanguíneo portal. Este aumento gera um incremento na pressão venosa portal, que propicia o desenvolvimento de colaterais portossistêmicos e o desvio do sangue para a circulação sistêmica, contornando o fígado (6).

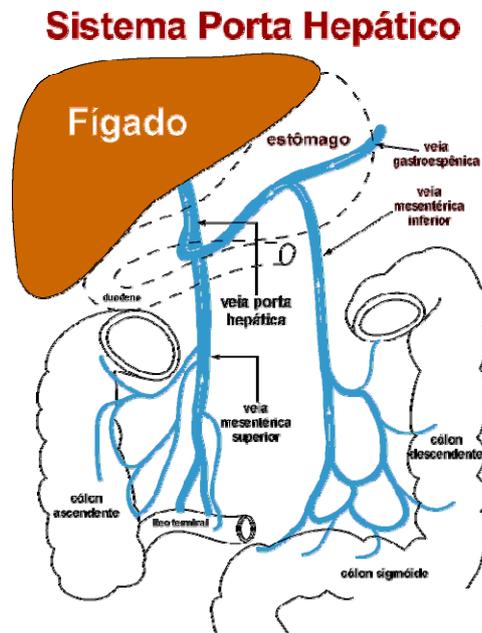


Figura 1: Circulação Venosa Portal

1.2 Hipertensão Portal

A hipertensão portal (HP) é a síndrome clínica a qual é usualmente secundária à obstrução intra-hepática ou extra-hepática do fluxo portal. O aumento da resistência do fluxo sanguíneo portal é o fator primário da fisiopatologia da hipertensão portal (1). Esta é uma das principais causas de mortalidade entre pacientes cirróticos, devido à hemorragia digestiva, decorrente do surgimento de colaterais portossistêmicos (8), principalmente as varizes gastro-esofágicas e a gastropatia da hipertensão portal, além de favorecer outras complicações, como ascite, síndrome hepatorenal e encefalopatia hepática (6, 9).

Em pacientes cirróticos, a hipertensão portal decorre da fibrose tecidual e da regeneração nodular, que fazem com que ocorra uma alteração na arquitetura hepática, aumentando a resistência vascular (10).

A pressão portal tem relação direta com a resistência e com o fluxo de acordo com a lei de Ohm ($\Delta P = Q \times R$) (1, 6). Desenvolvendo-se, fisiopatologicamente, por dois mecanismos (11):

1. Aumento da resistência ao fluxo portal, dividido em 3 tipos, demonstrando que a obstrução pode estar em diferentes localizações: pré-hepática (trombose da veia porta ou esplênica), intra-hepática (nível sinusoidal, cirrose) e pós-hepática (trombose da veia hepática, da veia cava inferior ou cardiopatia congestiva);
2. Aumento do fluxo portal: devido ao surgimento de fístulas artério-venosas de natureza traumática, congênita, aneurisma micótico e arteriosclerose.

1.3 Gastropatia da hipertensão portal

A gastropatia da hipertensão portal é a denominação usada para definir alterações da mucosa gástrica evidenciadas à endoscopia e dependentes da hipertensão porta. O aumento da pressão no território porta determina o desenvolvimento da circulação colateral, dilatação dos vasos e aumento da pressão endovascular. A consequência mais evidente é o aparecimento de varizes esôfago-gástricas e, menos frequentemente, da gastropatia da hipertensão portal. Não há, entretanto, uma correlação direta na prevalência, gravidade e do grau de GHP com os níveis da hipertensão portal, o tamanho das varizes e com a gravidade das doenças subjacentes, em geral cirroses (12, 13).

As evidências macroscópicas da GHP são enantema, edema, aspecto granuloso e em mosaico da mucosa, em graus variáveis. O aparecimento de manchas vermelhas pode estar relacionado com maior gravidade e/ou com alterações vasculares locais (telangectasias) (14). Por muito tempo houve confusão na identificação e diagnóstico destas alterações, pelo desconhecimento da sua fisiopatogenia. A caracterização era de gastrite, gastrite hemorrágica, pontos vermelhos gástricos ou petéquias gástricas, de maneira equivocada, pois não há componente inflamatório nesta entidade clínica (12,15).

Uma consequência grave da GHP é a possibilidade de sangramento agudo, caracterizando hemorragia digestiva superior, menos freqüente que o sangramento por varizes esôfago-gástricas. A anemia crônica em cirróticos pode estar relacionada com a perda continuada de sangue pela mucosa gástrica, em pequena quantidade não evidenciada macroscopicamente, na GHP (14,15).

A fisiopatologia desta condição não é claramente compreendida. Há correlação com a hipertensão porta, com a cirrose, mas não com a intensidade e gravidade destas duas situações. Deve-se considerar alterações locais da mucosa, tanto hemodinâmicas como de permeabilidade, que influenciam na sua expressão e podem determinar nuances na sua piora ou melhora, mesmo com a permanência da doença de base. As possibilidades de mudanças nas características da GHP, com piora ou melhora, em vigência da hipertensão portal sugerem que possam haver outros mecanismos locais implicados no processo (14,15).

As lesões na mucosa gástrica podem ser caracterizadas como leves ou severas (14). O padrão de mosaico, que caracteriza lesões leves, é definido por áreas rosadas e avermelhadas da mucosa gástrica semelhante à couro de cobra. Esta é a mais comum alteração da mucosa gástrica em pacientes com hipertensão portal e predomina nas áreas do corpo e fundo do estômago (15). A gastropatia severa é caracterizada pela presença de pontos vermelho escuros ("cherry red spots") (16). Em estudos endoscópicos com grande amostragem de cirróticos assintomáticos, mais que 50 % apresentam sinais de gastropatia hipertensiva portal, sendo o achado mais comum o padrão mosaico ou em pele de cobra no estômago proximal (15, 16). Estas lesões severas são caracterizadas por manchas avermelhadas, "red spots", que podem evoluir para áreas hemorrágicas. Estes pontos podem aparecer por toda a mucosa, incluindo fundo, corpo e antro (17).

Essas alterações vasculares são relacionadas a uma gama de disfunções da mucosa gástrica que a predispõem a lesões por agentes como a aspirina, sais biliares e álcool (18). A atividade secretória gástrica está diminuída (19). Um dos fatores mais importantes para a aumentada sensibilidade da mucosa gástrica ao

dano é uma redução na resposta hiperêmica, quando essa mucosa é exposta a agentes irritantes (20). Esta parece estar relacionada a uma redução na produção de prostaglandinas e alteração na resposta microcirculatória ao óxido nítrico. Uma vez que há lesão da mucosa gástrica, há aumento do fluxo sanguíneo, aumentando o risco de sangramento significativo(18).

As alterações que se desenvolvem e dão origem à GHP são dependentes da dilatação dos vasos da mucosa e submucosa do estômago e do aumento do fluxo sanguíneo nestes locais, conseqüências da circulação hiperdinâmica no território esplâncnico. Os achados histológicos característicos são sugestivos de congestão vascular, com dilatação e tortuosidade das veias submucosas, ectasia dos capilares e das veias mucosas e fibrose perivenular (23).

Aumento do fluxo sanguíneo gástrico total foi demonstrado na hipertensão portal experimental e em pacientes portadores de gastropatia hipertensiva portal (18, 19). Os estudos demonstraram, através de fluxometria doppler, o estresse hemocinético da mucosa gástrica na gastropatia hipertensiva portal. Tal achado pode ser explicado pela superprodução de óxido nítrico na hipertensão portal (20). As mudanças na mucosa parecem resultar de uma combinação do aumento do fluxo sanguíneo gástrico, alterações na sua distribuição e estase, como conseqüência do aumento da resistência vascular portal e congestão venosa portal (15). Aceita-se que decorram da presença de níveis elevados de vasodilatadores e menor sensibilidade local à vasoconstritores. Dependendo, excessivamente, da liberação de óxido nítrico e prostaglandinas, ambas de origem endotelial (21).



Figura 2: Aspecto característico em mosaico ou "pele de cobra"

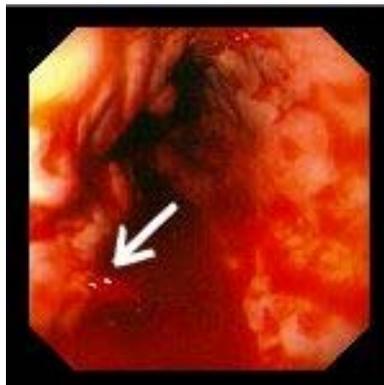


Figura 3: Sangramento das varizes gástricas

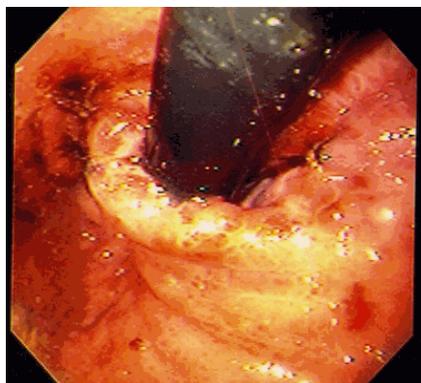


Figura 4: Gastropatia severa, observando-se grande quantidade de "cherry red spots"

1.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxico, devido à presença de radical livre, o que o torna um agente químico reativo (22). Pode atuar como oxidante ou redutor dependendo do meio em que está e é rapidamente destruído pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitritos e nitratos (23).

Palmer et al. (1987) sugeriram que o óxido nítrico estaria envolvido no relaxamento endotelial vascular e que sua atividade poderia ser potencializada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (24).

Várias células utilizam a arginina para sintetizar o óxido nítrico. Nas células do endotélio vascular, na presença do oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz o radical livre gasoso NO e a L-citrulina, em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). O óxido nítrico atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa (23).



Figura 5: Formação do NO

O óxido nítrico liberado por células endoteliais difunde-se não só para a parede do vaso, mas também para sua luz, onde inibe a adesão e a agregação plaquetária. Plaquetas produzem óxido nítrico que participa do mecanismo de “feedback”

negativo no processo de ativação plaquetária e é capaz de inibir o processo de ativação leucocitária. Mesmo sendo uma molécula simples, sua síntese enzimática é bastante complexa. As NO sintases (NOS) pertencem à família enzimática que sintetiza o NO e são enzimas que utilizam como substratos a forma reduzida do fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e moléculas de oxigênio. São subdivididas, em função da sua atividade, em constitutivas (cNOS) e induzidas (iNOS). Acredita-se que a forma constitutiva poderia ser induzida, conforme as circunstâncias. Independente dessa subdivisão, as NOS são descritas como três isoformas, baseadas em três genes diferentes, que foram seqüenciados. As isoformas são: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS); óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A forma cNOS constitutiva, dependente de cálcio, é encontrada em células endoteliais (eNOS) e em células neuronais (nNOS) (7, 25, 26).

Quanto à ação de cada uma das NOS, sabe-se que a eNOS, encontrada no endotélio vascular, gera baixas concentrações de NOS, favorece a diminuição da pressão sangüínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária; a nNOS gera NO, regula a transmissão neuronal e responde por funções de um neurotransmissor; as iNOS formam NO induzido por certas citotoxinas, por hepatócitos independentes de Ca^+ e dependente de calmodulina, e por macrófagos. Este NO está intimamente ligado aos processos de defesa do organismo e, em função da produção excessiva, relaciona-se aos processos destrutivos teciduais na inflamação aguda ou crônica e na apoptose celular (26).

Apesar desta duplicidade de funções, acredita-se que os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos estejam vinculados aos níveis de concentração e, quando atuam em baixas concentrações, comportam-se como mensageiro e fator de proteção celular (antioxidante), interagindo com metais de transição e outros radicais livres. Em concentrações altas e formando trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) ou peroxinitrito (ONOO), o NO passa a agir como espécie ativa de nitrogênio, responsável por

ações citotóxicas causadas por este gás, entre elas as da fisiopatologia da inflamação, choque circulatório e lesões por isquemia-reperfusão (25-27).

Recentemente, o radical livre NO tem sido apresentado como importante sinalizador para manutenção da homeostasia, assim como um notável agente em efeitos citotóxicos que envolvam inúmeras doenças (28). Com bases nos trabalhos já publicados, são conhecidas algumas alterações do NO no metabolismo dos tecidos, agindo, ora como um mecanismo protetor antioxidante, ora como um agente citotóxico (9, 25).

1.5 Estresse oxidativo

Um radical livre é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. A molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um birradical que possui dois elétrons desemparelhados, sendo um bom agente oxidante, capaz de oxidar outros átomos ou moléculas, aceitando um par de elétrons. Este processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia, pode gerar espécies ativas de oxigênio (EAO) (27).

Podemos citar como radicais livres o radical hidroxila (OH^\bullet), o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o óxido nítrico (NO). As EAOs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ser formadas durante o metabolismo normal de qualquer célula através da perda de elétrons de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por não-radical (Halliwell & Gutteridge 2007) e estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres (29).

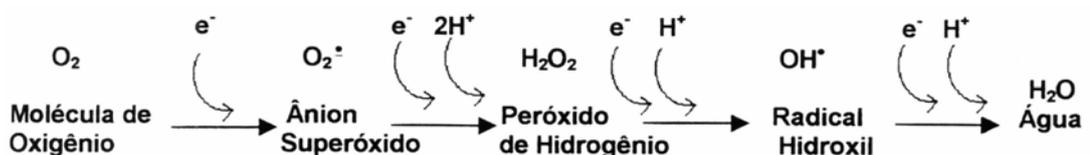


Figura 6: Formação de espécies ativas de oxigênio e radicais livres

Os radicais livres podem desencadear o processo de lipoperoxidação e conduzir ao dano celular. A lipoperoxidação consiste em reações em cadeia, onde é necessário que espécies ativas de oxigênio ataquem uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um agrupamento químico. Sabe-se que o estresse oxidativo é uma situação em que existe aumento das espécies ativas de oxigênio (EAO) em relação aos seus níveis fisiológicos normais, ocasionado pelo desbalanço entre as defesas antioxidantes e pró-oxidantes (27).

O estresse oxidativo atua modulando o tônus vascular hepático, seja pela alteração da arquitetura vascular hepática, ou pela contração das células estreladas e endoteliais dentro do fígado. Este aumento da resistência vascular hepática pode ser atribuído a uma redução intra-hepática da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e ainda à liberação de vasoconstritores, como endotelina e COX-2. Esta diminuição da biodisponibilidade de NO, gerada pelo estresse oxidativo, ocorre pela atuação de varredores de NO, como, por exemplo, o ânion superóxido, um radical livre (30).

O papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica foi associado à hipertensão portal, inicialmente, por Moore, através do modelo experimental de ligadura parcial de veia porta em ratos (30).

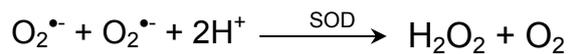
1.6 Defesas antioxidantes

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados por sistemas de defesa antioxidante não enzimático, como vitaminas e/ou enzimático, principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST), que é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias, que impedem a

propagação da LPO, e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (29, 31).

O sistema enzimático encarregado da detoxificação das EAO é formado por várias enzimas, das quais pode-se destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx).

A SOD forma um grupo de enzima que catalisa a reação de dois ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), com conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (31).



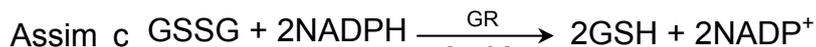
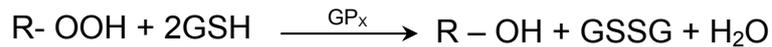
A SOD é classificada em três tipos distintos: SOD cobre e zinco (CuZnSOD), presente no citoplasma das células de eucariontes; SOD manganês (MnSOD), localizada na matriz mitocondrial e SOD ferro (FeSOD) que ocorre em bactérias (31).

Outra enzima importante é a CAT. O peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion superóxido, é transformado em água e oxigênio por ação dessa enzima. A catalase tem uma ação muito específica, já que atua em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (31).



Entre as peroxidases, que geralmente usam o grupo heme, destaca-se a atividade da glutaciona peroxidase (GP_x), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos, através da oxidação da glutaciona reduzida (GSH), que será, por sua vez,

regenerada por ação da glutathione redutase com consumo de NADPH. Neste processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, formando glutathione dissulfeto (GSSG) (31).



antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias que atuam como antioxidantes, evitando reações em cadeia, como a LPO. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não-enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathione, o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), β -carotenos e flavonóides (8, 32-34).

Essas substâncias, quando atuam, podem evitar a formação de RL ou EAO, suprimir uma cadeia de peroxidação na fase de propagação e reparar ou reconstruir a membrana. Elas vêm sendo utilizadas no tratamento e/ou na prevenção de doenças, visando a avaliação de novas drogas sobre o processo inflamatório ou associação de drogas para obtenção de melhores resultados. Uma das substâncias eventualmente utilizadas é a glutamina.

1.7 Glutamina

A glutamina atua como substrato energético para a maioria das células e também é um importante precursor para nucleotídeos, glutamato e, em particular, para a síntese de glutathione (35, 36). Está presente em diferentes tecidos, em que este aminoácido desempenha diferentes funções fisiológicas. A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no corpo, tornando-se um importante combustível e precursor metabólico para as células imunes (37, 38).

Em humanos, representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres no plasma. Não era considerado um aminoácido essencial porque é sintetizado pelo organismo. Contudo em algumas condições como trauma, septicemia e câncer e,

eventualmente, no esforço físico extremo, a concentração intracelular e do plasma desse aminoácido diminui em até 50%. Assim, quando a demanda é maior que a produção estabelece-se um quadro de deficiência de glutamina e, por esta razão, este aminoácido foi recentemente reclassificado como essencial (36).

A teoria dos RL propõe que as espécies ativas de oxigênio (EAO) em excesso causam dano oxidativo no decorrer da vida do indivíduo. O sistema da glutathione é um dos maiores mecanismos de redução do estresse oxidativo. A glutamina fornece a fonte de glutamato para este sistema em muitos sítios, como fígado e músculo esquelético, e tem sido utilizada para preservar os níveis de glutathione total em modelos hepáticos e intestinais (39).

No cérebro, a glutaminase fosfato-dependente (PAG) desempenha um papel chave na síntese do neurotransmissor excitatório glutamato que, na verdade, é utilizado como um precursor do neurotransmissor inibitório GABA. Além disso, a enzima regula as concentrações cerebrais de glutamina e glutamato, que são muito importantes em processos como a detoxificação de amônia (40).

Elia *et al.*, (1997) relatam que a glutamina tem múltiplos efeitos na estrutura e função do trato gastrointestinal (TGI), além de efeitos na redução da morbidade e mortalidade em modelos animais com dano neste local. O TGI é um dos maiores sítios de utilização da glutamina, obtida a partir da circulação sistêmica, sendo consumida em mais da metade do território esplâncnico (aproximadamente 15g/dia). A glutamina ingerida pela dieta (aproximadamente 5g/dia) é menos importante que a glutamina circulante, especialmente em condições de doença, associadas com redução substancial na ingestão de alimento (41).

Mostrou-se em modelos experimentais e clínicos que em todas as situações com hipercatabolismo, ou seja, cirurgias, ferimentos, queimaduras, ocorre uma deficiência intracelular de glutamina, com uma aceleração muscular, efluxo de glutamina no pulmão e dano epitelial no intestino (42).

Tendo em vista estas considerações nos propomos a desenvolver o modelo de hipertensão portal e nessa situação analisar o envolvimento do estresse oxidativo e a possível proteção da glutamina sobre a mucosa gástrica desses animais, uma vez que o quadro de hipertensão portal leva ao desenvolvimento da gastropatia da hipertensão portal e suas conseqüências, que ainda não possuem um tratamento padrão adequado e eficaz.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar o efeito da glutamina na mucosa gástrica de ratos com ligadura parcial de veia porta, como um modelo experimental de Hipertensão Portal (HP).

2.2 Objetivos específicos

1. Mensurar a pressão portal através de medição da veia mesentérica de todos os grupos de animais;
2. Avaliar os testes de função e integridade hepática, através de medidas de concentração sérica de transaminases (AST e ALT) e fosfatase alcalina (FA) dos animais tratados com glutamina e veículo;
3. Avaliar a lipoperoxidação, utilizando os métodos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL) em estômago de ratos com hipertensão portal tratados com glutamina e veículo;
4. Avaliar as enzimas antioxidativas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx);

5. Avaliar a presença de NO através de nitritos e nitratos plasmáticos de ratos com hipertensão portal;
6. Avaliar as alterações histopatológicas em estômago de ratos com hipertensão portal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento da Pesquisa

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo e, para isso, foi realizada a indução do desenvolvimento da hipertensão portal, por ligadura parcial de veia porta (LPVP).

3.2 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar (n=6), pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclos de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. A água e a ração foram administradas livremente, sendo tratados diariamente com água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil).

Os procedimentos com os animais foram de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação de Clínicas de Porto Alegre (43).

3.3 Grupos experimentais

O modelo utilizado foi de hipertensão portal através de ligadura parcial de veia porta (LPVP), e os animais foram divididos em quatro grupos:

- I. **Controle + Veículo (SO – sham-operated)** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem a LPVP e administração de Veículo (NaCl), por 7 dias;
- II. **Controle + Glutamina (SO - sham-operated + G)** - Grupo submetido à simulação da cirurgia, sem a LPVP e tratamento com glutamina, por 7 dias;
- III. **Hipertensão Portal + Veículo (LPVP)** - Grupo submetido à cirurgia de LPVP e administração de Veículo (NaCl), por 7 dias;
- IV. **Hipertensão Portal + Glutamina (LPVP + G)** - Grupo submetido à cirurgia de LPVP e tratamento com glutamina, por 7 dias.

Os animais foram mantidos, após o procedimento cirúrgico, em gaiolas individuais devidamente identificadas. Foram registrados seus pesos no início do experimento (momento da cirurgia) e no momento da morte.

3.4 Procedimentos experimentais

3.4.1 Desenvolvimento do modelo de hipertensão portal pela ligadura parcial de veia porta

Os animais foram anestesiados com cetamina 100mg/Kg e xilazina 50mg/Kg por via intraperitoneal. Após uma incisão mediana no abdome (na linha alba), as alças intestinais foram retiradas delicadamente por sobre uma gaze umidificada com soro fisiológico e a veia porta foi isolada. Uma agulha de 20G foi colocada sobre a veia porta e ambas amarradas em fio de seda 3.0, após a agulha foi retirada

delicadamente, sendo necessário certificar-se de que não houvesse ocorrido a trombose da veia porta durante sua manipulação (44).

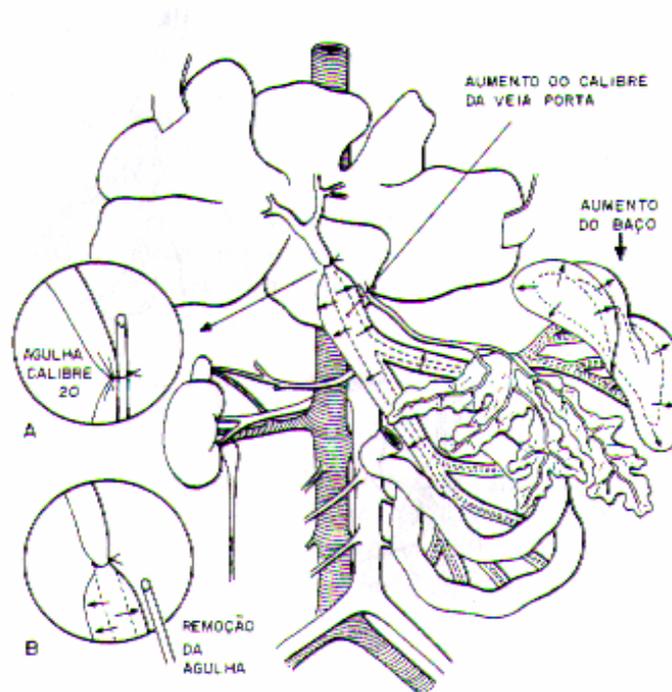


Figura 7: Modelo de ligadura parcial de veia porta (37).

As alças intestinais foram colocadas delicadamente no abdome e, com pontos contínuos, fechou-se o peritônio, tendo-se, antes o cuidado de infundir cerca de 10mL de solução fisiológica na cavidade abdominal. A parede exterior foi fechada com pontos isolados. Uma solução antiséptica foi aplicada e os animais foram colocados em gaiolas individuais até o dia dos experimentos.

Os animais controle ou operados ficticiamente (SO) sofreram o mesmo procedimento, não tendo, no entanto, a veia porta parcialmente ligada.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso à água e ração, até o dia do experimento, quinze dias após a constrição parcial da veia porta ou da cirurgia fictícia.



Figura 8: Preparação para a cirurgia

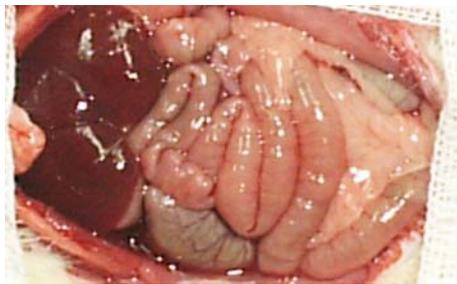


Figura 9. Laparotomia ventral e exposição visceral

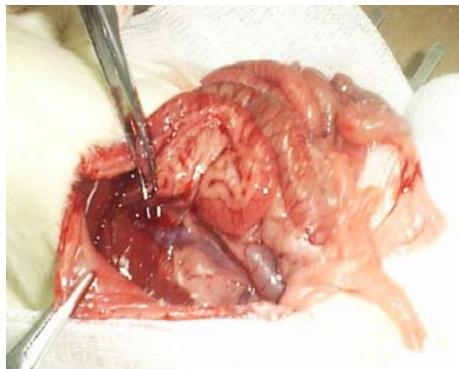


Figura 10. Identificação da veia porta

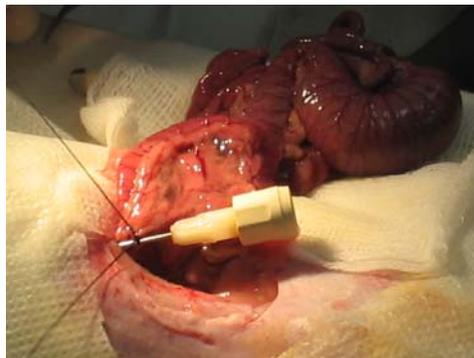


Figura 11. Obstrução por ligadura parcial

3.4.2 Administração do veículo e da glutamina

O tratamento com a glutamina iniciou-se a partir do 8º dia do procedimento cirúrgico, diariamente, por via intraperitoneal, na dose de 25 mg de glutamina por Kg de peso do animal. Os animais controle receberam o veículo (solução fisiológica – NaCl 0,9%) no volume de 1mL.

3.4.3 Aferição da pressão venosa portal, morte dos animais e obtenção das amostras de tecido e sangue

Transcorridos quinze dias do desenvolvimento do modelo e sete dias de administração de glutamina ou veículo, conforme o grupo, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilasina (10 mg/kg) intraperitonealmente.

Primeiramente, foi coletado sangue pela técnica da punção do plexo veno retro-orbital, com tubo microcapilar de vidro, e este material foi utilizado para avaliar integridade hepática, por meio das análises da aspartato-aminotransferase (AST), da alanina-aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA).

Posteriormente, realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com uma laparotomia ventral média e exposição das alças intestinais. A aferição da pressão portal foi realizada através de um catéter introduzido na veia mesentérica, ligado a um polígrafo que registrou a pressão e expressou o valor aferido em mmHg (**figura 12**).

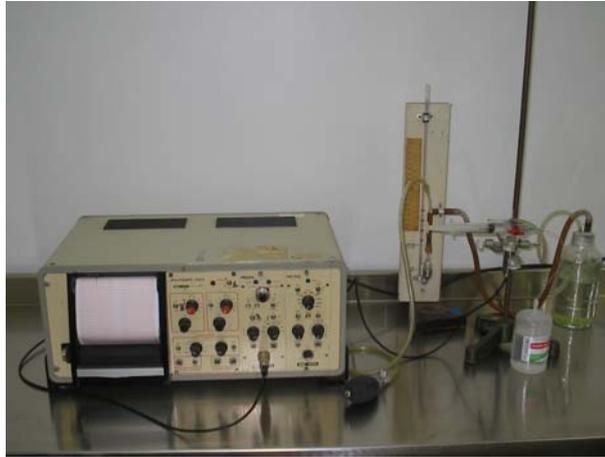


Figura 12. Polígrafo de pressão Lettica

Foram retirados o fígado, o baço (somente para pesagem) e o estômago, sendo este pesado para ser armazenado:

1º) Um pequeno fragmento do estômago foi retirado e emergido em Bouin por 12 horas e, após, em formol 10%, para posterior análise histológica;

2º) O restante do estômago foi pesado e congelado a -80°C para as análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes e avaliação de nitritos e nitratos. O baço foi apenas pesado e, após, desprezado.

3.5 Avaliações bioquímicas

3.5.1 Preparação do homogeneizado

Após a aferição da pressão portal, foi retirado o estômago para a avaliação da QL e TBA-RS (avaliação da peroxidação lipídica). Após serem retirados, os estômagos foram secados e pesados. Colocou-se 5mL de tampão fosfato (KCL 140mM, fosfato 20mM) por grama de tecido. O estômago foi cortado com tesoura e, em seguida, homogeneizado em Ultra Turrax (IKA-WERK), por 1 minuto à

temperatura de 0-2 °C. Este homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada por 10 min a 3000rpm. O precipitado foi desprezado e, o sobrenadante, utilizado para as análises.

3.5.2 Dosagem de proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de estômago foi determinada utilizando-se, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 µL). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20µL) em 780 µL de água destilada e 2,0 mL do reativo C, que foi preparado com 50 ml de NaHCO₃, 0,5 mL do reativo B1 (CuSO₄.H₂O 1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguardaram-se 10 minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após 30 minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm (45).

3.6 Determinação do estresse oxidativo

3.6.1 Determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Foi determinada a lipoperoxidação, através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e a conseqüente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos

da lipoperoxidação, formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitou-se cada tubo, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína (46).

3.6.2 Determinação da quimiluminescência (QL)

O método para determinar a quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de *tert*-butila consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de *tert-butila*) ao homogeneizado do tecido em estudo. Avalia-se a capacidade de resposta mediante à determinação de quimiluminescência (QL) produzida por amostra. Em tecidos submetidos a estresse oxidativo, o valor da QL iniciada por hidroperóxido de *tert-butila* (t-BOOH) é maior do que o valor correspondente a esse tecido em condições fisiológicas (pré-estresse).

A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio (Liquid Scintillation Corenter, 1209 RACKBETA, LKB Wallar) operando como um luminômetro. Adicionou-se 3,5 mL de tampão fosfato em viais de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos viais ativada pela luz fluorescente, eles foram protegidos da luz até o momento do uso e as determinações feitas em sala escura. Primeiramente, realizou-se apenas a leitura dos viais com tampão (QL Basal). Após, adicionou-se 0,5 mL de homogeneizado de tecido e fez-se a leitura, que corresponde a QL espontânea. Em seguida, foi adicionado o hidroperóxido de *tert-butila*, que aumenta a QL (QL Máxima). A reação total consiste de uma solução reguladora de tampão fosfato e de t-BOOH 3 mM.

Para cálculo de QL, iniciada por t-BOOH, foi considerada a emissão máxima (QL Máxima), descontada a emissão da QL espontânea (a QL do vial contendo o tampão e a amostra). Os resultados foram expressos em contagem por segundo (cps) por mg de proteína (47).

3.6.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade desta enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o $O_2^{\bullet-}$.

A reação catalisada é a seguinte:



A técnica de medida da SOD foi baseada na inibição dessa reação. Para isto, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adenocromo, produzindo $O_2^{\bullet-}$ que é o substrato da enzima. Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, fez-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), esta corresponde a 100% da reação. Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionaram-se diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina).

Para cada amostra medida, repetiu-se os seguintes passos:

1. Colocou-se 950 μ L de tampão junto com 50 μ L de amostra e 17 μ L de adrenalina, após o aparelho ser zerado.

2. Introduziu-se 975 μL de tampão junto com 25 μL de amostra e 17 μL de adrenalina, após o aparelho ser zerado.
3. Acrescentou-se 990 μL de tampão junto com 10 μL de amostra. Com os 17 μL de adrenalina, procedeu-se da mesma forma que nos itens anteriores.

Todas as medidas anteriormente citadas correspondem ao valor de (b). Ao valor de (a) somente corresponde a leitura até ser zerado o aparelho (48).

3.6.4 Atividade da enzima glutathiona peroxidase(GPx)

A enzima catalisa a redução do H_2O_2 , utilizando o GSH como um doador de hidrogênio.



A atividade da GPx pode ser estudada, medindo a velocidade de consumo de NADPH em um sistema que contenha GSH.



A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo-se a velocidade de oxidação de NADPH em uma mistura de reação. Em uma cubeta, foram colocados 500 μL de solução reguladora de fosfatos de potássio (100 mM, pH 7,0), 100 μL de H_2O bidestilada, 50 μL de Azida Sódica 20mM, com 50 μL de glutathiona reduzida (GSH) 40mM, 50 μL de glutathiona redutase (GR) e 50 μL NADPH. Essa mistura foi encubada durante 3 minutos, e, logo após, se adicionaram 100 μL de amostra diluída e 100 μL de H_2O_2 . As amostras foram lidas a 340 nm. A atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína (49).

3.6.5 Atividade da enzima catalase (CAT)

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segundo a seguinte reação.



A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem com respeito ao peróxido de hidrogênio. O ensaio consistiu em medir a diminuição da absorção a 240 nm (longitude de onda pela qual absorve o peróxido de hidrogênio).

A medida espectrofotométrica consistiu em colocar nas cubetas o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mM) com distintas alíquotas da amostra. Depois, fez-se um gráfico com uma linha de base. Em seguida, adicionaram-se 20 μL de H_2O_2 300 mM. A concentração foi expressa em pmol/g de tecido (50).

3.7 Medida de nitritos e nitratos

Inúmeras células em diferentes tecidos do corpo humano podem produzir óxido nítrico (NO) sendo que, na ausência de estimulação imunológica, a maior parte do NO é produzida pelas células endoteliais e do sistema nervoso central. É uma substância extremamente lábil, com uma meia-vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Assim sendo, a atividade “in vivo” do NO deve ser monitorizada indiretamente, pois o óxido nítrico rapidamente se oxida em nitritos e predominantemente em nitratos. O NO é uma substância extremamente lábil, com uma meia vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Dessa forma, a medida do NO fez-se de forma indireta, através da medida de nitritos e nitratos.

Esse método consiste na transformação de nitratos e nitritos, por meio da enzima nitrato redutase. Para isso, utilizou-se, posteriormente, o reativo de Griess.

Para realizar a técnica, foram necessários 500 μL de amostra, 100 μL NADPH (0,2 mM), 70 μL Tris Buffer 1M, pH 7,5, 230 μL de uma mistura formada por glicose 6-fosfato (50 mM) e glicose 6-fosfato dehidrogenase (100 U/mL), 100 μL de nitrato redutase (10/mL), essa mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Posteriormente, utilizaram-se 750 μL dessa mistura e adicionaram-se 750 μL do reativo de Griess, incubando-a novamente, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A leitura foi realizada a 550 nm e feita uma curva padrão para a determinação de nitritos e nitratos (51).

3.8 Avaliação histopatológica dos tecidos

O exame histopatológico foi realizado no laboratório de patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, por um patologista que desconhecia os grupos estabelecidos no delineamento experimental.

Para a dissecação anatômica, os estômagos foram colocados em Bouin por 12 horas e, após, em formol 10%. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomo (Leitz[®]1512), onde se realizaram cortes com 3 micra (3 μ). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante 5 minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina, utilizando-se Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular *Nikon Labophot* nos diferentes aumentos.

3.9 Análise estatística

A partir dos dados coletados, as médias e os erros padrões das médias de cada grupo foram calculadas, utilizando para análise estatística o software Graphpad Instat, versão 3.0 para Windows XP2000. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey-Kramer para múltiplas comparações, sendo o nível de significância adotado de 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

A apresentação dos resultados segue a seguinte ordem no modelo experimental utilizado nesta pesquisa:

1. Verificação da alteração da pressão portal dos animais e a ação da glutamina;
2. Verificação da integridade hepática, através dos níveis séricos das aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT), e da fosfatase alcalina (FA);
3. Avaliação dos efeitos da HP e das substâncias antioxidantes na oxidação de lipídios na mucosa gástrica, mediante a determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS);
4. Quantificação da atividade enzimática antioxidante na mucosa gástrica nos diferentes grupos, através da medida das concentrações das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx);
5. Avaliação dos metabólitos do NO (Nitritos e Nitratos) na mucosa gástrica;
6. Análise dos efeitos da glutamina sobre a mucosa gástrica, através da determinação dos aspectos histológicos, pela técnica de hematoxilina e eosina

4.1 Alterações hemodinâmicas da pressão portal e a ação da glutamina

Houve aumento estatisticamente significativo na pressão portal dos grupos LPVP em relação ao grupo SO, bem como nos grupos LPVP em relação ao grupo LPVP+G. Nota-se que entre os grupos controle (SO) não houve diferença estatisticamente significativa.

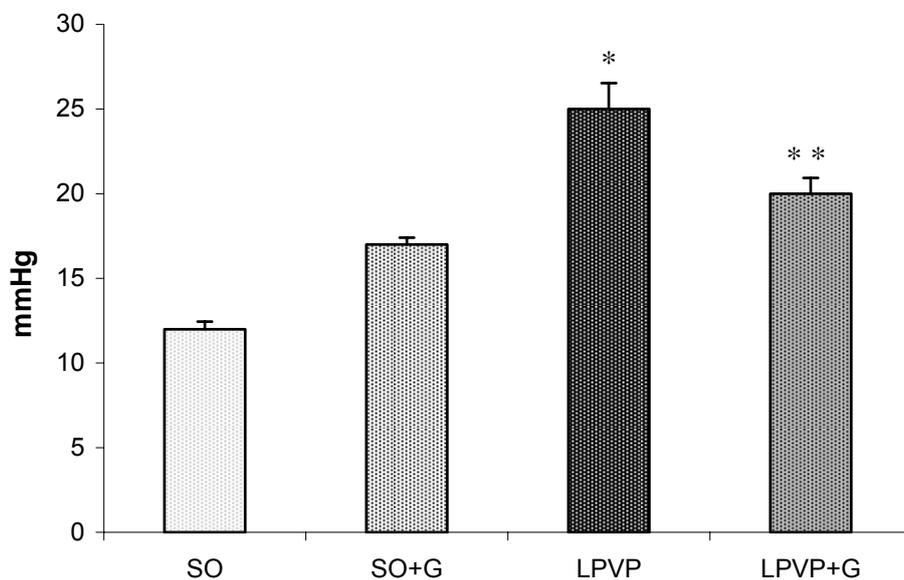


Figura 13 – Média dos valores da pressão portal entre os grupos estudados

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem $n = 6$ animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

* diferença significativa do grupo LPVP em relação ao grupo SO ($P < 0,001$)

** diferença significativa do grupo LPVP+G em relação ao grupo LPVP ($P < 0,001$)

4.2 Teste de integridade hepática (TIH)

Nos testes de integridade hepática (TIH), foram avaliadas as transaminases (AST e ALT) e a fosfatase alcalina (FA), expressas em U/L. Os valores encontrados para as TIH não foram estatisticamente significativos entre os quatro grupos.

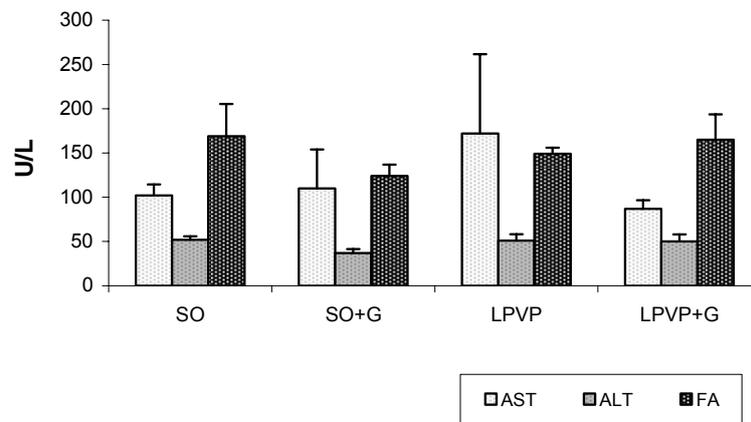


Figura 14: Média dos valores dos testes de integridade hepática entre os grupos

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=6 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

Não houve diferença significativa entre os grupos, com $p > 0,05$.

4.3 Determinação da Lipoperoxidação na mucosa gástrica: substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL)

Os valores de lipoperoxidação na mucosa gástrica, visto na **(Figura 15)**, avaliados através do método das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), demonstram aumento significativo no grupo LPVP em relação a todos os demais grupos, sendo $P < 0,001$ em relação aos grupos controle (SO e SO+G) e LPVP tratados com glutamina (LPVP+G). Não houve diferença significativa entre o grupo LPVP+G quando comparados aos grupos controle (SO e SO+G). Os valores verificados através da quimiluminescência (QL), **(Figura 16)**, demonstraram aumento no grupo LPVP em relação a todos os demais grupos, sendo $P < 0,05$ em

relação aos grupos controle (SO e SO+G) e LPVP tratados com glutamina (LPVP+G). Também não houve diferença significativa entre o grupo LPVP+G quando comparados aos grupos controle (SO e SO+G), semelhante aos resultados da técnica de TBA-RS.

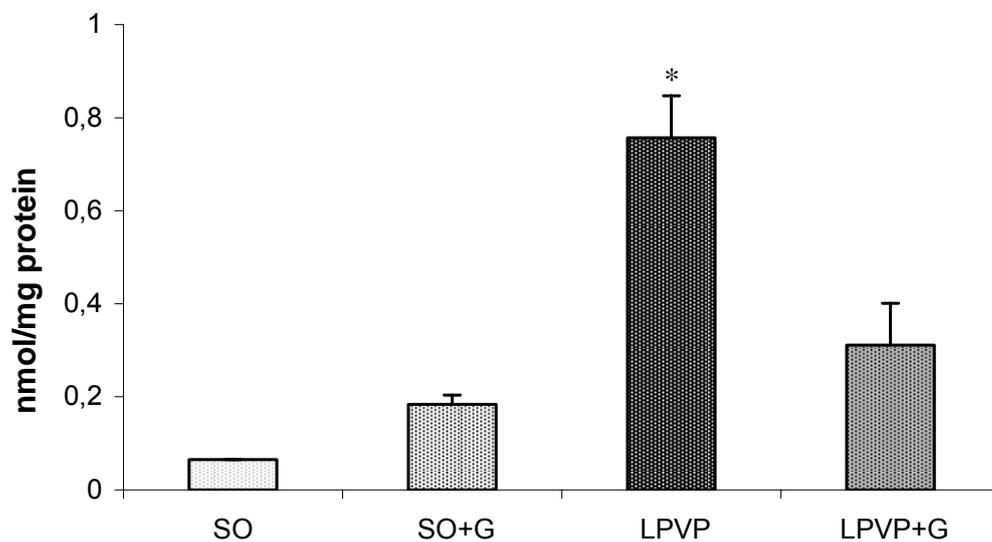


Figura 15: Média dos valores de TBA-RS entre os grupos estudados.

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=6 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

* diferença significativa do grupo LPVP em relação ao grupo SO, SO+G e LPVP+G ($P < 0,001$)

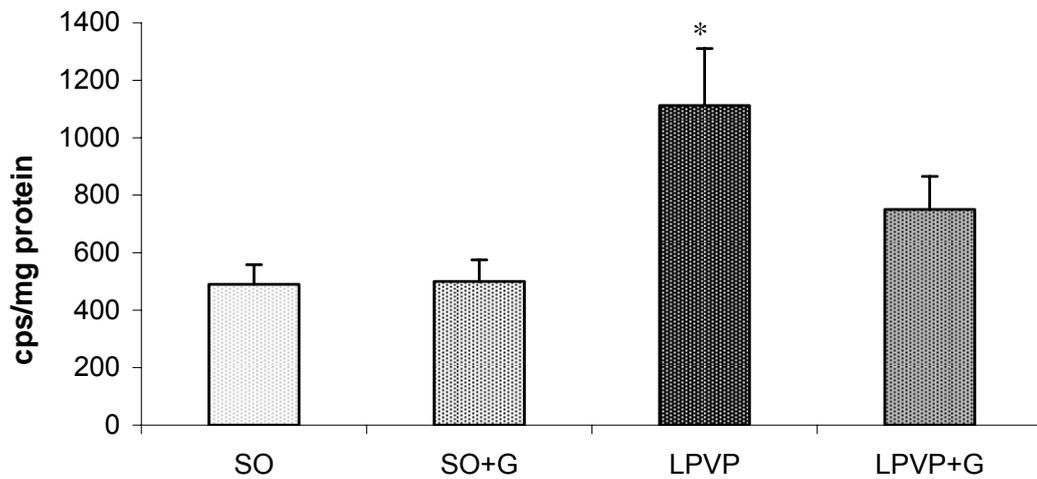


Figura 16: Média dos valores da QL entre os grupos estudados.

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem n=6 animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

* diferença significativa do grupo LPVP em relação ao grupo SO, SO+G e LPVP+G ($P < 0,05$)

4.4 Determinação da atividade antioxidante enzimática na mucosa gástrica

4.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

Na **figura 17**, são apresentados os resultados da atividade da enzima superóxido dismutase no homogeneizado de estômago, mostrando uma diminuição significativa no grupo LPVP em relação ao grupo LPVP+G.

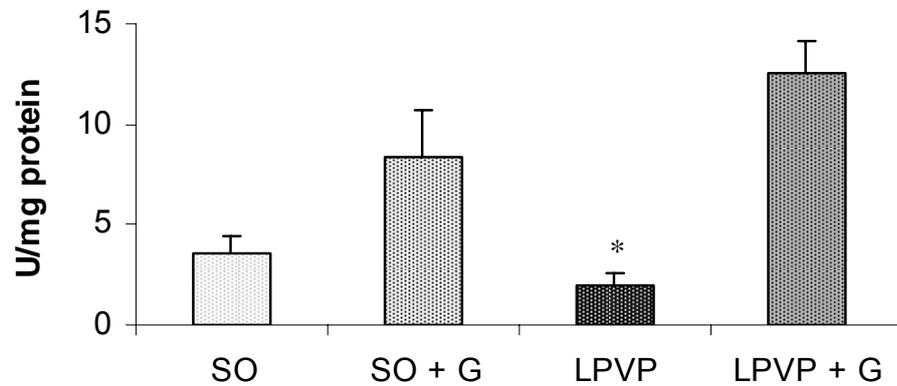


Figura 17: Média dos valores da enzima antioxidante SOD entre os grupos estudados.

* diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ($P < 0,05$)

4.4.2 Glutathiona peroxidase (GPx)

Na **figura 18**, são observados os valores da atividade da enzima glutathiona peroxidase no homogeneizado de estômago de ratos.

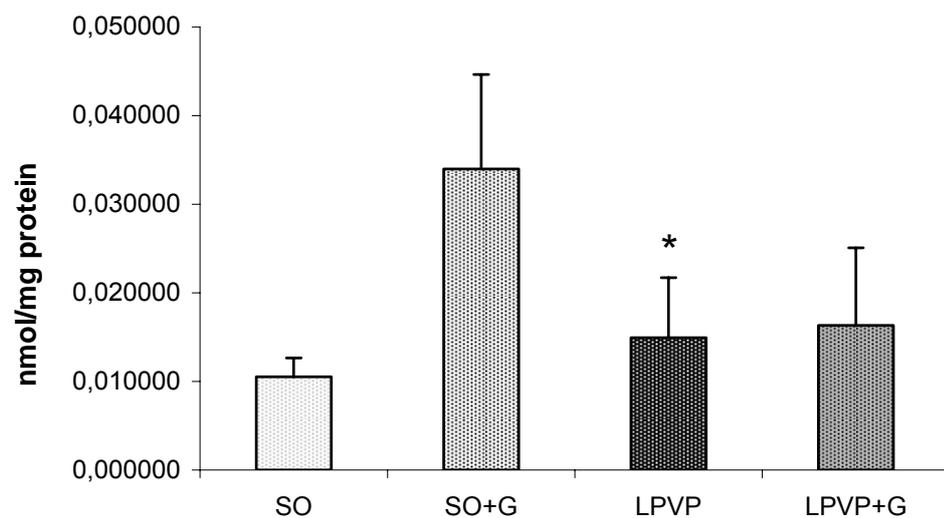
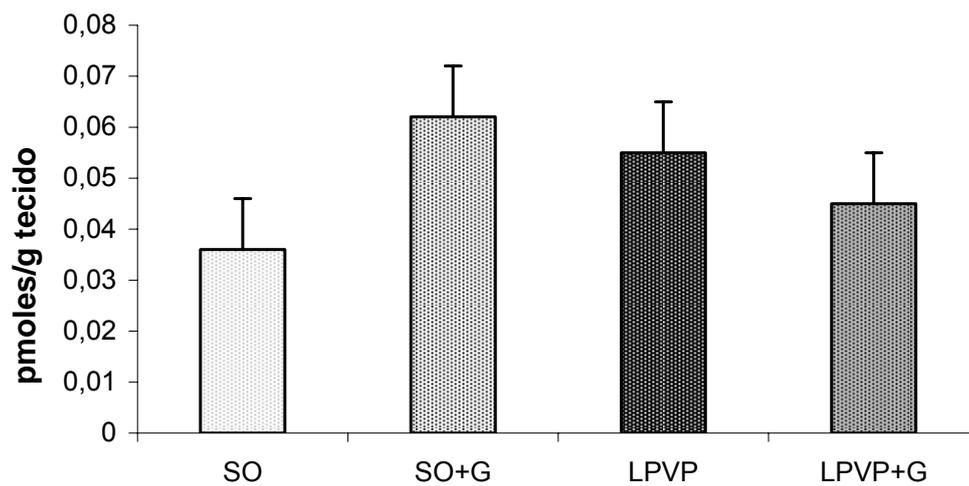


Figura 18: Média dos valores da enzima antioxidante GPx entre os grupos estudados.

* diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ($P < 0,05$)

4.4.3 Catalase (CAT)

Na **figura 19**, são observados os valores da atividade da enzima catalase no homogeneizado de estômago de ratos com e sem tratamento com glutamina. A catalase não apresentou atividade significativamente em nenhum dos quatro grupos estudados.



Figuras 19: Média dos valores da enzima antioxidante CAT entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos, com $p > 0,05$.

4.5 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) através de nitratos totais

Na **figura 20**, observamos os valores referentes aos nitratos totais no homogeneizado de estômago de ratos com e sem tratamento com glutamina. Observa-se aumento significativo dos nitratos totais nos grupos LPVP em relação aos grupos SO e LPVP+G, sendo $P < 0,05$. Comparação entre o grupo SO e SO+G não apresentou diferença significativa.

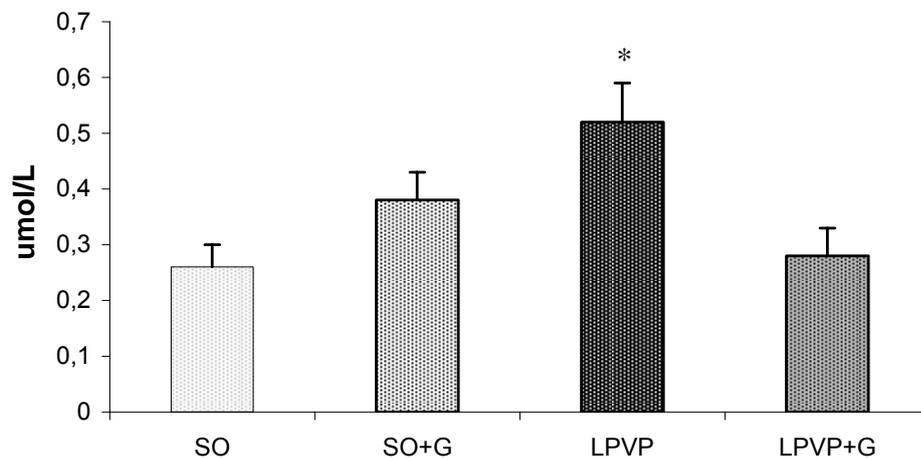


Figura 20: Média dos valores de nitratos totais dos diferentes grupos estudados

Os resultados acima são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo que cada grupo tem $n=6$ animais. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

* diferença significativa do grupo LPVP em relação ao grupo SO e LPVP+G ($P < 0,05$)

4.6 Avaliação histopatológica

A histopatologia foi realizada por meio de coloração de hematoxilina-eosina dos animais dos grupos controle (SO), com ligadura parcial de veia porta (LPVP), e animais com ligadura parcial de veia porta tratados com glutamina (LPVP+G).

Na figura 21 A e B, a fotomicrografia do fígado do grupo controle (SO) mostra a mucosa gástrica no padrão normal.

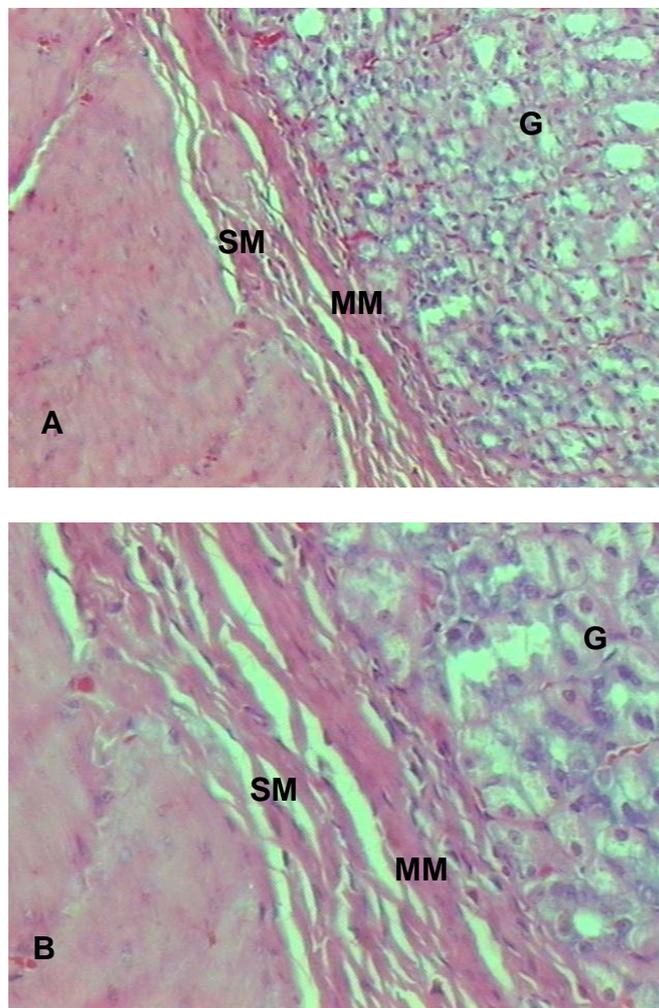


Figura 21: Fotomicrografia de estômago de animais do grupo controle (SO) com coloração de hematoxilina-eosina: **(A)** em aumento (100x) e **(B)** em aumento (400x), mostrando a mucosa gástrica. Observa-se área glandular (G), muscular da mucosa (MM) e submucosa (SM).

Na figura 22 A, B, C e D, observa-se a fotomicrografia do estômago do grupo com ligadura parcial de veia porta (LPVP), mostrando alterações na mucosa gástrica, como a presença de edema e vasodilatação.

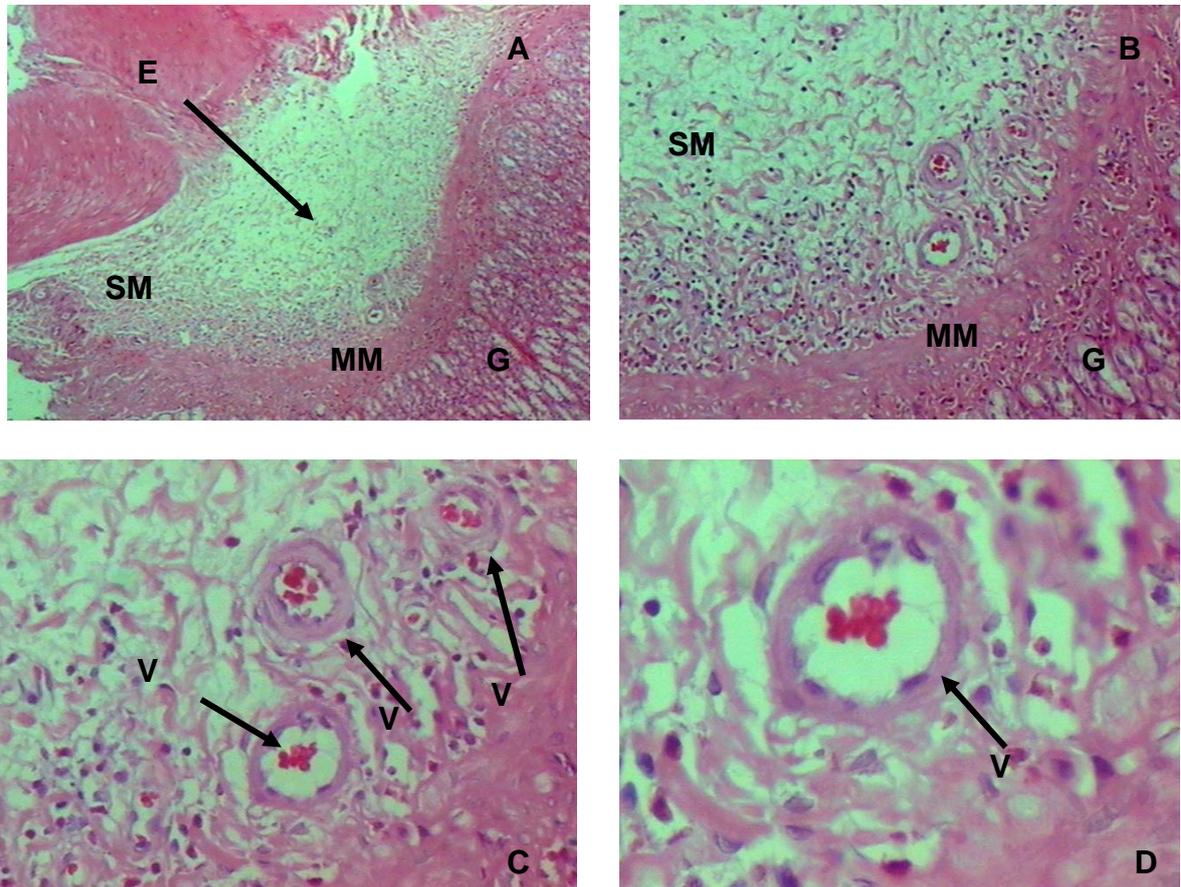


Figura 22: Fotomicrografia de estômago de animais do grupo com ligadura parcial de veia porta (LPVP) com coloração de hematoxilina-eosina nos aumentos **A** (25x), **B** (100x), **C** (200x) e **D** (400x), mostrando alterações da mucosa gástrica, que caracterizam a gastropatia da hipertensão portal. Presença de edema (E), formação de vasos com presença de hemácias e vasodilatação (V).

Na figura 23 A e B, apresenta-se a fotomicrografia do estômago do grupo LPVP tratado com glutamina (LPVP+G), na qual observa-se a redução da formação de edema e da formação de vasos.

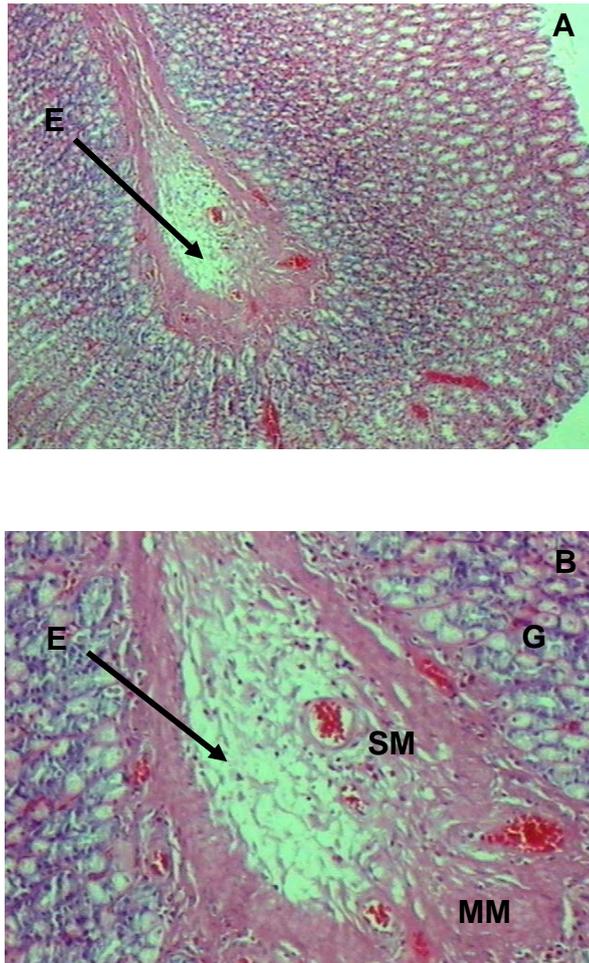


Figura 23: Fotomicrografia de estômago de animais do grupo LPVP tratado com glutamina (LPVP+G) com coloração de hematoxilina-eosina, nos aumentos **A** (25x) e **B** (100x), mostrando a redução do edema e da vasodilatação.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A hipertensão portal (HP) é a síndrome clínica a qual é usualmente secundária à obstrução intra-hepática ou extra-hepática do fluxo portal. O aumento da resistência do fluxo sanguíneo portal é o fator primário da fisiopatologia da hipertensão portal (1).

O mecanismo primário da HP, nos casos de cirrose hepática, relaciona-se com a alteração da estrutura hepática e a formação de nódulos, que determinam aumento de pressão no leito sinusoidal. Esta situação faz com que ocorra o desenvolvimento de uma circulação hiperdinâmica no território esplâncnico e pelo processo angiogênico instalado onde há grande circulação colateral (5, 53).

O termo gastropatia da hipertensão portal (GHP) caracteriza as lesões macroscópicas que aparecem na mucosa gástrica de pacientes com hipertensão portal, como conseqüência da formação excessiva de vasos. Histologicamente, estas alterações correspondem a vasos dilatados na mucosa e submucosa, e, endoscopicamente, aparecem na forma de mosaico (aspecto de couro de cobra) ou de manchas avermelhadas, chamadas “red spots” (54).

O tratamento da hipertensão portal para prevenir as suas complicações, principalmente a hemorragia digestiva alta, é de fundamental importância e ocorre em três cenários clínicos: a prevenção do primeiro sangramento (profilaxia primária), o tratamento após o episódio de sangramento e a prevenção do segundo sangramento (profilaxia secundária). Os tratamentos podem ser realizados através

do uso de vasoconstritores, que reduzem o fluxo venoso portal, vasodilatadores, que diminuem a resistência intra-hepática ou da associação de ambos. Cirurgicamente utilizam-se “shunts” que realizam o desvio do sangue para a circulação sistêmica (21).

A utilização de substâncias químicas ou produtos naturais que impedissem as complicações da HP seria um avanço significativo na terapêutica e um caminho para a diminuição da mortalidade. O desenvolvimento de modelos experimentais com processos patogênicos semelhantes aos das doenças dos humanos pode auxiliar na compreensão dos mecanismos da hipertensão portal e permitir testes de novas modalidades terapêuticas. Neste sentido, o modelo experimental de HP vem sendo utilizado e tem contribuído para uma melhor compreensão do quadro fisiopatológico apresentado em humanos. A HP pode ser desencadeada por diversos agentes, que originam a cirrose.

A ligadura parcial de veia porta (LPVP) é um modelo clássico estabelecido por Sikuler et al., em 1985, que simula a hipertensão portal e suas conseqüências. Em 7 dias, a HP encontra-se estabelecida, porém não evidenciando complicações hepáticas (44).

O modelo utilizado neste estudo foi o da LPVP, para avaliar o efeito do uso da glutamina na gastropatia da hipertensão portal. Foram analisadas as enzimas de integridade hepática, o estresse oxidativo, os metabólitos do óxido nítrico e a histologia da mucosa gástrica.

Em estudos anteriores, foi observado que o fluxo sangüíneo venoso portal aumentado é resultante da vasodilatação arteriolar e contribui para o agravamento e manutenção da HP. A intervenção com glutamina, via intraperitonal, teve início depois do desenvolvimento da circulação hiperdinâmica para demonstrar o efeito benéfico deste aminoácido no processo da HP (55, 56).

Os valores da pressão portal (mmHg) (**Figura 13**), verificados no 15º dia de experimento, mostraram que houve aumento significativo no grupo LPVP, comparado ao grupo LPVP+G e SO, o que mostrou a eficiência do modelo de ligadura parcial de veia porta. Os animais LPVP+G tiveram uma redução de 39% da pressão portal em comparação ao grupo LPVP. Estes resultados foram semelhantes em animais tratados com quercetina (1, 8).

Os resultados das análises das enzimas AST, ALT e FA não mostraram comportamento alterado no modelo empregado no estudo (**Figura 14**). A AST e a ALT estão diretamente relacionadas à lesão e a necrose celular e a FA está diretamente relacionada à doença hepatobiliar. Com estes resultados, confirma-se que não há alteração da integridade hepática, achados característicos do modelo de LPVP, modelo pré-hepático de HP, onde não há dano hepático (4, 44).

Os danos celulares causados pelos radicais livres possibilitam a lipoperoxidação lipídica (LPO), ativação enzimática, alteração do estado redox intracelular e o dano ao DNA. A LPO é uma reação em cadeia de formação de radicais livres, iniciada pelo radical hidroxil, que age sobre as cadeias de ácidos graxos da membrana fosfolipídica, na qual o radical hidroxil se transforma em hidroperóxidos de lipídios (28).

A avaliação do estresse oxidativo no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica associado à HP foi proposta, em 1998, em animais submetidos ao modelo LPVP e tratados com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Esses animais LPVP tratados com NAC não apresentaram desenvolvimento de circulação hiperdinâmica, quando comparados aos LPVP (57). Foram encontrados resultados semelhantes, utilizando o tratamento com ácido lipóico como antioxidante. Entretanto, nestes estudos, os mecanismos para esclarecer os efeitos antioxidantes desta substância não foram bem definidos (58).

Recentemente a administração aguda de vitamina C tem mostrado reverter a hiporreatividade dos vasoconstritores em território arterial de pacientes cirróticos, o

que pode explicar o efeito de antioxidantes, prevenindo a síndrome hiperdinâmica circulatória e a redução do fluxo portal, além de reduzir o estresse oxidativo (59).

Estudo avaliando o dano oxidativo causado por lesões na mucosa gástrica demonstrou que houve aumento da LPO e que as enzimas SOD, CAT e GPx apresentaram uma redução dos seus níveis nos animais lesados, sugerindo que o estresse oxidativo está envolvido em lesões no tecido gástrico (60)

Na avaliação de dano na mucosa gástrica por etanol observou-se que as lesões estão relacionadas com a produção de espécies ativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo. Considerando que a atividade antioxidante é um importante mecanismo de citoproteção, foi avaliada a ação do alcalóide índigo para o tratamento das lesões. A enzima GPx teve uma redução nos grupos etanol e, em contraste, a SOD teve seus níveis aumentados neste grupo e também um aumento dos níveis de LPO na mucosa gástrica lesada (7).

Quando avaliamos a lipoperoxidação, no estômago de ratos, observamos um aumento das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (**Figura 15**) e também da quimiluminescência (QL) (**Figura 16**), no grupo LPVP em relação ao grupo SO. Sugere-se que esse aumento esteja relacionado ao aumento do estresse oxidativo. Tal fato foi manifestado pela redução de 40% nos valores de TBA-RS e de QL no grupo LPVP+G, comparado com o grupo LPVP. Estes resultados já foram evidenciados em outros trabalhos que utilizaram o flavonóide quercetina e NAC, sugerindo um potencial antioxidante do aminoácido glutamina (8, 61). Em nosso estudo, a glutamina reduziu o edema da submucosa e a vasodilatação (**Figura 22 A e B**), além de reduzir a lipoperoxidação no homogeneizado de estômago dos animais do grupo LPVP+G. A melhora nos achados histológicos da mucosa gástrica vêm acompanhados de uma modificação dos parâmetros enzimáticos, assim como a restauração da integridade da membrana plasmática traduzida pela redução da LPO (62). A glutamina, por sua possível ação antioxidante, parece proteger a mucosa gástrica e diminuir o dano oxidativo do trato gastrointestinal, fato observado

neste trabalho e também em trabalhos anteriores em colite com uso de glutamina (8, 43).

As células, com seu sistema de defesa antioxidante enzimático, convertem espécies oxidantes em moléculas não-tóxicas e protegem o organismo dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. Esse sistema é encarregado da detoxificação das espécies ativas de oxigênio (EAO) e é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona-redutase (GR). Estas enzimas não estão exclusivamente no citosol, mas também nas mitocôndrias, onde grande parte dos radicais livres é produzida (63, 64).

A enzima superóxido dismutase (SOD), responsável pela dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, constitui a primeira linha de defesa da célula contra o estresse oxidativo (27).

A atividade da SOD determinada em mucosa gástrica em um estudo com pacientes com doença hepática, demonstrou que a enzima se encontra em níveis reduzidos em relação ao grupo controle de indivíduos com cirrose. Entretanto, indivíduos com doença crônica do fígado não apresentaram alterações significativas dos níveis de SOD. Nas doenças hepáticas, tais como: hepatite, cirrose e hepatocarcinoma, observa-se níveis elevados de LPO no estômago, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo nas lesões da mucosa gástrica nessas hepatopatias (65).

Trabalhos relacionam a diminuição da atividade da enzima SOD ao aumento do estresse oxidativo (66, 67). Em nosso estudo, observou-se uma diminuição da atividade da SOD nos animais do grupo LPVP em relação aos demais grupos (**Figura 17**), o que poderia estar relacionado com a inativação do ânion superóxido pois a mesma estaria sendo utilizada na dismutação das EAO e formação de H₂O₂. Em contrapartida, os animais LPVP+G, mantiveram os valores da atividade da enzima SOD semelhantes ao controle.

Estudos demonstraram que a atividade da SOD em modelo de LPVP, utilizando quercetina, apresentou valores semelhantes entre os quatro grupos de animais, não apresentando diferença estatisticamente significativa. Igualmente, descrevem que a atividade da SOD varia em relação aos diferentes tipos de estresse oxidativo, pois seria tecido-dependente ou tempo-dependente (8, 68).

A enzima SOD, ao dismutar o radical superóxido, forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é o substrato para a atividade da enzima catalase (CAT). Em relação à atividade da CAT na mucosa gástrica, não observamos alteração significativa entre os grupos (**Figura 19**).

O uso de glutamina em pacientes com peritonite reduziu a LPO e aumentou os níveis de glutathione, sugerindo com isso uma proteção e redução do estresse oxidativo (69). Em outro trabalho, foi utilizado o resveratrol em animais com trombose na veia porta, sendo observado que os animais que utilizaram esta substância tiveram seus níveis de glutathione reduzido e também a diminuição da LPO em relação aos animais que não foram tratados(70).

A glutathione peroxidase (GPx) tem uma especial importância fisiológica, porque ela cataliza a decomposição de peróxido inorgânico e peróxido orgânico, empregando (GSH) como co-substrato. A glutamina atua como substrato para a formação da GSH. Estudos demonstram o envolvimento direto da GPx com a colite (71). Foi demonstrada a relação da colite com a glutathione, em que ratos submetidos à colite experimental, por TNBS, apresentaram uma diminuição significativa de glutathione, quando comparado ao grupo controle (72).

Em nosso estudo, observamos a diminuição da GPx no grupo LPVP, quando comparado ao controle (**Figura 18**), sugerindo que durante o desenvolvimento da HP, ocorreu a formação de radicais livres e, com isso, formação de H_2O_2 , indicando que a enzima foi estimulada para neutralizar a formação destes RL, o que estaria levando ao consumo desta enzima, também, pelo grupo LPVP+G (73).

Estudos sugerem que a terapia antioxidante pode ter um efeito protetor na prevenção da circulação hiperdinâmica em animais LPVP e, assim, reduzir a hipertensão portal. Nos animais que foram tratados com NAC e quercetina, observou-se uma redução dos níveis de NO em relação aos que não receberam o tratamento, animais LPVP (8, 57).

Em indivíduos com cirrose, a hipertensão portal é freqüentemente associada à formação de uma circulação hiperdinâmica, com alto débito cardíaco e diminuição da resistência vascular sistêmica e da pressão arterial. A circulação hiperdinâmica se deve à vasodilatação arterial, que ocorre, principalmente, na circulação esplâncnica, enquanto a resistência vascular nas outras áreas é normal ou aumentada, em conformidade com o grau de hipertensão portal, insuficiência hepática e ativação do sistema renina-aldosterona e sistema nervoso simpático. O mecanismo que leva à vasodilatação esplâncnica é incerto. Uma hipótese favorece a translocação de bactérias intestinais e/ou alguns dos seus produtos, tais como endotoxina, no espaço intersticial dos órgãos esplâncnicos, resultando na liberação de vasodilatadores, tais como o NO, o monóxido de carbono e outros (38).

Além disso, estudos observam que o aumento da resistência intrahepática é o primeiro evento para o aumento da pressão portal e o desenvolvimento da hipertensão portal na cirrose. O estreitamento dos sinusoides, devido às alterações anatômicas é o principal componente do aumento da resistência intrahepática. No entanto, um elemento dinâmico está também envolvido no aumento do tônus vascular na cirrose: é o desequilíbrio entre a superprodução de vasoconstritores (principalmente endotelina-1 e ciclooxygenase-derivados prostaglandinas) e a produção de vasodilatadores, principalmente óxido nítrico (NO). Estes são os mecanismos responsáveis pelo aumento do tônus vascular sinusoidal e pós-sinusoidal. Em contraste, a resistência vascular na artéria hepática, que é determinada na área pré-sinusoidal, é diminuído devido ao aumento vasodilatadores (NO e adenosina). Isso sugere diferentes disponibilidades de NO (74).

Na avaliação dos metabólitos do NO, em homogeneizado de estômago, observamos uma redução de 19% na produção destes metabólitos, no grupo LPVP+G, em relação ao grupo LPVP (**Figura 20**). Esse aumento da produção de NO pelo grupo LPVP pode ser explicado devido ao processo de angiogênese, que se instala neste modelo, para realizar o desvio do sangue da área obstruída para a circulação sistêmica. Além disso, este aumento da produção de óxido nítrico poderia estar reagindo com o ânion superóxido, formando o radical peroxinitrito, extremamente lesivo. Esta liberação de NO é cada vez mais acentuada, devido à necessidade da formação de novos vasos, para que o sangue consiga chegar à circulação sistêmica, desencadeando um aumento de RL, conseqüentemente, estimulando a lipoperoxidação e o estresse oxidativo (30).

Estudo demonstrou que a glutamina inibe a produção de óxido nítrico (NO) vascular, investigando o efeito da dieta enriquecida com glutamina sobre a produção de NO em rato. A suplementação com glutamina aumentou os níveis plasmáticos de glutamina (até 91%), arginina (até 17%) e citrulina (até 54%). E foi observado que após uma semana de suplementação com glutamina, os níveis de NO foram significativamente reduzidos em 50% em relação ao controle, independentemente da quantidade de suplemento. Isso apontou para um efeito inibitório “in vivo” de glutamina na produção de NO (75).

Em ratos com colite induzida por ácido acético, também observou-se um aumento do NO nos animais do grupo colite em relação ao controle. Estes animais, quando tratados com glutamina, tiveram uma redução da produção de NO e conseqüente melhora da mucosa intestinal (73).

Para analisar os mecanismos em que aminoácidos modulam a produção de óxido nítrico (NO) no fluxo sanguíneo renal, foram perfundidos na mucosa renal de ratos diferentes aminoácidos, entre eles a glutamina. Foi observada a redução da produção de NO e o aumento da resistência vascular renal. Este estudo demonstrou que aminoácidos podem modular a produção de NO nas células endoteliais (76)

O NO é o principal mediador da vasoreatividade e de anormalidades angiogênicas (3). Em modelo de colite por ácido acético, o NO funciona como um sinalizador celular, mediando a vasodilatação, quando produzido pela NOS em células vasculares endoteliais, mas também como uma fonte altamente tóxica e oxidante, quando produzido em altas concentrações (73). Nessa situação, o NO pode reagir com espécies ativas de oxigênio, formando o peroxinitrito, que é uma espécie oxidante altamente reativa, contribuindo para o estresse oxidativo ou nitrosativo (77).

Em muitos estágios da doença vascular, a produção de NO é reduzida da disfunção endotelial, em parte causada por uma diminuição na disponibilidade de substrato (L-arginina). O metabolismo da L-arginina é complexo, pois está envolvido em uma multiplicidade de outras vias, como a uréia, creatina e agmatine. A suplementação de L-Arginina em pacientes com doença vascular é bem relatado, por beneficiar terapêuticamente. A disponibilidade de L-Arginina depende do fluxo de outros aminoácidos no organismo, incluindo L-glutamina, L-glutamato, L-ornitina, L-citrulline e L-lisina (78).

Na avaliação histológica da mucosa gástrica, por meio da coloração de hematoxilina-eosina, confirmou-se o desenvolvimento de edema e vasodilatação no grupo LPVP (**Figura 22**), devido ao processo de angiogênese instalado, quando comparados aos animais SO (**Figura 21**). Os animais LPVP+G, apresentaram uma atenuação desse fenômeno, semelhante aos achados em estudo que utilizou a quercetina como agente antioxidante (8).

Os animais LPVP, quando submetidos ao tratamento com glutamina, apresentaram redução de vasodilatação (**Figura 23**) e do edema de mucosa gástrica. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao potencial antioxidante na glutamina, que reduz a lesão oxidativa na mucosa gástrica de animais com ligadura parcial de veia porta, acarretando a sua melhora.

Diante dos resultados do presente trabalho, a glutamina pode ser sugerida como um inibidor fisiológico da síntese endotelial de NO, como demonstram os cortes histológicos com a significativa redução da vasodilatação e edema na mucosa gástrica. E sugerem que este aminoácido, através do seu potencial antioxidante, poderia atenuar as alterações presentes na gastropatia da HP, caracterizando qualidades de um bom agente terapêutico e promissor nessa doença.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1) Os valores da pressão portal mostraram que houve aumento significativo no grupo LPVP comparado ao grupo SO. A glutamina (LPVP+G) diminui a pressão portal nesse modelo utilizado.

2) Na avaliação dos testes de integridade hepática, através de medidas de concentração sérica de aminotransaminases (AST e ALT) e fosfatase alcalina (FA), dos animais tratados com glutamina e veículo, não observamos alterações nos valores destas enzimas;

3) Em relação à lipoperoxidação, utilizando os métodos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL) em estômago de ratos, observamos um aumento do TBA-RS e também da QL no grupo LPVP, sugerindo que o aumento deste processo esteja relacionado ao aumento do estresse oxidativo;

4) A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) apresentou uma diminuição significativa nos animais do grupo LPVP em relação aos demais grupos, o que pode estar relacionado com a inativação do ânion superóxido. O grupo LPVP+G manteve os valores da enzima aumentados, assim como os grupos controle;

A enzima antioxidante catalase (CAT) não apresentou alteração significativa na mucosa gástrica;

A enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx), a glutamina elevou os níveis nos grupos SO+G e no LPVP+G, apresentando redução significativa no grupo LPVP em relação aos demais grupos.

5) A presença dos metabólitos do NO, através de nitritos e nitratos no estômago de ratos com hipertensão portal, mostrou um incremento no grupo LPVP.

6) Na avaliação histopatológica no estômago de ratos com hipertensão portal, observou-se o desenvolvimento de edema e vasodilatação no grupo LPVP. Os animais LPVP tratados com glutamina apresentaram uma atenuação deste fenômeno.

A partir desses achados podemos concluir que a glutamina protege a mucosa gástrica dos ratos com gastropatia provocada pela LPVP.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and Biliary system. 9 ed. New York; 2004.
2. Bosch J, Garcia-Pagan JC, Berzigotti A, Abraldes JG. Measurement of portal pressure and its role in the management of chronic liver disease. *Semin Liver Dis.* 2006 Nov;26(4):348-62.
3. Langer DA, Shah VH. Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J Hepatol.* 2006 Jan;44(1):209-16.
4. Casadevall M, Panes J, Pique JM, Marroni N, Bosch J, Whittle BJ. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastric mucosal hyperemia of portal-hypertensive anesthetized rats. *Hepatology.* 1993 Sep;18(3):628-34.
5. Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol.* 2003;38 Suppl 1:S54-68.
6. Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am.* 1992 Mar;21(1):1-14.
7. Farias-Silva E, Cola M, Calvo TR, Barbastefano V, Ferreira AL, De Paula Michelatto D, et al. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Planta Med.* 2007 Oct;73(12):1241-6.
8. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zetller C, Marroni C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004 Nov 15;68(10):1939-46.
9. Reichen J, Lebrec D. The future treatment of portal hypertension. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(1):191-202.

10. Hernandez-Guerra M, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Increased hepatic resistance: a new target in the pharmacologic therapy of portal hypertension. *J Clin Gastroenterol*. 2005 Apr;39(4 Suppl 2):S131-7.
11. Silva Junior O, Zucoloto S, Beer Jr. A. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo: Hobe; 1998.
12. McCormack TT, Sims J, Eyre-Brook I, Kennedy H, Goepel J, Johnson AG, et al. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy? *Gut*. 1985 Nov;26(11):1226-32.
13. Quintero E, Pique JM, Bombi JA, Bordas JM, Sentis J, Elena M, et al. Gastric mucosal vascular ectasias causing bleeding in cirrhosis. A distinct entity associated with hypergastrinemia and low serum levels of pepsinogen I. *Gastroenterology*. 1987 Nov;93(5):1054-61.
14. Spina GP, Arcidiacono R, Bosch J, Pagliaro L, Burroughs AK, Santambrogio R, et al. Gastric endoscopic features in portal hypertension: final report of a consensus conference, Milan, Italy, September 19, 1992. *J Hepatol*. 1994 Sep;21(3):461-7.
15. Papazian A, Braillon A, Dupas JL, Sevenet F, Capron JP. Portal hypertensive gastric mucosa: an endoscopic study. *Gut*. 1986 Oct;27(10):1199-203.
16. Viggiano TR, Gostout CJ. Portal hypertensive intestinal vasculopathy: a review of the clinical, endoscopic, and histopathologic features. *Am J Gastroenterol*. 1992 Aug;87(8):944-54.
17. Payen JL, Cales P, Voigt JJ, Barbe S, Pilette C, Dubuisson L, et al. Severe portal hypertensive gastropathy and antral vascular ectasia are distinct entities in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 1995 Jan;108(1):138-44.
18. Sarfeh IJ, Tarnawski A. Gastric mucosal vasculopathy in portal hypertension. *Gastroenterology*. 1987 Nov;93(5):1129-31.
19. Toyonaga A, Iwao T. Portal-hypertensive gastropathy. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998 Sep;13(9):865-77.
20. Ferraz JG, Wallace JL. Underlying mechanisms of portal hypertensive gastropathy. *J Clin Gastroenterol*. 1997;25 Suppl 1:S73-8.
21. de Franchis R, Dell'Era A, Iannuzzi F. Diagnosis and treatment of portal hypertension. *Dig Liver Dis*. 2004 Dec;36(12):787-98.
22. Flora Filho R, Zilberstein B. [Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity. Metabolism, synthesis and functions]. *Rev Assoc Med Bras*. 2000 Jul-Sep;46(3):265-71.

23. Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Naganuma Y, Nagano M, Hiramori K. Nitric oxide plays an insignificant role in direct vasodilator effects of calcium channel blockers in healthy humans. *Heart Vessels*. 2002 Mar;16(3):105-10.
24. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.
25. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:737-69.
26. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4 Suppl):N37-52.
27. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical and Biology and Medicine*. 3 ed. New York: Oxford; 2007.
28. Duran WN, Seyama A, Yoshimura K, Gonzalez DR, Jara PI, Figueroa XF, et al. Stimulation of NO production and of eNOS phosphorylation in the microcirculation in vivo. *Microvasc Res*. 2000 Sep;60(2):104-11.
29. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994 Jan;74(1):139-62.
30. Rodriguez-Vilarrupla A, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*. 2007 Feb;46(2):193-7.
31. Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)*. 1998;58(4):350-6.
32. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*. 2000 Nov;33(5):742-50.
33. Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, Gonzalez-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2003 Apr;48(4):824-9.
34. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nutr*. 2005 Oct;135(10):2299-304.
35. Boza JJ, Moennoz D, Bournot CE, Blum S, Zbinden I, Finot PA, et al. Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. *Eur J Nutr*. 2000 Feb;39(1):38-46.

36. Babu R, Eaton S, Drake DP, Spitz L, Pierro A. Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *J Pediatr Surg.* 2001 Feb;36(2):282-6.
37. Cremin JD, Jr., Fleming SE. Glycolysis is a source of pyruvate for transamination of glutamine amino nitrogen in jejunal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1997 Mar;272(3 Pt 1):G575-88.
38. La Villa G, Gentilini P. Hemodynamic alterations in liver cirrhosis. *Mol Aspects Med.* 2007 Oct 24.
39. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg.* 1999 Aug;178(2):147-50.
40. Kvamme E, Roberg B, Torgner IA. Glutamine transport in brain mitochondria. *Neurochem Int.* 2000 Aug-Sep;37(2-3):131-8.
41. Elia M, Lunn PG. The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man. *Nutrition.* 1997 Jul-Aug;13(7-8):743-7.
42. Matilla B, Ortiz J, Gonzalez P, Garcia-Diez F, Jorquera F, Culebras JM, et al. Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptides on liver antioxidant and detoxication systems in rats. *Nutrition.* 2000 Feb;16(2):125-8.
43. Israeli E, Berenshtein E, Wengrower D, Aptekar L, Kohen R, Zajicek G, et al. Prophylactic administration of topical glutamine enhances the capability of the rat colon to resist inflammatory damage. *Dig Dis Sci.* 2004 Oct;49(10):1705-12.
44. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol.* 1985 Jun;248(6 Pt 1):G618-25.
45. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
46. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
47. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med.* 1991;10(2):93-100.
48. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.

49. Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973 May 15;32(1):132-4.
50. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973 Jul;134(3):707-16.
51. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.* 1999;301:49-61.
52. Garcia-Pagan JC, Fernandez M, Bernadich C, Pizcueta P, Pique JM, Bosch J, et al. Effects of continued NO inhibition on portal hypertensive syndrome after portal vein stenosis in rat. *Am J Physiol.* 1994 Dec;267(6 Pt 1):G984-90.
53. Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, Peralta C, Bragulat M, Corominola H, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology.* 2003 Jan;37(1):172-81.
54. Thuluvath PJ, Yoo HY. Portal Hypertensive gastropathy. *Am J Gastroenterol.* 2002 Dec;97(12):2973-8.
55. Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther.* 2001 Mar;89(3):273-93.
56. Abraldes JG, Tarantino I, Turnes J, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Hemodynamic response to pharmacological treatment of portal hypertension and long-term prognosis of cirrhosis. *Hepatology.* 2003 Apr;37(4):902-8.
57. Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, et al. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology.* 1998 Sep;28(3):689-94.
58. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, et al. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1999 May;29(5):1358-63.
59. Ferlitsch A, Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, Homoncik M, Peck-Radosavljevic M, et al. Vasoconstrictor hyporeactivity can be reversed by antioxidants in patients with advanced alcoholic cirrhosis of the liver and ascites. *Crit Care Med.* 2005 Sep;33(9):2028-33.
60. Seckin Y, Harputluoglu MM, Batcioglu K, Karıncaoglu M, Yildirim B, Oner RI, et al. Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2007 May;52(5):1154-8.

61. Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin. *Food Chem Toxicol.* 2003 Jun;41(6):759-65.
62. Cetinkaya A, Kurutas EB, Buyukbese MA, Kantarceken B, Bulbuloglu E. Levels of malondialdehyde and superoxide dismutase in subclinical hyperthyroidism. *Mediators Inflamm.* 2005 Feb 24;2005(1):57-9.
63. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995 Dec;33(12):1061-80.
64. Salvador M, Henriques JA. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas, Ulbra; 2004.
65. Kikkawa S, Kadohara M, Kawasaki H. Superoxide dismutase and glutathione in the gastric mucosa of patients with chronic liver disease. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1992 Dec;78(3):289-309.
66. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry.* 1975 Dec 2;14(24):5299-303.
67. Santiard D, Ribiere C, Nordmann R, Houee-Levin C. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study. *Free Radic Biol Med.* 1995 Jul;19(1):121-7.
68. Abd El-Gawad HM, Khalifa AE. Quercetin, coenzyme Q10, and L-canavanine as protective agents against lipid peroxidation and nitric oxide generation in endotoxin-induced shock in rat brain. *Pharmacol Res.* 2001 Mar;43(3):257-63.
69. Kumar S, Kumar R, Sharma SB, Jain BK. Effect of oral glutamine administration on oxidative stress, morbidity and mortality in critically ill surgical patients. *Indian J Gastroenterol.* 2007 Mar-Apr;26(2):70-3.
70. Kirimlioglu V, Sozen H, Turkoglu S, Haberal M. Protective effect of resveratrol, a red wine constituent polyphenol, on rats subjected to portal vein thrombosis. *Transplant Proc.* 2008 Jan-Feb;40(1):290-2.
71. Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2005 Apr 28;11(16):2371-84.
72. Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez-Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest.* 2000 May;80(5):735-44.

73. Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*. 2007 Jul 17;236(3):217-26.
74. Zipprich A. Hemodynamics in the isolated cirrhotic liver. *J Clin Gastroenterol*. 2007 Nov-Dec;41(10 Suppl 3):S254-8.
75. Houdijk AP, Visser JJ, Rijnsburger ER, Teerlink T, van Leeuwen PA. Dietary glutamine supplementation reduces plasma nitrate levels in rats. *Clin Nutr*. 1998 Feb;17(1):11-4.
76. Kakoki M, Kim HS, Edgell CJ, Maeda N, Smithies O, Mattson DL. Amino acids as modulators of endothelium-derived nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Aug;291(2):F297-304.
77. Llorens S, Nava E. Cardiovascular diseases and the nitric oxide pathway. *Curr Vasc Pharmacol*. 2003 Oct;1(3):335-46.
78. Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Jan-Feb;33(1-2):1-8.