

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

Ariane Tainá da Silva

**ALTERAÇÕES INTESTINAIS NA HIPERTENSÃO PORTAL - Ação da Glutamina**

Porto Alegre

2020

**Ariane Tainá da Silva**

**ALTERAÇÕES INTESTINAIS NA HIPERTENSÃO PORTAL - Ação da Glutamina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Anair Possa Marroni

Porto Alegre

2020

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela oportunidade, e a todos os professores do PPGFisio pelo aprendizado proporcionado.

A minha orientadora Dra Norma, pela inspiração como pesquisadora, pelo aceite de orientação, por guiar-me dentro da pesquisa, e pelos inúmeros ensinamentos.

A equipe do grupo de pesquisa pelas contribuições, aprendizados e convivência. Dr Cláudio Marroni, Dr Henrique Fillmann, Dr<sup>a</sup> Francielli Licks, Dr<sup>a</sup> Renata Hartmann, Dr<sup>a</sup> Elizângela Schemitt e Me Josieli Raskopf.

A minha amada IC Raíssa Nardi, que foi mais que isso no dia a dia de laboratório, gratidão por cada palavra, abraço e incentivo. Aos meus outros ICs queridos, Gabriela Martins, Lucas Petitemberte, Sandielly Benitez, vocês são especiais e me ajudaram muito.

Meu agradecimento especial vai para o meu marido, Jefferson, do qual sempre me apoiou, incentivou e segurou “a barra” enquanto estava longe. Você é especial demais em minha vida, e essa conquista não seria possível sem alguém tão compreensivo e incentivador ao meu lado.

A minha mãe, Valdete que mesmo sem entender muita coisa sobre o mundo dos estudos, me incentivava como podia, seja com palavras ou um colo.

Ao meu pai, José por ter feito parte da minha formação, e ter me permitido chegar onde estou, sei que não é muito de demonstrações, mas tenho real certeza da torcida e apoio.

Aos meus irmãos, Débora pelos lanches deliciosos que fazia durante minha correria, pelo meu afilhado que foi um presente nesse período, e pelo jeitinho desajeitado em apoiar e aos meus outros irmãos Anderson e Henrique, obrigada. Aos meus amados sobrinhos Rayssa, Hazael, Mateus, Benício, Alice, Sofia,

Danillo e Antônia, que me fazem querer ser uma pessoa melhor, e ser um exemplo pra eles.

Ao meu padrasto, João, aos meus primos Ezequiel e Fernanda, minhas cunhadas Michele e Taciane, meus sogros Vanderlei e Maria

A Dr<sup>a</sup> Angela Tavares pela ajuda com o equipamento utilizado. A Dr<sup>a</sup> Graziella Rodrigues pelo incentivo. A Dr<sup>a</sup> Alessandra Hubner pela colaboração

A bióloga Flávia e equipe da Unidade de Patologia Experimental

A equipe da Unidade de Experimentação Animal, por todo suporte, paciência, e colaboração no experimento enfermeira Martha e veterinárias Thuani e Daniela

A equipe do laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia, Larisse, Gabriel e a Amanda que foi mais que colega, e me cedia sua cama quando precisava.

Sem a união de todas essas pessoas que me acompanharam nessa jornada, chegar até o fim não teria sido possível. Gratidão.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

## RESUMO

A Hipertensão Portal (HP) é decorrente de uma obstrução no sistema venoso portal, com aumento progressivo da pressão local. Essa elevação de pressão desencadeia o estabelecimento de uma circulação colateral hiperdinâmica, com a dilatação vascular em diferentes locais, como por exemplo, no intestino. A ligadura parcial da veia porta (LPVP) é um modelo experimental eficaz e amplamente utilizado para indução da HP. A Glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e está envolvido em diferentes funções, como a participação no sistema antioxidante. Com isso, a Glutamina é uma boa candidata para o tratamento da HP. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação da Glutamina no intestino grosso de ratos com HP, submetidos ao modelo experimental de LPVP. Para isso, foram utilizados 24 ratos Wistar machos ( $\pm 250$ g) divididos em quatro grupos experimentais (n=6): Sham-operated (SO), SO+Glutamina (Glu), LPVP, LPVP+Glu. No 8º dia após a cirurgia, a Glutamina (25 mg/kg,ip) foi administrada diariamente durante 7 dias. No 15º dia foi mensurada a pressão portal, posteriormente foram eutanasiados e o intestino grosso foi coletado para análises histológicas, de estresse oxidativo e nitrosativo. Observamos uma elevação na pressão portal no grupo LPVP quando comparado ao grupo controle, e quando tratado com Glutamina (LPVP+Glu) ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa. Observamos um aumento do estresse oxidativo avaliado por TBARS no tecido intestinal dos ratos do grupo LPVP com relação aos grupos controles, sendo a Glutamina eficaz na redução no grupo LPVP+Glu. Também observamos uma redução na atividade das enzimas SOD no grupo doente, em contrapartida o grupo LPVP + Glu restaurou sua atividade. Quanto aos metabólitos do óxido nítrico, houve um aumento no grupo LPVP com relação aos controles; e quando administrado a Glutamina, observa-se um reestabelecimento nos níveis. Na avaliação histológica do intestino grosso do grupo LPVP, observamos uma diminuição das células caliciformes da mucosa, assim como desorganização das criptas, presença de edema e aumento de vasos sanguíneos na submucosa, já o grupo LPVP+GLU não apresenta estas alterações, com características similares aos controles. Sugerimos a partir destes

resultados, a ação antioxidante da Glutamina e seus efeitos benéficos no intestino grosso de animais submetidos à LPVP.

## ABSTRACT

Portal Hypertension (PH) is established due to an obstruction in the portal venous system, with progressive increase in local pressure. This increase in pressure triggers the establishment of a hyperdynamic collateral circulation, with vascular dilation in different places, such as the intestine. Partial portal vein ligation (PPVL) is an effective and widely used experimental model for inducing PH. Glutamine is the most abundant free amino acid in plasma and is involved in different functions, such as the participation in the antioxidant system. Thus, glutamine is a good candidate for the treatment of PH. This study aimed to evaluate the action of glutamine in the large intestine of rats with PH, submitted to the experimental model of PPVL. For this, 24 male Wistar rats ( $\pm$  250g) were used, divided into four experimental groups (n = 6): Sham-operated (SO), SO + Glutamine (Glu), PPVL, PPVL + Glu. On the 8th day after surgery, Glutamine (25 mg/kg, ip) was administered daily for 7 days. On the 15th day, portal pressure was assessed, then the rats were euthanized and the large intestine was collected for histological, oxidative and nitrosative stress analyzes. We observed an increase in portal pressure in the PPVL group when compared to the control group, and when treated with Glutamine (PPVL + Glu) there was a statistically significant decrease. We observed an increase in oxidative stress assessed by TBARS in the intestinal tissue of rats in the PPVL group compared to the control groups, with glutamine being effective in reducing the PPVL + Glu group. We also observed a reduction in the activity of SOD enzymes in the sick group, in contrast the PPVL + Glu group restored its activity. As for the nitric oxide metabolites, there was an increase in the LPVP group when compared to controls; and when glutamine is administered, levels are restored. In the histological evaluation of the large intestine of the PPVL group, we observed a decrease in the goblet cells of the mucosa, as well as disorganization of the crypts, the presence of edema and an increase in blood vessels in the submucosa, whereas the PPVL + GLU group no longer presents these changes, presenting characteristics similar to controls. We suggest from these results the antioxidant action of Glutamine and its beneficial effects on the large intestine of animals submitted to PPVL.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

Ca<sup>++</sup> - Cálcio

CAT - Catalase

CCl<sub>4</sub> – Tetracloreto de carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

EAO – Espécies ativas de oxigênio

e-NOS - Óxido nítrico-sintase endotelial

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GHP – Gastropatia da hipertensão portal

GLU – Glutamina

GPPG - Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

GPx – Glutathione peroxidase

GSSH – Glutathione oxidada

GST - Glutathione s-transferase

GR – Glutathione Redutase

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HP – Hipertensão Portal

H<sub>2</sub>O - Água

IG-g - Imunoglobulinas

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$

i-NOS - Óxido nítrico-sintase induzível

KCl – Cloreto de Potássio

LPO - Lipoperoxidação

LPVP – Ligadura Parcial da Veia Porta

NADPH - Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo

n-NOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

Nos - Óxido nítrico sintase

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Trióxido de dinitrogênio

ONOO - Peroxinitrito

O<sub>2</sub> - Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>°-</sup> - Radical ânion superóxido

OH<sup>°-</sup> - Radical Hidroxil

PMSF - Fluoreto de fenil metil sulfonina

SOD – Superóxido dismutase

SO – *Sham-operated*

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TNBS - Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico

TNF-α – Fator de necrose tumoral

UEA – Unidade de Experimentação Animal

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Sistema Venoso Portal .....	16
Figura 2 - Causas da hipertensão portal .....	18
Figura 3 - Dilatação vascular presente na hipertensão porta .....	18
Figura 4 - Formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. ....	21
Figura 5 - Reação que mostra a formação do NO. ....	23
Figura 6 - Esquema que mostra as isoformas da NO-sintase .....	23
Figura 7 - Fórmula química da Glutamina .....	28
Figura 8 - Modelo de ligadura parcial da veia porta .....	37
Figura 9 - Efeito da administração da Glutamina (GLU) sobre os níveis de pressão portal nos grupos SO: Sham-operated, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU .....	44
Figura 10 - Efeito da administração da GLU sobre os níveis de TBARS nos grupos SO, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU .....	45
Figura 11 - Efeito da administração da GLU sobre os níveis de SOD nos grupos SO, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU. ....	45
Figura 12 - Efeito da administração da GLU sobre os níveis de NO nos grupos SO, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU .....	46
Figura 13 - Análise histológica intestino de ratos com LPVP e tratados .....	47

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
1.1 CIRCULAÇÃO VENOSA PORTAL .....	18
1.2 HIPERTENSÃO PORTAL .....	19
1.3 ALTERAÇÕES INTESTINAIS .....	21
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITRATIVO .....	22
1.4.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES .....	22
1.4.2 ÓXIDO NÍTRICO .....	24
1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	27
1.5.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS .....	27
1.5.2 ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS .....	29
1.6 GLUTAMINA .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA .....	35
4.2 ANIMAIS .....	35
4.3 GRUPO PILOTO .....	36
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	37
4.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	38
4.5.1 DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE HIPERTENSÃO PORTAL PELA LIGADURA PARCIAL DE VEIA PORTA .....	38
4.5.2 ADMINISTRAÇÃO DO VEÍCULO E DA GLUTAMINA .....	40
4.5.3 AFERIÇÃO DA PRESSÃO VENOSA PORTAL .....	40
4.5.4 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	40
4.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	41
4.6.1 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO .....	41
4.6.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA .....	41
4.7 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	42
4.7.1 DETERMINAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) .....	42
4.7.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) .....	42
4.8 MEDIDAS DE NITRITOS E NITRATOS .....	43
4.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO INTESTINO POR HEMATOXILINA E EOSINA .....	44
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	44
<b>6. RESULTADOS</b> .....	44
6.1 VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO PORTAL .....	46
6.2 MEDIDA DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) .....	46
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) .....	47
6.4 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) .....	48
6.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA E EOSINA .....	49

<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>56</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## INTRODUÇÃO

---

## INTRODUÇÃO

A hipertensão portal (HP) é caracterizada por um aumento patológico da pressão portal, decorrente de um fluxo sanguíneo portal e/ou resistência vascular aumentados [1].

Esse aumento gradativo da pressão no sistema porta acarreta o desenvolvimento de vasos colaterais, no intuito de redistribuir o fluxo sanguíneo do sistema porta para a grande circulação [2].

A dilatação dos vasos, principalmente no estômago e esôfago, leva a um quadro de gastropatia da hipertensão portal (GHP), caracterizado pela vasodilatação na submucosa gástrica [4].

Ainda, outros locais comumente afetados por essa vasodilatação são a submucosa do reto, parede abdominal anterior e veia renal esquerda. No caso do reto, as varizes retais são formadas em virtude da anastomose entre as veias hemorrodárias superior e média, bem como a hemorroidária inferior [1].

A hipertensão portal desencadeia distúrbio no trato gastrintestinal, comprometendo a função do intestino delgado. Esta pode ser uma das causas do íleo paralítico, decorrente de alteração eletrofisiológica intestinal [3]. Ectasias vasculares também têm sido descritas em outras partes do trato gastrointestinal, como o cólon [1].

O sangramento digestivo está presente em 80-90% dos pacientes com HP [4], devido à progressiva dilatação dos vasos, que se rompem e levam à hemorragia [2].

Esse alto índice de sangramento aponta a necessidade de estudar a fisiopatologia da hipertensão portal, na tentativa de minimizar as conseqüências decorrentes dessa alteração hemodinâmica. O modelo de ligadura parcial da veia porta (LPVP) é o mais utilizado para estudar a hipertensão portal pré-hepática. Esse modelo foi desenvolvido por Sikuller em 1985 [5], e diversos estudos experimentais demonstraram que, em animais, a LPVP manifesta anormalidades equivalentes à HP em humanos.

O estresse oxidativo é apontado como fator desencadeante para a progressão de diferentes doenças. Na hipertensão portal, está relacionado à evolução da circulação colateral [6]. Dessa forma o uso da terapia antioxidante parece ser uma tentativa promissora para minimizar o quadro da HP [7].

A Glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma, com uma importante função em atenuar os processos inflamatórios intestinais, e atuar sobre os radicais livres de oxigênio [8].

Esse antioxidante já foi utilizado previamente em trabalhos do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, no modelo experimental de ligadura parcial da veia porta [9]. Após a administração da Glutamina, foram obtidos resultados satisfatórios na redução da circulação colateral hiperdinâmica, principalmente no estômago.

A vasorreatividade desempenha um importante papel na patofisiologia da HP. Recentemente, mudanças estruturais como o remodelamento vascular e a angiogênese foram identificadas nesse processo, sendo a primeira uma resposta adaptativa ao estresse de cisalhamento e a segunda promovida através da proliferação de células musculares lisas e endoteliais [9].

O eixo intestino-fígado, no modelo de Ligadura Parcial Da Veia Porta (LPVP), não determina alterações estruturais significativas no fígado, entretanto, pela alteração circulatória vasodilatação, angiogênese e aumento da pressão portal, possibilita alterações na absorção de nutrientes, translocação bacteriana, absorção de endotoxinas e mudanças imunológicas locais (citocinas e interleucinas) e da microbiota, que circulando no sistema porta atingem o fígado e a circulação sistêmica.

Desta forma, o objetivo deste estudo será avaliar a ação antioxidante da Glutamina sobre o estresse oxidativo e o papel do óxido nítrico sobre o intestino no modelo de hipertensão portal.



## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

---

# 1 REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 CIRCULAÇÃO VENOSA PORTAL

A circulação venosa portal engloba todas as veias que transportam sangue da região intra-abdominal do tubo digestivo, baço, pâncreas e vesícula biliar em direção ao fígado. O sangue venoso proveniente destas regiões, chega ao fígado através da veia porta formada anatomicamente pela união da veia mesentérica superior e esplênica <sup>[10]</sup>.

A organização desse sistema permite que todo o sangue venoso, drenado do trato gastrointestinal, passe pelo território hepático antes de atingir a circulação sistêmica. O sangue portal é levado pelos ramos terminais da veia porta até os sinusóides e, desses, para as veias centrolobulares, que drenam para as veias hepáticas e essas, por sua vez, para a veia cava inferior, desembocando na aurícula direita e, após, na grande circulação <sup>[11]</sup>.



**Figura 1:** Sistema venoso portal.

**Fonte:** adaptada <sup>[18]</sup>.

O sangue direcionado ao fígado representa cerca de 25% do débito cardíaco (cerca de 1.200 ml/min), sendo esse alto volume sanguíneo necessário para que o fígado realize suas funções de principal órgão regulador da

homeostase metabólica e filtro de toxinas e de microorganismos provenientes da absorção intestinal. [12]

O fluxo venoso no sistema porta é caracterizado por uma baixa resistência, alto fluxo e baixa pressão. Qualquer alteração homeostática nesse sistema, desencadeada principalmente em virtude de uma obstrução ao fluxo sanguíneo, acarretará no aumento de pressão no sistema portal levando a graves consequências e ao quadro denominado de hipertensão portal. Esse quadro é caracterizado por um aumento da resistência vascular e/ou fluxo sanguíneo no sistema portal, que acarreta em um aumento da pressão e conseqüente desenvolvimento de colaterais portossistêmicos, que desviam o sangue desse sistema obstruído diretamente para a circulação sistêmica, contornando o fígado [14].

## 1.2 HIPERTENSÃO PORTAL

A pressão portal normal varia entre 5 a 10 mmHg, considera-se hipertensão portal quando existe um aumento persistente da pressão portal acima desses valores [15].

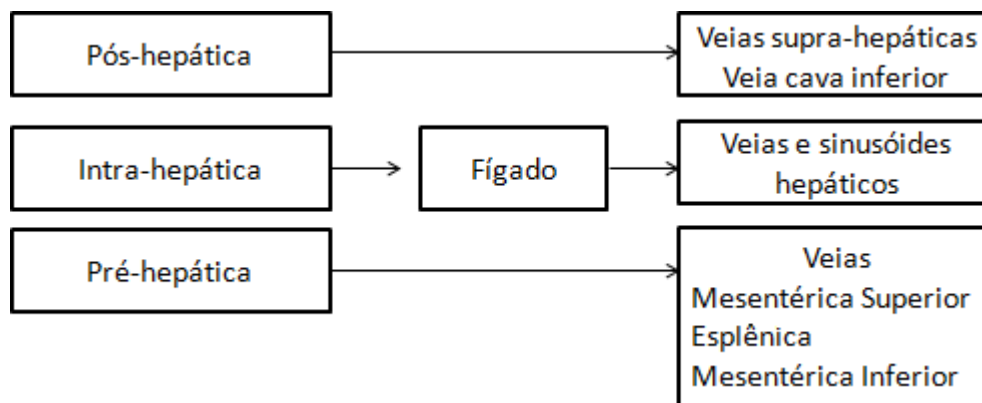
A Hipertensão Portal é uma síndrome hemodinâmica caracterizada pelo aumento do gradiente de pressão portal, que é definido pela diferença de pressão entre a veia porta e a veia cava inferior [15].

O gradiente de pressão portal é definido matematicamente através da interação entre o fluxo sanguíneo portal e a resistência vascular ( $\Delta P = Q \times R$ ), assim, um aumento em qualquer um desses dois parâmetros, ou ambos, afeta diretamente a pressão no sistema portal [1].

Dentre esses parâmetros, o aumento da resistência vascular é considerado o mecanismo inicial na gênese da hipertensão portal. Tal distúrbio é desencadeado devido ao surgimento de um obstáculo anatômico, que pode ocorrer em qualquer nível do sistema venoso portal [16].

A síndrome da hipertensão portal é apontada como a principal causa de mortalidade entre pacientes cirróticos. Nesse caso, o aumento da resistência é

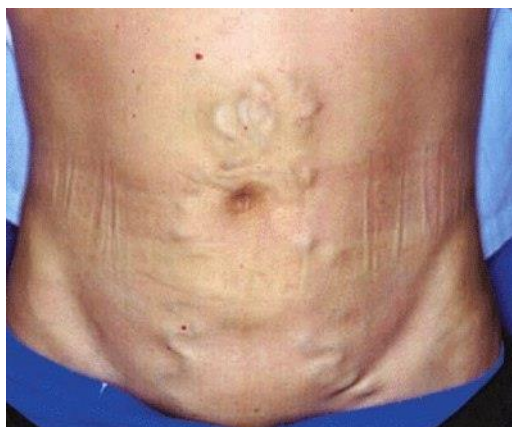
decorrente da fibrose tecidual e da regeneração nodular, que alteram a arquitetura hepática [20].



**Figura 2:** Causas da hipertensão portal.

**Fonte:** adaptada [1].

O aumento progressivo da pressão no sistema porta leva à dilatação dos vasos, com conseqüente formação de colaterais portossistêmicos, que desviam o sangue proveniente do sistema portal diretamente para a circulação sistêmica, contornando o fígado [19]. O surgimento dessas varizes pode ocorrer em qualquer segmento do tubo digestivo.

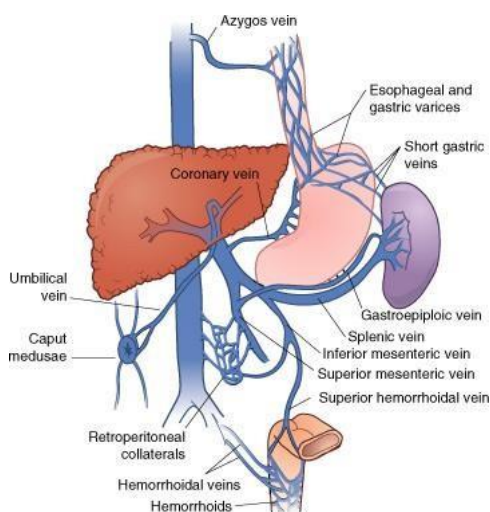


**Figura 3:** Fotografia da região abdominal, mostrando os colaterais portossistêmicos.

**Fonte adaptada:** Doenças do Aparelho Digestivo – Fiocruz MS

### 1.3 ALTERAÇÕES INTESTINAIS

Dentre os locais suscetíveis à dilatação vascular consequente à hipertensão portal, o estômago, esôfago, a parede abdominal anterior, veia renal esquerda e submucosa do reto são considerados os mais frequentes. [1]



**Figura 3:** Dilatação vascular presente na hipertensão portal.  
**Fonte:** adaptada [21].

Quando nos referimos aos danos os quais o intestino é acometido na hipertensão portal, podemos correlacionar estes ao aumento progressivo da pressão no sistema portal, bem como à hipóxia intestinal decorrente desse desarranjo hemodinâmico [22].

O intestino é um órgão de defesa imunológica, além de suas funções imprescindíveis no processo de digestão e absorção de nutrientes. A fisiologia intestinal, ainda, vincula um importante eixo com o sistema portal hepático, uma vez que todo o sangue proveniente desse local é conduzido ao fígado através da veia porta [23].

A circulação êntero-hepática traduz uma possibilidade de translocação bacteriana. Da mesma forma que os nutrientes e o aporte sanguíneo intestinal

percorrem esse trajeto, a possibilidade de que bactérias presentes na microbiota intestinal sejam direcionadas ao fígado não pode ser desconsiderada [24].

Em uma situação não fisiológica, a homeostasia desse sistema pode ser perturbada. No caso da hipertensão portal, o quadro de infecção ou sepse está diretamente associado com o aumento da permeabilidade intestinal. O desenvolvimento do quadro de circulação hiperdinâmica pode acarretar mudanças estruturais na parede intestinal, bem como o surgimento de infecções bacterianas espontâneas e sepse. [25]

A hipertensão portal, isolada ou consequência de doença hepática, leva a severas alterações também na perfusão intestinal. O aumento da resistência vascular esplâncnica e do fluxo venoso leva a uma congestão no sistema portal, acarretando uma hipoperfusão intermitente intestinal. O dano oxidativo na integridade da mucosa intestinal em virtude do aumento da conversão da enzima xantina desidrogenase (XD) em xantina oxidase (XO) é frequente, contribuindo para o quadro de estresse oxidativo característico da hipertensão portal [25].

Da mesma forma, o aumento da produção de óxido nítrico (NO) nesta circulação hiperdinâmica, devido ao estresse de cisalhamento é diretamente correlacionado com o estresse nitrativo [26].

## **1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITRATIVO**

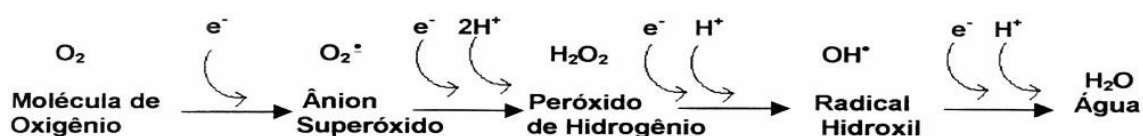
### **1.4.1 Espécies reativas de oxigênio e radicais livres**

O oxigênio (O<sub>2</sub>) é um elemento essencial à vida aeróbica. No entanto, em determinadas situações, é também potencialmente tóxico para as células [27].

A molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um birradical que possui dois elétrons desemparelhados. Dessa forma, essa molécula é considerada um agente oxidante, capaz de oxidar outros átomos ou moléculas aceitando um par de elétrons.

Esse processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia, pode gerar as espécies reativas de oxigênio (EROs) através de intermediários gerados durante o processo de redução parcial do oxigênio [28].

Nos organismos aeróbicos, o  $O_2$  é reduzido à água ( $H_2O$ ) no final da respiração mitocondrial. Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do  $O_2$ , gerando o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Ao se adicionar um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Assim, a formação de espécies reativas de oxigênio deve-se ao fato de o  $O_2$  se reduzir à água de forma monovalente, permitindo a geração de metabólitos intermediários durante o processo.



**Figura 4:** Formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres.

**Fonte:** adaptada [29].

Os intermediários gerados durante a redução parcial do oxigênio são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o “oxigênio singlet” ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Essas moléculas são capazes de existir independentemente, e são denominadas espécies reativas de oxigênio [28].

O termo radical livre é utilizado para definir uma espécie química, que pode ser um átomo, um metal de transição ou uma molécula que possua um elétron não pareado no seu último orbital. Esse elétron confere a essas moléculas uma alta reatividade, devido a sua tendência de adquirir um segundo elétron para esse orbital desestabilizado. A estabilização ocorre através da remoção de elétrons de moléculas vizinhas; dessa forma essas espécies possuem o poder de oxidar moléculas biológicas, como proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucleicos [30].

Podemos citar como radicais livres o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o óxido nítrico (NO), que podem ser formados durante o metabolismo normal de qualquer célula pela perda de elétrons de um não-radical

ou pelo ganho de um elétron por não-radical. Também podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada se cada um dos átomos ficar com um elétron, num processo conhecido como fissão homolítica [31].

O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação aos seus níveis fisiológicos, levando a um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Assim, está relacionado a várias doenças, como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, doenças do fígado, diabetes mellitus, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral [29].

Na hipertensão portal, o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica foi proposto, inicialmente, por Fernando *et al.*, 1998 que utilizaram o modelo experimental de ligadura parcial da veia porta [32]. Sendo a hipertensão portal uma doença relacionada ao estresse oxidativo, a possibilidade de dano ao DNA neste modelo experimental é plausível.

Estudos anteriores demonstraram que o óxido nítrico parece exercer um papel importante na patogênese da hipertensão portal [33], bem como elevados níveis do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) [34], ambos estando relacionados ao dano oxidativo.

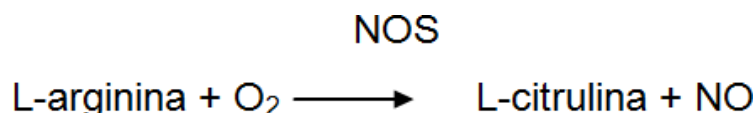
#### **1.4.2 Óxido nítrico**

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, altamente tóxica, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades. Tal toxicidade é associada à presença de sete elétrons de hidrogênio e oito de oxigênio, possuindo, dessa forma, um elétron desemparelhado, fato esse que o torna um agente químico extremamente reativo [31].

Essa molécula pode atuar como oxidante ou redutor, é rapidamente destruída pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitritos e nitratos [35], e também pode reagir facilmente com o radical superóxido ou metais como ferro, cobalto, manganês ou cobre [36].



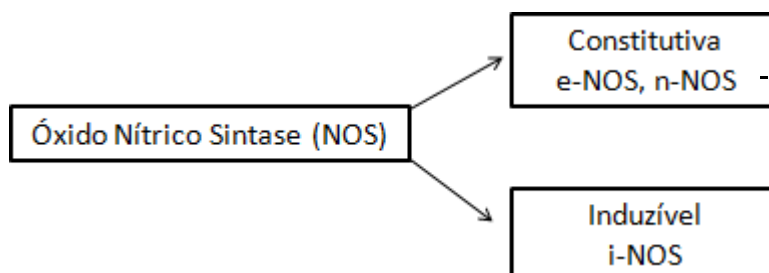
A síntese do NO é catalisada pela enzima NO-sintase (NOs); para tanto, ocorre a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e óxido nítrico [37].



**Figura 5:** Reação que mostra a formação do NO.

Fonte: adaptada [38].

Muitas isoformas de NOS já foram identificadas em diferentes tecidos, e diversas delas já tiveram seus genes clonados. Através da análise sequencial de aminoácidos, chegou-se à conclusão de que essas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Dessa forma, são agrupadas em duas categorias: NOS constitutiva (c-NOS) e NOS induzível (i-NOS), diferindo em relação ao peso molecular, forma de ativação e capacidade de síntese de NO [37].



**Figura 6:** Esquema que mostra as isoformas da NO-sintase.

Fonte: adaptada [31].

Na categoria da NOS constitutiva, encontramos a NOS neuronal (n-NOS), normalmente presente nos neurônios e a NOS endotelial (e-NOS), presente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas [39]. Ambas são expressas continuamente na ausência de agentes indutores, ou seja, apresentam uma concentração basal e são dependentes de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e calmodulina [38].

No entanto, na categoria da NOS induzível, ao contrário da primeira, a i-NOS não é detectada em condições basais, requerendo, para sua expressão e

atividade, síntese protéica. Endotoxinas bacterianas, juntamente com citocinas como TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL-1 $\beta$ ) ou imunoglobulinas (IG-g), induzem a sua síntese nas 2-4 primeiras horas após a exposição a um agente, e esta pode ficar ativa por até 20 horas posteriores a sua síntese [36].

Quanto à ação de cada uma das NOS, sabe-se que a eNOS favorece a diminuição da pressão sanguínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária; a nNOS regula a transmissão neuronal e responde por funções de um neurotransmissor; e as iNOS formam NO induzido por certas citotoxinas, estando intimamente relacionada aos processos de defesa do organismo [38].

O óxido nítrico é considerado essencial para a homeostase vascular e prevenção de doenças cardiovasculares. Da mesma forma, é o principal mediador citotóxico de células imunes, e tem papel mensageiro/modulador em diversos importantes processos biológicos. No entanto, como dito anteriormente, o NO é altamente tóxico, sendo essa toxicidade proeminente em situações de estresse oxidativo e na deficiência do sistema antioxidante [31].

Os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos das isoformas do óxido nítrico sintase estão relacionados aos seus níveis de concentração. 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ou peroxinitrito (ONOO), o NO passa a agir como espécie ativa de nitrogênio, responsável por inúmeras ações citotóxicas em um quadro conhecido como estresse nitrosativo [28,37].

A hipertensão portal já foi previamente associada ao estresse oxidativo e à super-produção de óxido nítrico, ambos possuindo um importante papel nesse distúrbio hemodinâmico [38].

Kanwar *et al.*, 1996 demonstraram um aumento na atividade da NOS dependente de cálcio após estenose da veia porta [41]. Muitos fatores, incluindo o estresse de cisalhamento, vasopressina, angiotensina II e norepinefrina, podem elevar a forma constitutiva da NOS, e todos esses fatores estão aumentados na hipertensão portal [40].

Dessa forma, observamos na HP uma alta concentração de óxido nítrico, estando esse aumento intimamente relacionado com o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica e estresse oxidativo [46].

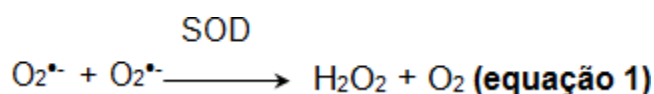
## 1.5 Defesas antioxidantes

A fim de se proteger contra os danos acarretados pelo estresse oxidativo, necessitamos de um sistema capaz de prevenir a formação de radicais livres e neutralizar os danos oxidativos, o que é feito através dos antioxidantes, que podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações – comparadas àquelas de um substrato oxidável (macromoléculas como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA) – atrasa ou impede a oxidação daquele substrato. Dentre esses sistemas de defesa, encontramos o enzimático, formado por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST), e/ou não enzimático, como o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), flavonóides e  $\beta$ -carotenos [30].

### 1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

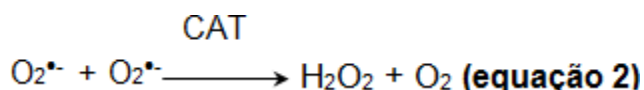
Os antioxidantes enzimáticos compreendem agentes que cataliticamente removem os radicais livres e outras espécies ativas. Dentre essas enzimas, podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) [30].

A SOD atua na dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo que o primeiro é menos reativo, e pode ser degradado por outras enzimas (equação 1) [42].

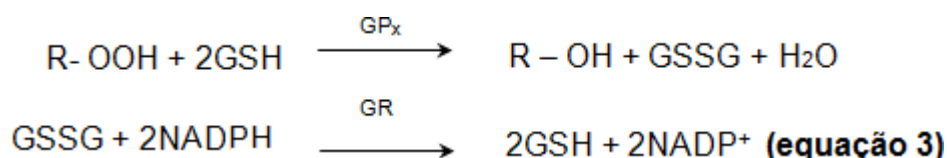


O  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela ação da enzima SOD, apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando radical hidroxila. Assim, a remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos [44].

A ação da CAT, que é bastante específica, pode ser observada na equação 2, na qual essa enzima catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.



Entre as peroxidases, destaca-se a enzima glutathiona peroxidase (GPx), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que será, por sua vez, regenerada por ação da glutathiona redutase com consumo de fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). Neste processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, formando glutathiona dissulfeto (GSSG) [30] (equação 3).



Assim como as enzimas que atuam removendo os radicais livres, existem substâncias com propriedades antioxidantes, capazes de evitar reações oxidativas em cadeia, como a lipoperoxidação (LPO), conhecidas como defesas antioxidantes não-enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathiona, o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), os  $\beta$ -carotenos e os flavonóides. [44]

### 1.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Dentre as substâncias antioxidantes não enzimáticas, podemos comentar algumas que se destacam. A glutathione participa de reações de enzimas antioxidantes tais como a glutathione peroxidase e a transferase. Dessa forma, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de espécies reativas de oxigênio, através de uma via não enzimática. A glutathione é um tripeptídeo de ácido  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina, cuja ação deve-se à presença de um grupo sulfidril, que atua como doador de elétrons [44].

O ácido ascórbico (vitamina C) é um composto hidrossolúvel que atua como co-substrato na biossíntese de colágeno, catecolaminas e carnitina. Este composto atua como *scavenger* de  $O_2^{\circ-}$  e  $OH^{\circ-}$ , ou seja, um antioxidante varredor de radicais livres [30].

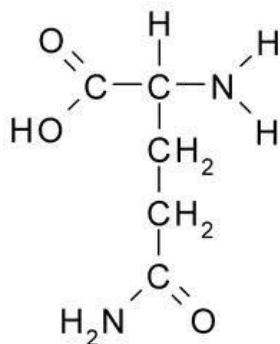
O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) possui a capacidade de neutralizar radicais, absorvendo a sua energia de excitação. A vitamina E age principalmente com o oxigênio *singlet*, em concentrações baixas e com alta afinidade à luz [45].

Os flavonóides são fitoterápicos descritos como antioxidantes, presentes nas folhas e partes externas das plantas. Muitos desses compostos estão sendo estudados e vêm apresentando resultados bastante promissores. Nosso laboratório obteve dados importantes ao estudar, por exemplo, o flavonóide quercetina, em modelos experimentais de cirrose induzida por ligadura de ducto biliar [48] e tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) [47], bem como em modelo de diabetes induzida por streptozotocina [49].

O uso de substâncias antioxidantes na prevenção ou tratamento de diferentes doenças relacionadas ao estresse oxidativo parece ser uma alternativa viável na tentativa de minimizar ou reverter os danos. Uma das substâncias com tais propriedades, utilizada na clínica médica, é a Glutamina.

### 1.6 GLUTAMINA

A Glutamina (GLU) é um aminoácido polar sem carga não essencial ou ocasionalmente essencial, hidrofílico encontrado na superfície das proteínas onde interage com a água [50].



**Figura 7:** Fórmula química da Glutamina.

**Fonte:** adaptada [51].

A Glutamina apresenta um papel fundamental na defesa imunológica da barreira mucosa do intestino através da sua participação na formação de imunoglobulinas, especialmente IgA. Esta substância foi inicialmente utilizada de forma profilática em pacientes a serem submetidos à radioterapia, onde se observou uma diminuição da incidência e da gravidade da enterite actínica [53].

Ainda, a ação protetora da Glutamina foi demonstrada em estudos experimentais como promissora na prevenção e diminuição da geração de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias. Häussinger & Schliess (2007) avaliaram a ação protetora da Glutamina contra lesões hepáticas induzidas por choque hemorrágico em ratos. Este aminoácido age sobre a atividade dos macrófagos interferindo na fagocitose em sítios inflamatórios. A Glutamina, na presença de inflamação, aumenta o fluxo de glutatona no fígado e no trato gastrointestinal [54].

Em estudos realizados em nosso laboratório demonstram que a administração da Glutamina melhorou a resposta inflamatória reduzindo a geração de radicais livres e citocinas envolvidos em modelo experimental de colite induzida por TNBS. Em outro estudo, utilizando o modelo experimental de ligadura parcial de veia porta (LPVP), foi sugerido que tratamento com a Glutamina protege a mucosa gástrica e diminui o dano oxidativo do trato gastrointestinal por sua possível ação antioxidante [64].

A intrínseca conexão e cooperação entre intestino e fígado representam uma entidade funcional denominada eixo intestino-fígado.

A integridade da barreira intestinal é crucial para a manutenção da homeostase hepática.

Dentro deste contexto é importante avaliar nesse modelo experimental : hipertensão porta, uma das complicações da cirrose, o intestino desses animais.

Tendo em vista tais considerações, propomo-nos a desenvolver o modelo experimental de hipertensão portal em ratos e utilizar a Glutamina como tratamento antioxidante, com o intuito de avaliar as alterações intestinais, estresse oxidativo e nitrosativo decorrentes da HP.

## **2 Justificativa**

Este projeto de pesquisa está direcionado a área de fisiologia digestiva, com enfoque em modelo experimental relacionado ao estresse oxidativo e à possível proteção de um tratamento antioxidante.

Dentro dessa linha de pesquisa, procuramos investigar as alterações intestinais na hipertensão portal, decorrente da excessiva pressão no sistema portal, que acarreta o desenvolvimento de colaterais portossistêmicos que provocam a dilatação vascular.

O Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental desenvolve modelos experimentais de diferentes doenças relacionadas ao estresse oxidativo, dentre eles o modelo de ligadura parcial da veia porta utilizando diferentes antioxidantes como a quercetina, melatonina, N-acetilcisteína. Neste projeto pretendemos utilizar a Glutamina um antioxidante já utilizado em outros modelos experimentais, na tentativa ampliarmos o entendimento dos mecanismos fisiológicos presentes na hipertensão portal, bem como a possível intervenção de um tratamento antioxidante nesta doença.

## **3 Objetivo geral**

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar a ação da Glutamina em ratos com Hipertensão Portal, submetidos ao modelo experimental de ligadura parcial da veia porta (LPVP).

### **3.1 Objetivos específicos**

1. Avaliar a pressão portal nos animais dos diferentes grupos experimentais.
2. Avaliar a lipoperoxidação no intestino através da técnica de TBARS nos animais dos diferentes grupos;
3. Avaliar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase no intestino nos animais dos diferentes grupos



4. Determinar os metabólitos do óxido nítrico (nitritos/nitratos) no intestino nos animais dos diferentes grupos
5. Avaliar as alterações histológicas no intestino nos animais dos diferentes grupos .

4

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento da Pesquisa

Este estudo teve caráter experimental qualitativo e quantitativo, e para isso, foi realizado a indução da hipertensão portal, pelo modelo de ligadura parcial de veia porta (LPVP).

### 4.2 Animais

Foram utilizados 29 ratos machos Wistar, com 60 dias, pesando entre 200 e 300 gramas, adquiridos conforme as especificações da Unidade de Experimentação Animal de fornecedores cadastrados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em grupos de 3 animais por caixa, em caixas plásticas, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas), temperatura de  $22 \pm 2$  °C e umidade relativa de 40-60% e exaustão de ar. A água e a ração foram administradas livremente, sendo tratados diariamente com água e ração padrão da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA).

Os animais ao chegarem à Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA) ficaram em um período denominado de quarentena, sendo este composto de 15 dias de separação, para prevenir a propagação doenças, analisar a saúde do animal e adaptar o mesmo após ter sido transportado de outro local.

Os procedimentos com os animais foram executados de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) bem como o preconizado no Guide Laboratory for the care and use of animals e *Principles for Research Involving Animals*.<sup>[55]</sup> Os procedimentos foram desenvolvidos em conformidade à legislação vigente no Brasil para a prática de pesquisa científica com

uso de animais (Lei 11.794 (Diário Oficial da União - 08/10/2008), Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA (2016) e Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018). Resoluções Normativas do CONCEA 37 (2018), 33 (2016) e RN 30 (2016).

Para detectar uma diferença na magnitude de 1,5 desvio padrão (magnitude de efeito grande) mantendo-se um  $\alpha=0,05$  e  $\beta=90\%$ , foram calculados seis ratos por grupo ( $n=6$ ), totalizando 24 ratos, na qual esse cálculo foi baseado em estudos anteriores do grupo baseado da lipoperoxidação no intestino. Neste modelo não há indicação de morbimortalidade inerente ao procedimento.

### **4.3 Grupo piloto**

Foi necessário um grupo piloto, composto de 5 animais para a adequação do equipamento de avaliação pressórica.

Após a análise e aprovação do projeto de pesquisa, deu-se início ao ensaio piloto, que foi fundamental para amadurecer e definir parâmetros analíticos, no que concerne à amostra e aos procedimentos a fim de obter uma maior uniformidade possível em sua execução.

Os animais submetidos a este estabelecimento foram anestesiados com indução (4-5%) e manutenção (2-3%) anestésica com isoflurano diluído em 100% de O<sub>2</sub> (fluxo de O<sub>2</sub> = 0,5L/min), onde posteriormente foi realizado uma incisão mediana no abdome (na linha alba), e localizada da veia mesentérica, onde nesta foi feito a aferição da pressão portal utilizando-se um cateter de calibre 21G ligado a um polígrafo que registra a pressão no sistema portal. Ao final, os animais sofreram eutanásia por exsanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito na Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018), normativa vigente no país. As carcaças dos animais foram acondicionados em embalagens específicas para descarte e recolhimento conforme rotina empregada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### 4.4 Grupos experimentais

O modelo utilizado foi de indução da hipertensão portal através de ligadura parcial de veia porta (LPVP), e os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, com 6 animais por grupo, totalizando 24 animais.

I. Controle (SO - sham-operated) + Veículo (NaCl)- Grupo submetido à simulação da cirurgia, e administração de veículo por 7 dias;

II. Controle (SO - sham-operated) + Glutamina (GLU) - Grupo submetido à simulação da cirurgia e tratamento com GLU por 7 dias;

III. Hipertensão Portal (LPVP) + Veículo (NaCl) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e administração de veículo por 7 dias;

IV. Hipertensão Portal (LPVP) + Glutamina (GLU) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e tratamento com GLU por 7 dias.

Os animais após o procedimento cirúrgico ficaram em gaiolas devidamente identificadas, com 3 animais por caixa, onde tendo sido necessário foi realizado o enriquecimento ambiental, visando promover um ambiente mais agradável, permitindo que os animais conseguissem expressar seu comportamento natural para obterem melhores respostas, não somente pelo bem-estar promovido para o animal, mas também por resultados mais fidedignos, uma vez que os animais passaram a se comportar de maneira mais similar à natural. Não houve restrições quanto ao uso de enriquecimento ambiental (rolo de papel, papel, semente de girassol).

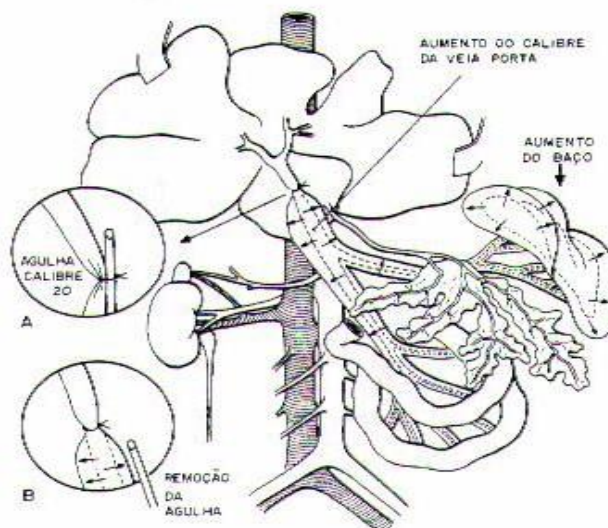
Os animais tiveram monitoramento clínico e foram pesados periodicamente a cada 3 dias, onde nesse momento também foi avaliado quanto a composição corpórea (perda de peso/caquexia, atrofia muscular, ganho de peso), grau de alerta mental (inquietação, depressão/apatia), mobilidade (letargia, ataxia), postura (incapacidade de permanecer em pé, arqueamento do dorso), alteração em frequência e padrão respiratório, coloração de mucosas (cianose, palidez), grau de hidratação (aumento do tempo de pregueamento da pele, enoftalmia, oligúria), alimentação (anorexia), defecação (diarreia, constipação, distensão abdominal), aspectos da ferida cirúrgica (deiscência, infecção), etc.

Os animais que apresentaram quaisquer alterações nesses parâmetros clínicos receberam maior atenção e doses mais seguidas do analgésico, mas devido a experiência do grupo no mesmo modelo, não houve nenhum incidente. Caso houvesse seria realizado a antecipação de morte relacionado com perda de peso superior a 10% na primeira semana ou 15% até o final do protocolo experimental ou outras alterações clínicas não revertidas/minimizadas com manejo, analgésicos.

## **4.5 Procedimentos experimentais**

### **4.5.1 Desenvolvimento do modelo de hipertensão portal pela ligadura parcial de veia porta**

Os animais foram anestesiados com indução (4-5%) e manutenção (2-3%) anestésica com isoflurano diluído em 100% de O<sub>2</sub> (fluxo de O<sub>2</sub> = 0,5L/min). Imediatamente após a cirurgia foi administrado Tramadol (20 mg/kg) intraperitonealmente, e depois por 3 dias no período pós operatório a cada 12 horas. Após terem sido anestesiados, realizou-se uma incisão mediana no abdome (na linha alba), as alças intestinais foram retiradas da cavidade delicadamente e colocadas sobre uma gaze umidificada com soro fisiológico para a localização da veia porta e isolamento da mesma. Uma agulha de 20G foi colocada paralelamente sobre a veia porta e ambas foram amarradas em fio de seda 3.0. Após, a agulha foi retirada delicadamente, deixando o vaso parcialmente obstruído para a indução da hipertensão portal experimental [5].



**Figura 8:** Modelo de ligadura parcial da veia porta.  
**Fonte:** adaptada [5].

Após, as alças intestinais foram recolocadas delicadamente no abdome e, com pontos contínuos, fechou-se o peritônio, antes tendo o cuidado de infundir cerca de 10mL de solução fisiológica na cavidade abdominal. Após a suturação do peritônio, a parede exterior foi suturada com pontos isolados utilizando fio de vicryl 4.0

Uma solução antisséptica iodada foi aplicada, e os animais permaneceram em incubadoras até plena recuperação pós-cirúrgica, antes de serem direcionados para suas respectivas caixas. Após a recuperação pós cirúrgica, da anestesia, os animais recuperaram-se em caixas individuais, forradas com maravalha e em incubadoras para recém-nascidos (aquecimento e suporte de oxigênio), onde foram analgesiados no pós-operatório com tramadol (20 mg/kg) intraperitoneal, e a cada 12 horas por 3 dias. A primeira dose foi administrada antes do procedimento cirúrgico.

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

Após a cirurgia de ligadura parcial da veia porta, os animais receberam o tratamento com a Glutamina, ou solução fisiológica, dependendo o grupo. Não há registro de morte nestes animais.

#### **4.5.2 Administração do veículo e da Glutamina**

O tratamento com a Glutamina foi administrado na dose de 25mg/Kg que foi diluída em 0,6 mL de NaCl a 0,9%, e ocorreu no 8º dia após a cirurgia, por via intraperitoneal, uma vez ao dia, durante o período 7 dias.<sup>[9]</sup> . Os animais controle receberam o veículo (solução fisiológica – NaCl 0,9%) no volume de 0,6 mL, por via intraperitoneal, pelo mesmo período.

#### **4.5.3 Aferição da pressão venosa portal**

No 15º dia após a cirurgia, os animais foram novamente anestesiados com indução (4-5%) e manutenção (2-3%) anestésica com isoflurano diluído em 100% de O<sub>2</sub> (fluxo de O<sub>2</sub> = 0,5L/min). Novamente foi realizado uma incisão mediana no abdome (na linha alba), e posteriormente localizou-se veia mesentérica, onde foi feito a aferição da pressão portal utilizando-se um cateter de calibre 21G introduzido na veia mesentérica ligado a um polígrafo que registrou a pressão no sistema portal (*Biopac Systems, Inc Santa Barbara, Califórnia*)<sup>[64]</sup>

#### **4.5.4 Morte dos animais e obtenção das amostras**

Após os procedimentos de aferição, o intestino grosso foi coletado para as posteriores análises.

1º) Um pequeno fragmento das amostras foi retirado e emergido, em formol 10% para posterior análise histológica;

2º) O restante foi pesado e congelado a -80°C para as análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes, nitritos e nitratos.

Ao final do experimento, os animais foram eutanásia por exsanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito na Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018), normativa vigente no país. RN 33/2016.

As carcaças dos animais foram acondicionadas em embalagens específicas para descarte e mantidos em freezer até o recolhimento para incineração conforme



rotina empregada pela Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **4.6 Avaliações bioquímicas**

### **4.6.1 Preparação do homogeneizado**

Após terem sido retirados, os intestinos grossos dos animais foram pesados e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, estes órgãos individualmente foram homogeneizados durante 1 minuto em Ultra-Turrax (IKA-WERK), na presença de cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5 mL por g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonina (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 $\mu\text{L}$  por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases, e será utilizado para que não houvesse degradação das enzimas, cuja atividade será medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g) em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge), e o sobrenadante retirado e congelado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para as dosagens posteriores [56].

### **4.6.2 Dosagem de proteína**

A concentração de proteínas nos homogeneizados foi determinada através do método de Bradford, onde foi utilizada uma curva de albumina bovina (SIGMA) como padrão. As amostras foram mensuradas espectrofotometricamente à 595 nm, e os valores expressos em mg/mL. Esses valores foram utilizados para calcular posteriormente o TBARS e os valores das enzimas antioxidantes [57].

## 4.7 Determinação do estresse oxidativo

### 4.7.1 Determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

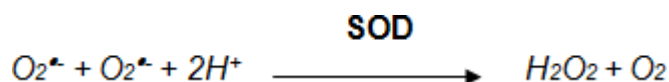
A lipoperoxidação foi determinada através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A técnica de TBARS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e conseqüente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 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 reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA tem 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 acrescenta-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos serão colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado será retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBARS é expressa em nmoles/mg de proteína [58].

### 4.7.2 Determinação da 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 baseia-se na inibição dessa reação. Para tanto, se utilizará adrenalina que, no meio alcalino, se transforma em adenocromo, produzindo  $O_2^{\bullet-}$  que é o substrato da enzima. Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, se fará a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50  $\mu$ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), esta correspondendo a 100% da reação. Essa mistura será agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, se adicionará diferentes volumes do homogeneizado e medira-se a inibição da reação. A atividade enzimática será expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina).

Para cada amostra medida, foi repetido os seguintes passos:

1. Foi colocado 950  $\mu$ L de tampão junto com 50  $\mu$ L de amostra e 17  $\mu$ L de adrenalina, após o aparelho ser zerado.
2. Será acrescentado 975  $\mu$ L de tampão junto com 25  $\mu$ L de amostra e 17  $\mu$ L de adrenalina, após o aparelho ser zerado.
3. Após será colocado 990  $\mu$ L de tampão junto com 10  $\mu$ L de amostra.

Com os 17  $\mu$ L de adrenalina, se procederá 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 <sup>[59]</sup>.

#### **4.8 Medidas de nitritos e nitratos**

O Óxido Nítrico é uma substância extremamente lábil, com uma meia vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Dessa forma, a medida do NO faz-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, utiliza-se, posteriormente, o reagente de Griess.

Para realizar a técnica serão necessários 500  $\mu$ L de amostra, 100  $\mu$ L NADPH (0,2 mM), 70  $\mu$ L Tris Buffer 1M, pH 7,5, 230  $\mu$ L de uma mistura formada por glicose

6-fosfato (50 mM) e glicose 6-fosfato desidrogenase (100 U/mL), 100 µL de nitrato redutase (10/mL), essa mistura será incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Posteriormente será utilizado 750 µL dessa mistura e será adicionado 750 µL do reativo de Griess, incubando-a novamente, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A leitura será realizada a 550 nm e feita uma curva padrão para a determinação de nitritos e nitratos <sup>[61]</sup>.

#### **4.9 Avaliação histopatológica do intestino por hematoxilina e eosina**

Para a dissecação anatômica, amostras do intestino foram colocados em formol 10%. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomo (Leitz □ 1512) onde se realizaram cortes com 3 micra (3 □). Na fase de coloração, as lâminas são 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. Coloca-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, no serviço de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por um patologista cegado para o experimento

#### **5. Análise estatística**

A partir dos dados coletados, as médias e os desvios padrões de cada grupo foram calculadas, utilizando, para análise estatística, GraphPad Instat versão 3.0. O teste utilizado para a análise de variância dos resultados foi o de ANOVA ONEWAY, seguido do teste de Student-Newman-Keuls para dados paramétricos.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativo quando obtivemos um nível de significância de pelo menos 5% (  $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

---

## 6.1 VERIFICAÇÃO DA PRESSÃO PORTAL

Observando a Figura 9 nota-se um aumento estatisticamente significativo na pressão portal dos animais do grupo LPVP em relação aos demais grupos experimentais. Observa-se diminuição significativa nos valores de pressão portal nos animais do grupo LPVP+GLU sendo  $p < 0,05$

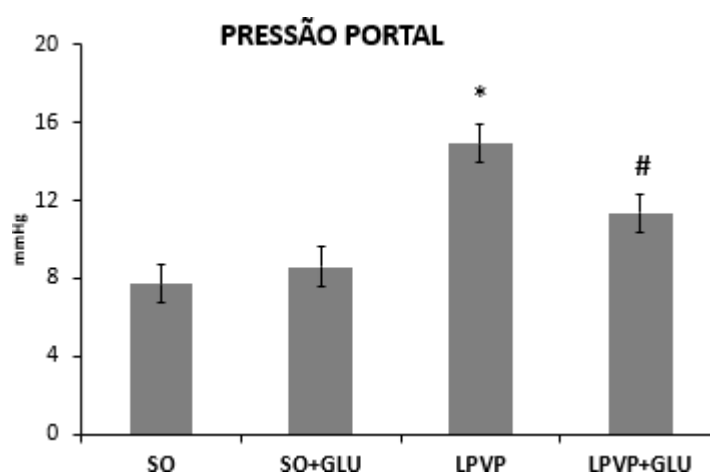


Figura 9: Efeito da administração da Glutamina (GLU) sobre os níveis de pressão portal nos grupos SO, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU.

Dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$  animais cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

\*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

#: diferença significativa do grupo LPVP+GLU em relação ao grupo LPVP ( $p < 0,05$ )

## 6.2 MEDIDA DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Os valores de lipoperoxidação no intestino demonstraram aumento estatisticamente significativo no grupo LPVP, sendo  $p < 0,01$  em relação a todos os demais grupos (SO, SO + GLU e LPVP+GLU). Os animais LPVP+GLU apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo LPVP.

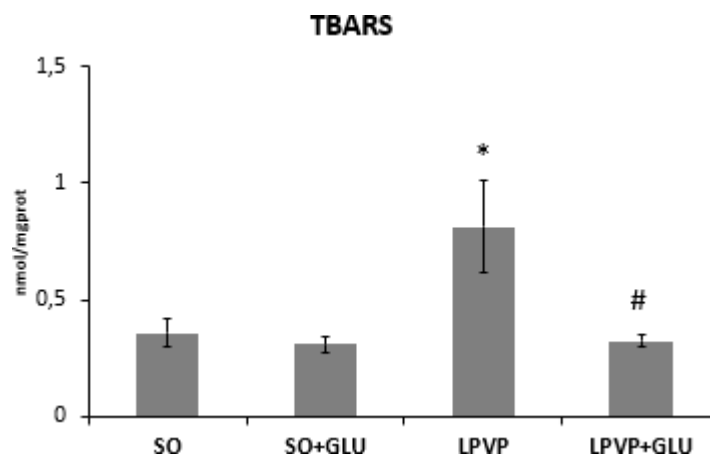


Figura 10: Efeito da administração da Glutamina (GLU) sobre os níveis de TBARS nos grupos SO, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU.

Dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$  animais cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

\*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

#: diferença significativa do grupo LPVP+GLU em relação ao grupo LPVP ( $p < 0,05$ )

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Na Figura 11, são apresentados os resultados da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado de intestino dos animais nos diferentes grupos, mostrando uma diminuição significativa no grupo LPVP em relação aos demais ( $p < 0,05$ ).

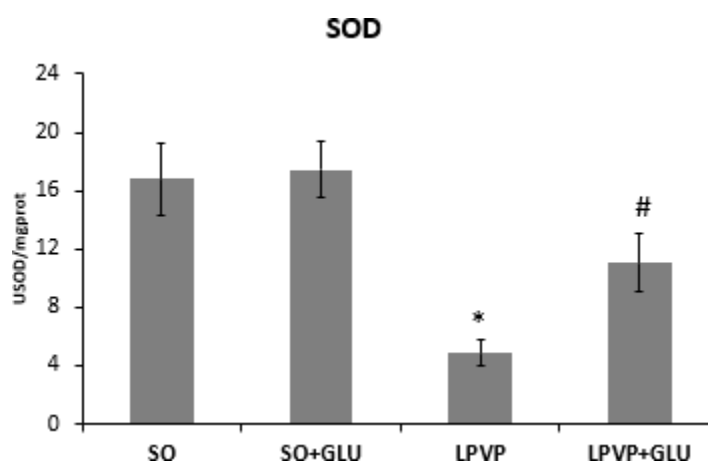


Figura 11: Efeito da administração da Glutamina (GLU) sobre os níveis de SOD nos grupos SO: Sham-operated, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU.

Dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, n = 6 animais cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

\*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

#: diferença significativa do grupo LPVP+GLU em relação ao grupo LPVP ( $p < 0,05$ )

#### 6.4 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Na Figura 12, observamos os valores referentes aos nitritos e nitratos no homogeneizado de intestino de animais dos diferentes grupos experimentais. Observa-se aumento significativo dos metabólicos nos grupos LPVP em relação aos grupos SO, SO+GLU e uma diminuição significativa quando administrado a Glutamina no grupo LPVP+GLU, sendo  $p < 0,05$

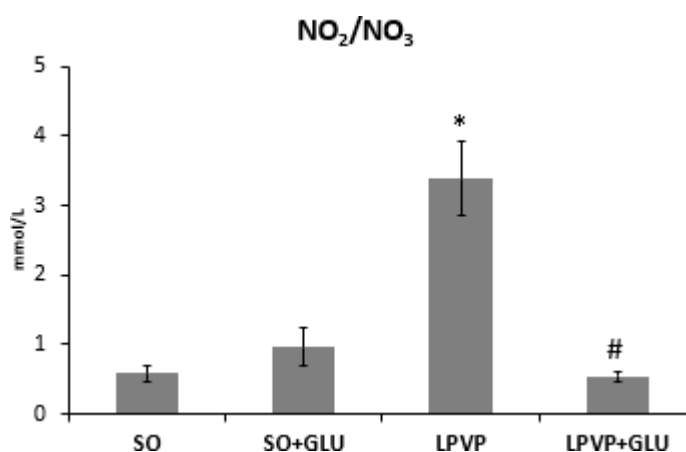


Figura 12: Efeito da administração da Glutamina (GLU) sobre os níveis de NO nos grupos SO, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU.

Dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, n = 6 animais cada grupo. As notações sobrescritas têm a seguinte significância:

\*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ( $p < 0,01$ ).

#: diferença significativa do grupo LPVP+GLU em relação ao grupo LPVP ( $p < 0,05$ )



## 6.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA E EOSINA

Observa-se a estrutura microscópica do intestino de animais SO, SO+GLU, LPVP e LPVP+GLU. A fotomicrografia do intestino dos animais dos grupos controle (SO) e do grupo SO+GLU mostra o intestino com padrão normal apresentando as criptas, as células caliciformes, a mucosa normal e submucosa sem edema. No grupo (LPVP), mostra alterações na mucosa, com diminuição das células caliciformes, vasos sanguíneos dilatados e edema. Na fotomicrografia do intestino dos animais do grupo LPVP tratado com Glutamina (LPVP+GLU), observa-se a redução do edema, desaparecimento de vasos sanguíneos dilatados, e reestruturação da mucosa à semelhança dos grupos controles.

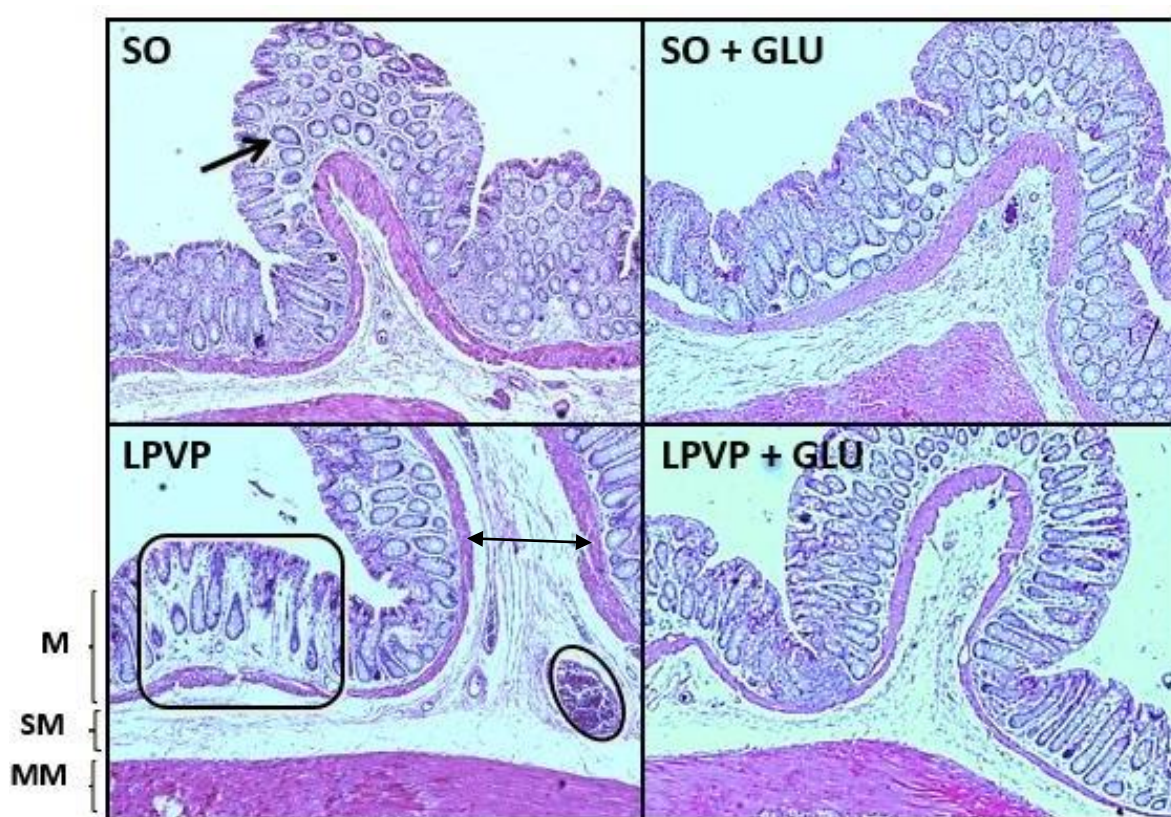


Figura 13 – Análise histológica intestino de ratos com LPVP e tratados

## 7 DISCUSSÃO



## 7. Discussão

A hipertensão portal é associada com o desenvolvimento de uma circulação hiperdinâmica, que é caracterizada por vasodilatação e aumento de débito cardíaco e/ou fluxo sanguíneo [67].

O desenvolvimento de colaterais porto sistêmicos é a resposta do aumento da pressão portal [68]. Essa circulação de colaterais portossistêmicos ocorre para desviar o fluxo sanguíneo da região obstruída que poderá ser antes do fígado (pré-hepática), dentro do fígado (intra-hepática) ou após (pós-hepática). No modelo utilizado neste estudo a obstrução é pré-hepática resultando daí mecanismos compensatórios como a formação de varizes distribuídas ao longo do trato gastrointestinal. Varizes gastroesofágicas são mais preponderantes e estudadas neste modelo com uso de diferentes antioxidantes, como quercetina nos trabalhos de Moreira et al., 2004; Glutamina nos estudos de Marques, et al., 2011 e 2013; e de Licks et al., 2016 analisando o intestino de animais com LPVP frente a NAC.

Modelos experimentais em animais são importantes ferramentas de estudo e a Ligadura Parcial da Veia Porta (LPVP), é um modelo de obstrução pré-hepática desenvolvendo a Hipertensão Portal (HP), levando a uma circulação hiperdinâmica, possibilitando o estudo dos mecanismos patológicos e fisiológicos envolvidos nessa doença [67; 71]

Uma das complicações advinda da hipertensão portal é a colopatia da hipertensão portal, com risco de sangramento em pacientes cirróticos, de 1-8% em varizes cólon e de 44-89% em varizes do reto em pacientes cirróticos [74; 75 e 76]

A LPVP resulta em injúria oxidativa como foi descrito por vários pesquisadores Moreira et al., 2004 em estômago; Fernando et al., 1998 e Licks, et al., 2014 na mucosa gástrica e em Licks, et al., 2016 no intestino.

Em nosso trabalho observamos um aumento na pressão portal dos animais LPVP que foi acompanhada com alterações histológicas evidenciadas com edema, vasodilatação na submucosa do intestino, desruptura da mucosa.

A Glutamina é descrita como hábil em reduzir dano oxidativo avaliado pela diminuição da lipoperoxidação, com efeito antioxidante verificado na mucosa gástrica [64; 77].

A Glutamina determinou diminuição significativa da pressão portal neste modelo, resultados similares obtidos por outros autores com o uso de quercetina e NAC bem como restabeleceu as criptas da mucosa intestinal, diminuiu o edema e o diâmetro dos vasos [71; 72].

Observamos um aumento significativo dos níveis de (TBARS) nos animais do grupo LPVP, comparados aos demais. A LPVP ocasiona dano oxidativo<sup>[32]</sup>, afirmando que a geração de espécies reativas de oxigênio pode estar intimamente relacionada com as alterações hemodinâmicas observadas na hipertensão portal [17]. Zobot et al., 2017 observaram níveis significativos de lipoperoxidação em intestino no modelo de isquemia e reperfusão. Associado ao dano oxidativo foi descrito em diferentes modelos experimentais de cirrose, seja por CCl<sub>4</sub>, inalatório ou intraperitoneal<sup>[79]</sup>, cirrose por obstrução do duto biliar comum<sup>[48]</sup>, e em modelo de hepatocarcinoma por DEN<sup>[71]</sup>. Nestes modelos foi observado o envolvimento do estresse oxidativo através do aumento de lipoperoxidação e diminuição das enzimas antioxidantes. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso trabalho ao avaliarmos o nível de lipoperoxidação no intestino de animais submetidos ao modelo de LPVP. O uso de Glutamina diminuiu significativamente a lipoperoxidação. É interessante ressaltar que outros autores ao avaliar o estômago desses animais, utilizando quercetina ou Glutamina encontraram resultados semelhantes aos nossos<sup>[9; 71]</sup>. A Glutamina possui a habilidade de interagir com os agentes oxidantes, atuando como “scavenger” de radicais livres. Ainda, a Glutamina contribui para a restauração da glutathione, importante antioxidante não-enzimático<sup>[9]</sup>.

Assim, a redução da lipoperoxidação neste trabalho, através do uso da Glutamina, é justificada pelas suas propriedades antioxidantes.

Enzimas antioxidantes tais como SOD, CAT e GPx tem um papel importante protegendo a mucosa intestinal das agressões das EAO.

A atividade da enzima SOD, tem uma redução significativa nos animais do grupo LPVP quando comparada aos demais grupos. Observação semelhante na mucosa gástrica por Marques et al., 2011. O decréscimo da atividade da enzima SOD, aumenta o estresse oxidativo, pois ela é responsável por dismutar os ânions radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. A Glutamina foi capaz de restaurar a atividade da SOD, estando os valores do grupo LPVP+GLU significativamente

aumentados em relação ao grupo LPVP. O sistema de defesa antioxidante, tanto enzimático como não-enzimático, é encarregado de manter baixas as concentrações de ERO. Para tanto, esse sistema age prevenindo a formação dessas espécies, promovendo a sua captura, ou reparando o dano causado por tais moléculas. Podemos dizer que esse sistema compreende a primeira linha de defesa antioxidante do nosso organismo no combate às espécies reativas de oxigênio <sup>[59]</sup> .

Wang et al.,2019 utilizando Bisferol, um importante agente oxidante, observaram um aumento significativo de EAO e de nitrogênio no fígado e no intestino sendo esses responsáveis pela detoxificação destas espécies, através do arsenal de enzimas antioxidantes, a SOD, a CAT, a GPx,. <sup>[78]</sup>.

O óxido nítrico parece estar intimamente relacionado com o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica na hipertensão portal. A obstrução ao fluxo sanguíneo, tanto pré, intra ou pós-hepática, leva ao represamento do sangue no sistema portal, ocasionando o aumento de pressão no território esplâncnico. Nessa região, ocorre estresse de cisalhamento e conseqüente liberação de agentes vasodilatadores, dentre eles o NO. Uma expressão e atividade aumentada da eNOS, fatores circulantes vasoativos (endotelina, angiotensina II, vasopressina, norepinefrina) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) também contribuem para o desenvolvimento da circulação colateral nesta doença <sup>[5]</sup>.

Avaliando os níveis de metabólitos do óxido nítrico, nitritos e nitratos encontramos um aumento significativo de NO nos animais do grupo LPVP. O excessivo aumento de NO tem um potencial tóxico e lesivo para o intestino como foi observado neste trabalho, relacionando o aumento dos metabólitos do NO e a lipoperoxidação apresentada nos animais LPVP. Níveis elevados de NO associado à produção de EAO, tem um papel lesivo para a mucosa intestinal, aumentando a susceptibilidade da barreira intestinal através da formação de peroxinitrito contribuindo para as lesões apresentadas na histologia

. Sendo assim, ao avaliarmos os metabólitos do NO em homogeneizado de intestino, observamos valores significativamente aumentados no grupo LPVP em relação aos demais. Esse aumento pode ser explicado pela progressiva dilatação dos vasos devido ao aumento de NO, um potente agente vasodilatador, e pela

histologia do intestino dos animais LPVP, onde visualizam-se edema de submucosa, vasodilatação e desarranjo da mucosa. Esse fenômeno contribui para o aumento de estresse oxidativo, uma vez que o NO pode reagir com o ânion superóxido e formar o radical peroxinitrito, espécie reativa extremamente danosa ao nosso organismo [80]

Nossos resultados demonstraram uma redução do NO nos animais tratados com a Glutamina, colaborando para a redução da pressão portal e a manutenção da integridade do intestino nesse modelo experimental. Moreira et al., 2004 e Marques et al., 2011 apontaram que o tratamento antioxidante com a quercetina e a Glutamina respectivamente, foram capazes de reduzir o NO, contribuindo para a redução da pressão portal e a manutenção da integridade da mucosa gástrica. A hipótese para a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico com o uso da Glutamina se baseia em sua ação inibitória sob a produção de NO [81]

Neste trabalho nós descrevemos os benefícios do uso de Glutamina sobre a pressão portal, estresse oxidativo e nitrosativo e a proteção oferecida à barreira intestinal. Mais estudos são necessários para esclarecer efetivamente como ocorre a proteção da barreira intestinal e a translocação bacteriana, um sério problema para pacientes cirróticos.

A diminuição da pressão portal, associada à restauração da mucosa intestinal, o aumento da enzima SOD e a redução do NO, (inibindo a formação de peróxido nítrico) sugerem um potencial uso da Glutamina como terapia futura nas complicações da hipertensão portal.

## **8. CONCLUSÕES**

- 1) Através dos resultados obtidos nos valores da pressão portal, concluímos que grupo LPVP demonstrou um aumento significativo da pressão no sistema portal, sendo a Glutamina capaz de reduzir os valores nesse modelo experimental.
- 2) Ao avaliarmos a lipoperoxidação no grupo LPVP, pela técnica de TBARS, concluímos que houve um aumento da lipoperoxidação sendo a Glutamina eficaz na redução desse dano.
- 3) A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) apresentou uma diminuição significativa nos animais do grupo LPVP, a Glutamina restaurou a atividade desta enzima.
- 4) Ao avaliarmos os metabólitos do NO, nitritos e nitratos, observamos um aumento significativo nos animais LPVP. A Glutamina foi capaz de reduzir a biodisponibilidade do NO,
- 5) Na análise histológica o grupo LPVP observamos um desarranjo da mucosa do intestino, com aumento de edema na submucosa e vasodilatação. A Glutamina foi capaz de restaurar a histologia à semelhança dos controles.

Por esses achados, constatamos que a Glutamina minimizou os danos na mucosa intestinal, avaliados pela histologia, acompanhada de uma melhora nos parâmetros de estresse oxidativo (avaliado por TBARS e pela SOD) e de uma redução dos metabólitos do óxido nítrico. Dessa forma, diante dos resultados, sugerimos que a Glutamina foi eficaz em reduzir os danos decorrentes do modelo de LPVP no intestino e assim, pode ser sugerida como uma alternativa terapêutica na atenuação dessa doença.

## **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Alguns estudos apontam que o modelo de LPVP é o mais promissor para estudos frente a permeabilidade da “barreira intestinal” pois representa uma complicação da cirrose pela circulação hiperdinâmica nesse território.

A translocação bacteriana e suas consequências mereceriam um estudo adicional, pois a microbiota é um campo aberto para muitas investigações futuras.

Neste contexto, pretendemos ampliar os estudos do eixo intestino-fígado avaliando o processo inflamatório, envolvimento de interleucinas e outros marcadores inflamatórios na translocação bacteriana (microbiota) e o papel dos neutrófilos e macrófagos nessa fisiopatogenia.



## **9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

### **9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Martinelli, ALC. Hipertensão portal. Medicina. 2008; 37: 253-261, jul./dez.

2. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol.* 2008; 48 Suppl 1:S68-92.
3. Ferraz AAB, Campos JM, Evangelista LF, Coelho ARB, Araújo-Filho JG, Feraz EM. Myoelectric activity of the small bowel of dogs submitted to partial occlusion of the portal vein. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2011;24(1): 20-25
4. Majid S, Azam Z, Shah HA, Salih M, Hamid S, Abid S, Jafri W. Factors determining the clinical outcome of acute variceal bleed in cirrhotic patients. *Indian J Gastroenterol.* 2009; May-Jun;28(3):93-5.
5. 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.
6. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, Davies S, Moore K. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1999; May;29(5):1358-63.
7. Rodríguez-Vilarrupla A, Bosch J, García-Pagán JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol.* 2007; Feb;46(2):193-7.
8. Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Effects of Glutamine on Proinflammatory Gene Expression and Activation of Nuclear Factor Kappa B and Signal Transducers and Activators of Transcription in TNBS-induced Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Nov; 14(11):1504-13.
9. Marques C, Mauriz JL, Simonetto D, Marroni CA, Tuñón MJ, González-Gallego J, Marroni NP. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. *Ann Hepatol.* 2011; Oct- Dec;10(4):531-9.
10. Guyton & Hall. *Tratado de Fisiología Médica.* 13ª Ed., Elsevier, 2017.
11. De Mello Aires Margarida. *Fisiología,* 4ª ed., Guanabara Koogan, 2012.
12. Berne & Levy. *Fisiología.* 6ª ed., Elsevier, 2009.
14. 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.

15. 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.
16. Miñano C, Garcia-Tsao G. Portal Hypertension. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010; 39(3): 681–695.
17. Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol.* 2003; 38 Suppl 1:S54-68.
18. Medicina Geriátrica [webpage]  
<http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/08/16/>
19. Iwakiri Y. Pathophysiology of portal hypertension. *Clin Liver Dis.* 2014 May;18(2):281-91.
20. 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.
21. Johns Hopkins Medicine – Gastroenterology & Hepatology. [webpage]  
[http://www.hopkinsgi.org/GDL\\_Disease.aspx](http://www.hopkinsgi.org/GDL_Disease.aspx)
22. Sánchez-Patán F., Anchuelo R., Vara E. *et al.* Prophylaxis with ketotifen in rats with portal hypertension: involvement of mast cell and eicosanoids. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008 Aug;7(4):383-94
23. Seo YS, Shah VH. The role of gut-liver axis in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension. *Clin Mol Hepatol.* 2012 Dec;18(4):337-46
24. Schimpl G, Pabst M, Feierl G, Kuesz A, Ozbey H, Takahashi S, Hollwarth M. A tungsten supplemented diet attenuates bacterial translocation in chronic portal hypertensive and cholestatic rats: role of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *Gut.* Dec 1999; 45(6): 904–910.
25. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Höllwarth M.E. Allopurinol and glutamine attenuate bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct ligatedgrowing rats. *Gut.* 1996 July; 39(1): 48–53.
26. Thuluvath PJ, Yoo HY. Portal Hypertensive gastropathy. *Am J Gastroenterol.* 2002; Dec;97(12):2973-8.

27. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem.* 1973; 134:707-16
28. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radical and Biology and Medicine*. 3ª Ed New York: Oxford, 2007.
29. Meneghini RA. Toxicidade do oxigênio. 28ª Ed, vol 5. *Ciência Hoje*,1987.
30. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35:1147-50
31. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Nitric oxide revision. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2003; vol.39 no.4 Rio de Janeiro.
32. Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K. N-Acetylcysteine Prevents Development of the Hyperdynamic Circulation in the Portal Hypertensive Rat. *Hepatology.* 1998; Sep;28(3):689-94.
33. Cahill PA, Redmond EM, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *J Hepatol.* 1996; Sep;25(3):370-8.
34. Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology.* 1995; Mar;108(3):761-7.
35. 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.
36. Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993 Nov;100(5):567-75.
37. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15;268(17):12231-4.
38. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. -002, 17(6).
39. Liaudet L, Soriano FG, Szabó C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28(4 Suppl):N37-52.

40. Iwakiri Y. The molecules: mechanisms of arterial vasodilatation observed in the splanchnic and systemic circulation in portal hypertension. *J Clin Gastroenterol.* 2007; Nov-Dec;41 Suppl 3:S288-94.
- 41 Kanwar S, Kubes P, Tepperman BL, Lee SS. Nitric oxide synthase activity in portal-hypertensive and cirrhotic rats. *J Hepatol.* 1996; Jul;25(1):85-9.
42. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; Jul;59(3):527-605.
43. Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci.* 2003,10:170–8.
44. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141: 312-22
45. Krinsky NI. Carotenoids as chemopreventive agents. *Prev Med.* 1989; 18:592-602
46. Ahmed F. Ahmed, Nabila N. El-Maraghy, Rasha H. Abdel Ghaney, Shima M. Elshazly. Therapeutic Effect of Captopril, Pentoxifylline, and Cordyceps Sinensis in Pre-Hepatic Portal Hypertensive Rats. *Saudi J Gastroenterol.* 2012; May-Jun; 18(3): 182–187.
47. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2003; Apr;48(4):824-9.
48. Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, González-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol.* 2000; Nov;33(5):742-50.
49. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF-kB Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nutr.* 2005; Oct;135(10):2299-304.
50. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol.* 2005 Aug;204:392–401.
51. Murray RK, Granne DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica. 9 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2002.

53. Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ, Salloum RM, Hautamaki RD, Plumley DA, Mendenhall WM, Bova FJ, Khan SR, Hackett RL. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer*. 1990 Jul 1;66(1): 62-8.
54. Israeli E, Berenshtein E, Wegrower D, Aptekar L, Kohen R, Zajicek G, Goldin E. 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.
55. Goldim JR, Raymundo MM. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. 2ª Ed. Porto Alegre. HCPA, 1997.
56. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*. 1985; Jun 30;71(3):241-9.
57. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; May 7;72:248-54.
58. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52:302-10.
59. 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.
60. Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*. 1973; May 15;32(1):132-4.
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. Laemmli U, Molbert E, Showe M, Kellenberger E. Form determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol*. 1970; Apr; 49:99-113.
63. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1992; 24:145-9.

64. Marques C, Mauriz JL, Simonetto D, Marroni CA, Tuñon MJ, González- Gallego J, Marroni NP. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. *Ann Hepatol.* 2011; Oct- Dec;10(4):531-9.
65. Suzuki K, Ota H, Sasagowa S, Sakatomi T, Fujikura T, Assay method for myeloperoxidase human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* Jul 15.132(2). 345-52.
66. Lioret S, Moreno JJ. Effects of an anti-inflammatory peptide antflammin 2)on cell influx, eicosanoid biosynthesis and **ocderma** formation by arachidonic acid and tetracleconoyl phorbol dermal application. *Biochem Pharmacol.* 1995 jul. 31.50(3); 347-53.
67. Bosch J1, Garcia-Pagán 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
68. Colle I, Geerts AM, Van Steenkiste C, Van Vlierberghe H. Hemodynamic changes in splanchnic blood vessels in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken).* 2008 Jun;291(6):699-713. doi: 10.1002/ar.20667
69. Zabot GP, Carvalhal GF, Marroni NP, Hartmann RM, da Silva VD, Fillmann HS. Glutamine prevents oxidative stress in a model of mesenteric ischemia and reperfusion. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 28;20(32):11406-14. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11406
70. Chen L, Cui H Targeting Glutamine induces apoptosis: a cancer therapy approach. 2015 *Int J Mol Sci* 16:22830-22855
71. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, González-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004 Nov 15;68(10):1939-46.
72. Licks, F; Hartmann, RM; Schemitt, E; Colares, JR ; Fillmann, LSi ; Fillmann, H ; Marroni, NP . Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine. *JOURNAL OF COLOPROCTOLOGY (RIO DE JANEIRO. IMPRESSO)*, v. 36, p. 231-239, 2016
73. Licks, F. ; Marques, C. ; Zettler, C. ; Martins, M. I. M. ; Marroni, C. A. ; Marroni, N. P. Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats. *Annals of Hepatology*, v. May-Ju, p. 370-7, 2014.

74. Sharma M, Rameshbabu CS. Collateral pathways in portal hypertension. *J Clin Exp Hepatol*. 2012 Dec;2(4):338-52. doi: 10.1016/j.jceh.2012.08.001. Epub 2012 Dec 16
75. Ganguly S, Sarin SK, Bhatia V, Lahoti D. The prevalence and spectrum of colonic lesions in patients with cirrhotic and noncirrhotic portal hypertension. *Hepatology*. 1995 May;21(5):1226-31
76. Luigiano C, Iabichino G, Judica A, Virgilio C, Peta V, Abenavoli L. Role of endoscopy in management of gastrointestinal complications of portal hypertension. *World J Gastrointest Endosc* 2015; 7(1): 1-12
77. Hartmann, R.M; Licks, F. ; Schemitt, E. G. ; Colares, J. R. ; Soares, M. C. ; Zabet, G. P. ; Fillmann, H. S. ; Marroni, N. P. . Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia/reperfusion in rats. *PROTOPLASMA*, v. 1, p. 1615-6102, 2017.
78. Wang, K; Zhao, Zhenguo; Ji, w. Bisphenol a induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 117 (2019) 109182 1-8
79. Bona, S; Rodrigues, G ; Moreira, AJ ; Di Naso, FC ; Dias, AS ; Da Silveira, TR; Marroni, CA ; Marroni, NP . Antifibrogenic effect of melatonin in rats with experimental liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *JGH Open*, v. 1, p. 1, 2018.
80. Aina Rodríguez-Vilarrupla, Jaume Bosch, Joan-Carles García-Pagán. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol*, 2007. Volume 46, Issue 2, Pages 193–197
81. Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, Picada JN, Marroni NP. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Apr;102(4):370-6