

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

**A GLUTAMINA PROTEGE A MUCOSA GÁSTRICA DOS DANOS NA
GASTROPATIA DA HIPERTENSÃO PORTAL**

Camila Aparecida Moraes Marques

Porto Alegre – RS, 2012.

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

**A GLUTAMINA PROTEGE A MUCOSA GÁSTRICA DOS DANOS
NA GASTROPATIA DA HIPERTENSÃO PORTAL**

Camila Aparecida Moraes Marques

Orientador(a): Profa. Dra. Norma Possa Marroni

Co-orientador(a): Profa. Dra. Anete Curte Ferraz

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia,
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
para obtenção do título de Doutor.*

Porto Alegre – RS, 2012.

“Pintou estrelas no muro, e teve o céu ao alcance das mãos.”

Helena Kolody

Ao Rafael, meu filho, minha maior obra.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Neurofisiologia e Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox da Universidade Federal do Paraná.

Teve Subvenção da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, Verena e Guilherme, pela incansável ajuda, dedicação e confiança que me dispensaram durante estes 4 anos de muitas viagens, experimentos até tarde da noite e ausência. Sem o suporte de vocês, jamais teria conseguido realizar este sonho tão desejado.

A minha querida orientadora, Dra. Norma Marroni, que por mais obstáculos que pudessem existir, por mais dificuldades que possam ter aparecido, sempre esteve ao meu lado, me apoiando em momentos difíceis, criticando nos momentos necessários, mas acima de tudo sempre confiando no sucesso deste projeto. Obrigada, por acreditar que mesmo longe eu poderia continuar no seu grupo de pesquisa. Ao Dr. Claudio Marroni, pelo apoio que sempre dispensou a este trabalho.

A minha irmã, Patrícia, e cunhado, Juliano, obrigada por todo o apoio durante os meus períodos de ausência.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Anete Curte Ferraz, que me recebeu na UFPR, abrindo portas importantes para que este projeto se realizasse, e se aventurou em uma área de conhecimento nova. E à querida amiga, Ana Márcia Delattre, sempre ao meu lado nos experimentos com manipulação de animais, me auxiliando nas técnicas de neuro.

Ao Dr. Henrique Fillmann, pelo suporte e apoio, importantes na reta final deste trabalho. Presente em todas as etapas deste projeto e sempre acreditando na sua concretização. E à Prof. Dra. Maria Isabel, sempre otimista, solícita e acreditando no melhor.

Aos meus companheiros de jornada, Éder Marcolin, Francielle Licks, Juliana Tieppo e Rafael Vercelino. Obrigada pelo apoio e amizade.

A minha tia, Vera Lúcia, que me deu pousada durante todo o Doutorado. E um agradecimento muito especial ao meu primo, Juliano, que foi meu grande companheiro em Porto Alegre durante todo esse período.

A todo o grupo do Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox, da UFPR: Prof. Dr. Silvio Zanatta, Profa. Dra. Lia e Profa. Dra. Adriana Mercadante. E em especial, Luiz Eduardo Rizzo e Beatriz Borges, obrigada por me ensinarem tudo, a caminhar em uma área que não conhecia.

Aos meus colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia, HCPA: Silvia Bona, Felipe Forgiarini e Graziella Rodrigues e as colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo da ULBRA: Josieli Collares, Elizangela Schmitt, Renata Hartmann.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da UFRGS, em especial à Profa. Dra. Ilma Brum e à Alice por toda a atenção dispensada.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Anima do HCPA, Fabíola, Eduardo e Martha que, a distância, conseguiam auxiliar dando o suporte necessário para que os experimentos ocorressem.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
APRESENTAÇÃO	XV
RESUMO EXPERIMENTO I.....	XVI
ABSTRACT I.....	XVII
RESUMO EXPERIMENTO II	XVIII
ABSTRACT II	XIX
INTRODUÇÃO	02
1 REFERENCIAL TEÓRICO	05
1.1 Sistema venoso portal.....	05
1.2 Hipertensão portal.....	06
1.2.1 Fisiopatologia da HP	08
1.2.2 Gastropatia da hipertensão portal.....	11
1.3 Óxido nítrico: o modulador da HP	13
1.4 Vias de sinalização intracelular na HP.....	14
1.4.1 Fator de crescimento vascular endotelial – VEGF	14
1.4.2 Via de sinalização VEGF – Proteína quinase Akt.....	16
1.4.3 Óxido nítrico sintase endotelial – eNOS	17
1.5 Estresse oxidativo	19
1.5.1 Estresse nitrosativo	21
1.5.2 Antioxidantes.....	22
1.5.2.1 Antioxidantes enzimáticos.....	23
1.5.2.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	24
1.6 Glutamina	26
2 OBJETIVOS DO ESTUDO.....	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos.....	30

2.2.1 Experimento I	30
2.2.2 Experimento II.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Experimento I	33
3.1.1 Delineamento da pesquisa	33
3.1.2 Delineamento experimental.....	33
3.1.2.1 Animais.....	33
3.1.2.2 Grupos experimentais	34
3.1.3 Procedimentos experimentais	34
3.1.3.1 Ligadura parcial da veia porta – LPVP	34
3.1.3.2 Administração de veículo e da glutamina.....	36
3.1.3.3 Aferição da pressão venosa portal; morte dos animais e obtenção das amostras de tecido e sangue.....	36
3.1.3.4 Preparação do homogeneizado	37
3.1.3.5 Dosagem de proteína	37
3.1.3.6 Determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico	37
3.1.3.7 Quimioluminescência	38
3.1.3.8 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	39
3.1.3.9 Atividade da enzima catalase (CAT).....	39
3.1.3.10 Atividade da enzima glutationala peroxidase (GPx).....	39
3.1.3.11 Avaliação dos metabólitos do óxido nítrico	40
3.1.3.12 Histologia	40
3.1.3.13 Análise estatística	41
3.2 Experimento II.....	41
3.2.1 Delineamento de pesquisa	41
3.2.2 Delineamento experimental.....	41
3.2.2.1 Animais.....	41
3.2.2.2 Grupos experimentais	42
3.2.3 Procedimentos experimentais	42
3.2.3.1 Ligadura parcial da veia porta	42
3.2.3.2 Administração de veículo e da glutamina.....	43
3.2.3.3 Aferição da pressão venosa portal; morte dos animais e obtenção das amostras de tecido e sangue.....	43

3.2.3.4	Preparação do homogeneizado	44
3.2.3.5	Preparação do extrato celular para as análises por Western blot.....	44
3.2.3.6	Dosagem de Proteína	45
3.2.3.7	Determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico	45
3.2.3.8	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	46
3.2.3.9	Glutathiona total	46
3.2.3.10	Avaliação dos metabólitos do óxido nítrico	47
3.2.3.11	Western blot.....	47
3.2.3.12	Imunohistoquímica	48
3.2.3.13	Análise estatística	48
4	RESULTADOS.....	50
4.1	Artigo Experimento I.....	50
4.2	Artigo Experimento II	60
5	DISCUSSÃO GERAL	96
6	CONCLUSÕES.....	108
6.1	Experimento I	108
6.2	Experimento II.....	109
6.4	Conclusão Geral	110
7	PERSPECTIVAS.....	112
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração do sistema venoso porta realizada por Vesalius	05
Figura 2	Sistema venoso porta e os vasos que formam os colaterais portosistêmicos na HP	07
Figura 3	Fisiopatologia da HP	10
Figura 4	Varizes gástricas	11
Figura 5	Lesões leves e severas na mucosa gástrica	12
Figura 6	Síntese de NO	13
Figura 7	Esquema ilustrativo da ação da eNOS na síntese deNO	18
Figura 8	Esquema da produção das espécies ativas de oxigênio	20
Figura 9	Fórmula química da glutamina	27
Figura 10	Modelo de ligadura parcial da veia porta – LPVP	35

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Micro
μL	Microlitro
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
AOX	Antioxidante
AKT	Família de proteínas quinases
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
Ca^{+2}	Íon cálcio
CAT	Catalase
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
Cu^{2+}	Íon cobre
CuSO_4	Sulfato de cobre
CuZnSOD	Sod cobre-zinco
DC	Débito cardíaco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
e-	Elétron
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EAO	Espécies ativas de oxigênio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EO	Estresse oxidativo
FA	Fosfatase alcalina
FAD	Flavina adenina dinucleótido
Fe^{2+}	Íon ferroso

FeSOD	SOD ferro
G	Grama
GAPDH	Gliceraldeído-3 fosfato dehidrogenase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GHP	Gastropatia da hipertensão portal
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Glutatina oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HP	Hipertensão portal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
LPO	Lipoperoxidação
LPS	Lipopolissacarídeo
LPVP	Ligadura parcial da veia porta
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
Min	Minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
MnSOD	SOD manganês
mRNA	RNA mensageiro
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
NADPH	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzido
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetro

nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
Nox	Metabólitos do óxido nítrico
NTT	Nitrotirosina
NPY	Neuropeptídeo Y
O ₂	Oxigênio
O ₂ • ⁻	Radical ânion superóxido
OH•	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pH	Potencial de hidrogênio
PM	Peso molecular
PBS	Buffer fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PMSF	Inibidor de protease
QL	Quimiluminescência
RTK	Receptor tirosina quinase
RL	Radical livre
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	Ácido ter-butílico
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
U.A.	Unidades arbitrárias
U.V.	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR2	Receptor do VEGF
VPF	Fator de permeabilidade vascular

APRESENTAÇÃO

Esta tese compõe-se de dois experimentos que utilizam o modelo experimental de hipertensão portal, desenvolvidos a partir da ligadura parcial da veia porta. Nesses experimentos, avaliaram-se o papel do aminoácido glutamina sobre a pressão portal, o estresse oxidativo e sua influência no óxido nítrico. Neste modelo experimental, que mimetiza uma das complicações da cirrose que é a hipertensão porta, avaliamos a gastropatia da hipertensão portal. Será apresentada em experimento I: *“Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy”*, e em experimento II: *“Antioxidant properties of glutamine and its role in vegf-akt pathways in portal hypertension gastropathy”*.

Resumo I

Hipertensão portal (HP) é uma síndrome clínica caracterizada por aumento do fluxo de sangue e/ou da resistência vascular no sistema porta. Uma consequência direta da HP é o surgimento de lesões na mucosa e submucosa gástrica, denominada gastropatia portal hipertensiva. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da glutamina sobre o estresse oxidativo em um modelo experimental de hipertensão portal, induzida por ligadura parcial da veia portal (LPVP). Foram quantificadas a pressão portal, transaminases e fosfatase alcalina. O dano no tecido gástrico foi avaliado por análise histológica. O estresse oxidativo foi medido pela quantificação da concentração citosólica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e hidroperóxidos por quimiluminescência (QL) e os metabólitos do óxido nítrico (NO), por nitritos e nitratos. Além disso, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) foram analisadas. Todos os dados são apresentados como a média \pm erro padrão (SE). As transaminases e a fosfatase alcalina não foram significativamente alteradas no grupo LPVP, indicando ausência de lesão hepática. A análise histológica das seções da mucosa gástrica mostraram uma perda de arquitetura normal, com edema e vasodilatação. TBARS, QL, e produção de NO estavam significativamente aumentados em animais LPVP. A redução da atividade da SOD foi observada. Diante disso, sugere-se que a administração de glutamina atenua alterações histológicas e o estresse oxidativo, a atividade das enzimas mostrou-se normalizada e reduziu a superprodução de NO. Nossos resultados confirmam que a utilização de moléculas com capacidade antioxidante pode fornecer proteção do tecido gástrico na hipertensão portal. O tratamento com glutamina pode ser útil para reduzir o dano oxidativo induzido pela gastropatia portal hipertensiva.

Abstract I

Portal hypertension (PHI) is a clinical syndrome characterized by increase of the blood flow and/or of the vascular resistance in the portal system. A direct consequence of PHI can be the appearance of different lesions on the gastric mucosa and submucosa, cumulatively termed portal hypertensive gastropathy (PHG). To investigate the effects of glutamine on oxidative stress in an experimental model of PHG induced by partial portal vein ligation (PPVL). Portal pressure, transaminase and alkaline phosphatase activity were quantified. Gastric tissue damage was assessed by histological analysis. Oxidative stress was measured by quantification of cytosolic concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), hydroperoxide-initiated chemiluminescence (QL), and nitric oxide (NO) production. Moreover, activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) were analyzed. Transaminase and alkaline phosphatase activities were not significantly modified by PPVL, indicating absence of liver injury. Histological analysis of gastric sections showed a lost of normal architecture, with edema and vasodilatation. TBARS, QL, and NO production were significantly increased in PPVL animals. A reduction of SOD activity was found. Glutamine administration markedly alleviated histological abnormalities and oxidative stress, normalized SOD activity, and blocked NO overproduction. Our results confirm that the use of molecules with antioxidant capacity can provide protection of the gastric tissue in portal hypertension. Glutamine treatment can be useful to reduce the oxidative damage induced by PHI on gastric tissue.

Resumo II

Este estudo buscou investigar os efeitos da glutamina sobre o estresse oxidativo/nitrosativo e a via de sinalização VEGF-AKT-eNOS em um modelo experimental de hipertensão portal induzida pela ligadura parcial da veia porta (LPVP). Foi avaliada a expressão das proteínas nitrotirosina VEGF, PI3K, AKT-eNOS por Western blot e imunohistoquímica. O estresse oxidativo foi quantificado através da concentração citosólica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como os níveis de glutathione total (GSH), atividade da superóxido dismutase (SOD) e metabólitos do óxido nítrico (NO). Todos os dados são apresentados como a média \pm erro padrão (SE). A produção de TBARS e NO foi significativamente maior nos animais LPVP. Um aumento da atividade da SOD e GSH foi detectada no grupo LPVP + G. Na análise imunohistoquímica de nitrotirosina, Akt e eNOS, o grupo LPVP exibiu aumentos significativos, enquanto que uma redução foi observada no grupo LPVP + G, não houve diferença nos níveis de VEGF entre os grupos. Por Western blot, foi detectado aumento da expressão de PI3K, p-Akt e eNOS no grupo LPVP comparado com o grupo LPVP + G, o mesmo não foi observado para a expressão de VEGF. Administração de glutamina atenua o estresse oxidativo/nitrosativo, normalizando a atividade da SOD, aumentando os níveis de glutathione total (GSH) e, inibindo a superprodução de NO, bem como a formação de peroxinitrito. Diante disso, estes resultados sugerem que a utilização de moléculas com capacidade antioxidante poderia oferecer uma nova modalidade terapêutica para a proteção da mucosa gástrica na hipertensão portal. O tratamento com glutamina pode ser útil para reduzir os danos oxidativo/nitrosativo, mas não reduz a angiogênese, não alterando os níveis de VEGF no tecido gástrico, demonstrando um papel benéfico através da via PI3K-Akt-eNOS.

Abstract II

This study was designed to investigate the effects of glutamine on oxidative/nitrosative stress and the VEGF-AKT-eNOS signaling pathway in an experimental model of portal hypertension induced by partial portal vein ligation (PPVL). Portal hypertension was induced by partial portal vein ligation. We evaluated the expression and the immunoreactivity of proteins involved in the VEGF-AKT-eNOS pathway by Western blot and immunohistochemical analyses. Oxidative stress was measured by quantification of the cytosolic concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as well as the levels of total glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) activity, nitric oxide (NO) production and nitrotyrosine immunoreactivity. All data are presented as the mean and standard error (SE). The production of TBARS and NO was significantly increased in PPVL animals. An increase of SOD activity was detected in PPVL+G group. In the immunohistochemical analyses of nitrotyrosine, Akt and eNOS, the PPVL group exhibited significant increases, whereas decreases were observed in the PPVL + G group, but no difference in VEGF was detected between these groups. Western blot analysis detected increased expression of IP3K, p-Akt and eNOS in the PPVL group compared with the PPVL +G group, which was not observed for the expression of VEGF when comparing these groups. Glutamine administration markedly alleviated oxidative/nitrosative stress, normalized SOD activity, increased levels of total glutathione (GSH) and, blocked NO overproduction as well as the formation of peroxynitrite. In conclusion, our results suggested that the use of molecules with an antioxidant capacity could provide a new therapeutic modality for protection of gastric tissue in portal hypertension. Glutamine treatment can be useful to reduce oxidative/nitrosative damage but does not reduce angiogenesis by stimulating the overproduction of VEGF induced by PH in gastric tissue, demonstrating a beneficial role for the IPK3-Akt-eNOS pathway.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O fígado é o mais importante órgão metabólico do corpo e está envolvido na regulação do metabolismo, na síntese de proteínas e de outras moléculas, no armazenamento de ferro e vitaminas, na degradação de hormônios, na inativação e excreção de drogas e toxinas. [1].

A execução dessa atividade metabólica é feita nos hepatócitos, que recebem sangue do sistema porta, proveniente da circulação esplâncnica, pela veia porta, e da artéria hepática. O sistema porta está diretamente relacionado com o leito vascular sinusoidal intra-hepático, que sofre pressões externas pela fibrose que engloba os nódulos regenerativos da cirrose, determinando dificuldades no fluxo sanguíneo sinusoidal, que se transmite retrogradamente à veia porta e ao sistema venoso esplâncnico, determinando hipertensão portal [2].

A hipertensão portal é uma síndrome clínica que se caracteriza pelo aumento do fluxo e da pressão venosa esplâncnica, com estase sanguínea e formação de circulação colateral, que estabelece anastomoses com a circulação sistêmica, os “shunts” porto-sistêmicos, e desvia o fluxo para o sistema da veia cava. Nesse processo de formação de “shunts”, ocorrem as formações de varizes de esôfago e do estômago. Há uma circulação hiperdinâmica esplâncnica que pode repercutir em inúmeros locais, um deles no leito vascular gástrico, com aumento do fluxo e dilatação dos vasos submucosos, caracterizando a gastropatia da hipertensão portal. O termo hipertensão portal foi utilizado pela primeira vez por Gilbert e Villaret em 1906 [2].

A causa mais comum de hipertensão portal é a cirrose, independentemente da etiologia, sendo mais frequentes as pelos vírus das hepatites B e C, e pelo álcool. Em algumas regiões do Brasil, é frequente a hipertensão portal ser ocasionada pela esquistossomose. A oclusão venosa portal extra-hepática, frequentemente por trombose, determina hipertensão portal. Na hipertensão portal, em que ocorre dilatação venosa e aumento de fluxo, há um desequilíbrio endotelial, no qual diversos fatores parecem estar implicados modificando o tônus vascular, como o fator de crescimento vascular

endotelial (VEGF), a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico síntase induzida (iNOS) e liberando o óxido nítrico (NO) como mediador central dessa anormalidade hemodinâmica. [3, 4].

O aumento do fluxo sanguíneo venoso portal, secundário à vasodilatação esplâncnica, pode ser tratado farmacologicamente com vasoconstritores, do tipo vasopressina, somatostatina e análogos, que tem efeito seletivo bloqueador β -adrenérgico. Essa terapêutica é utilizada nas situações agudas e por pouco tempo. Há necessidade de maiores investigações para avaliação de substâncias que possam ser utilizadas profilaticamente ou em terapia de longo prazo. A glutamina, aminoácido envolvido em inúmeros processos metabólicos celulares, poderia exercer efeito benéfico no tratamento de alterações vasculares causadas pela HP e GHP na mucosa gástrica. [5]

Este trabalho pretende avaliar o estresse oxidativo, o envolvimento do óxido nítrico (NO) e a angiogênese em mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo experimental de ligadura parcial da veia porta, tratados com glutamina, na tentativa de identificar os mecanismos envolvidos.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Sistema venoso portal

O sistema venoso porta foi descrito pela primeira vez em 1543, em uma ilustração de Vesalius¹ [6, 7]. É formado pelas veias que compõem o trato digestivo intra-abdominal, do baço, do pâncreas e da vesícula biliar. A veia porta é formada pela junção das veias esplênica e mesentérica superior, penetrando o fígado pelo hilo hepático, ramificando para os lobos hepáticos direito e esquerdo (**Figura 1**).

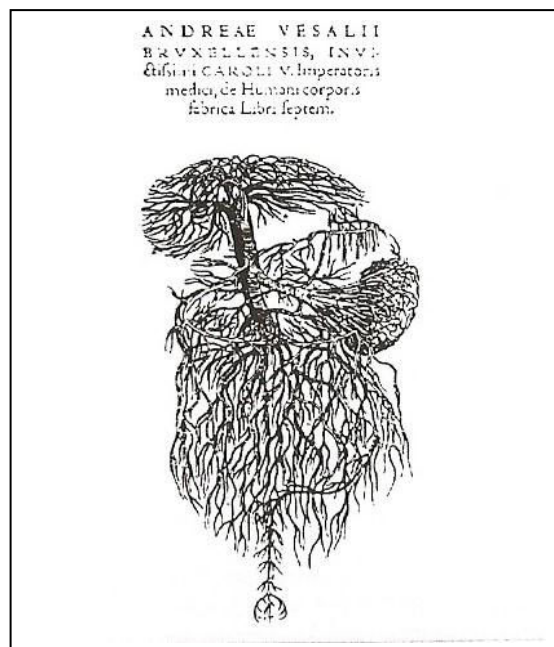


Figura 1. Ilustração do sistema venoso porta realizada por Vesalius [6].

¹ **Andreas Vesalius** (Bruxelas, 31 de Dezembro de 1514 — Zákynthos, 15 de outubro de 1564) foi um médico belga, considerado o “pai da anatomia moderna”. Foi o autor da publicação *De Humani Corporis Fabrica*, um atlas de anatomia publicado em 1543.

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.). Desse total, cerca de 25% são representados pelo suprimento arterial e 75% pela veia porta. Esse elevado volume sanguíneo é necessário para que o fígado realize todas as suas funções. O fluxo venoso portal possui duas características hemodinâmicas importantes: alto fluxo sanguíneo com baixa resistência vascular e baixa pressão. Em indivíduos adultos, a pressão portal fica em torno de 6mmHg [2].

O sistema venoso portal é destituído de válvulas e, portanto, a direção do fluxo sanguíneo é determinada pelo gradiente de pressão, definido pela diferença de pressão entre a veia porta e a veia cava inferior, de 5 a 10mmHg. Anomalias do sistema venoso porta são relativamente raras. Malformações na veia porta, como válvulas congênitas, duplicação, membranas, hipoplasia ou estenose já foram relatadas. A atresia congênita da veia porta pode ocorrer associada a outras malformações vasculares [7].

1.2 Hipertensão portal

A hipertensão portal (HP) é uma síndrome clínica, usualmente secundária a obstrução intra ou extra hepática do fluxo portal. É considerada a principal complicação da doença hepática, sendo responsável pelo desenvolvimento das demais hepatopatias, tais como: gastropatia hipertensiva portal, ascite, peritonite bacteriana espontânea, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, hipertensão portopulmonar, síndrome hipercinética e encefalopatia hepática [2].

A HP caracteriza-se por uma elevação acima de 5mmHg de pressão do sistema venoso portal. Quando a pressão atinge de 8 a 10 mmHg, surgem no esôfago e estômago varizes gastroesofágicas, que se desenvolvem a partir de uma rede de circulação colateral através dos vasos que formam a circulação esplâncica (**Figura 2**). O sangramento das varizes esofágicas pode ocorrer quando o gradiente de pressão portal atingir valores acima de 12mmHg [8-10].

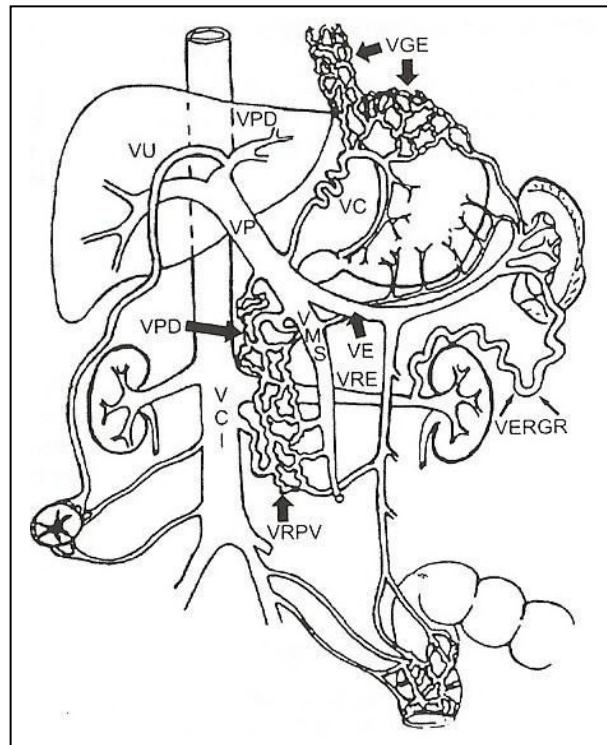


Figura 2. Sistema venoso porta e os vasos que formam os colaterais portossistêmicos na HP: VP – veia porta; VE – veia esplênica; VMS – veia mesentérica superior; VU – veia umbilical; VCI – veia cava inferior; VGE – varizes gastroesofágicas; VC – veia coronária; VRE – veia renal esquerda; VPD – veias pancreatoduodenais; VERGR – veias esplenorrenais e gastrorrenais; VRPV – veias retroperitoniais e paravertebrais.

A HP quase sempre resulta da obstrução sanguínea no sistema porta. Anatomicamente, o local da obstrução pode ser pré-hepático, intra-hepático ou pós-hepático. Raramente, a HP será secundária a um aumento do fluxo sanguíneo portal [11].

A hipertensão portal por obstrução pré-hepática decorre da trombose da veia porta e/ou esplênica secundária à sepsé, pyleflebite, uso de contraceptivos orais, invasão tumoral. A transformação cavernomatosa da veia porta é devida à trombose desta, secundária a processos infecciosos no sistema porta. Compressões extrínsecas, como em doenças pancreáticas, levam à obstrução segmentar da veia esplênica.

A hipertensão portal por obstrução intra-hepática: decorre da cirrose que obstrue o fluxo sanguíneo nos espaços porta, sinusóides e veias hepáticas. A fibrose portal e os nódulos de regeneração comprometem os espaços portais e as veias hepáticas, respectivamente. As alterações no fígado aumentam a resistência vascular. Além disso, contribuem também para

as alterações da microcirculação com a capilarização dos sinusóides e anastomose vascular intra-hepática entre ramos das veias porta e hepática.

A hipertensão portal pós-hepática decorre, na maioria das vezes, pela oclusão das veias supra-hepáticas por trombose, invasão tumoral ou membranas congênitas. A causa mais comum de trombose nas veias hepáticas é a endoflebite, mas pode ser associada a distúrbios da coagulação sanguínea ou ser idiopática. Alguns casos ocorrem em mulheres jovens sem causa conhecida e têm sido atribuídos ao uso de contraceptivos orais, às vezes associados ao uso de cigarros. Clinicamente, hepatomegalia, dor abdominal e ascite predominam e o exame histopatológico revela distensão dos sinusóides, congestão centrolobular, necrose e hemorragia. A insuficiência cardíaca grave pode causar HP, assim como a pericardite ou fibrose endomiocárdica.

A hipertensão portal por aumento do fluxo sanguíneo decorre de fístulas arteriovenosas envolvendo veias do sistema porta, intra ou extra-esplênicas, e podem, raramente, elevar a pressão portal.

As manifestações clínicas dos pacientes com HP são relacionadas à doença primária e/ou a uma das quatro maiores consequências clínicas da HP: (1) circulação colateral, (2) esplenomegalia congestiva, (3) encefalopatia hepática e (4) ascite. Muitos pacientes com hipertensão portal são assintomáticos, enquanto outros apresentam uma clínica bastante exuberante [11].

1.2.1 Fisiopatologia da HP

A inter-relação entre fluxo sanguíneo e resistência vascular portal determina a pressão portal. Assim, a pressão no sistema pode elevar-se devido ao aumento na resistência ou ao real aumento do fluxo sanguíneo portal. Em geral, o primeiro mecanismo é o que predomina, devido à capacidade do sistema em adaptar-se às variações pressóricas [12].

O endotélio vascular libera agentes vasodilatadores – NO e prostacilinas e vasoconstritores – endotelina, angiotensina e tromboxanos. A função do tônus vascular é

mantida mediante equilíbrio entre esses agentes. O aumento da resistência periférica é mantido pela elevação de vasoconstritores, pela redução de vasodilatadores ou associação de ambos. O sangue exerce uma força de rolamento nas células endoteliais, sendo o principal agonista na liberação de NO [13].

A pressão portal é o resultado da relação entre o volume do fluxo de sangue que entra no sistema porta e da resistência ao fluxo sanguíneo portal. A expressão matemática para essa relação é dada pela Lei de Ohm's: $P=Q \times R$, onde P representa alteração da pressão ao longo do vaso, Q, o fluxo de sangue e R, a resistência ao fluxo [14]. O aumento da resistência ao fluxo sanguíneo portal representa um estímulo para o aumento do fluxo sanguíneo esplâncnico, que por sua vez, mantém e agrava a HP [15, 16].

Um complexo ciclo de eventos é responsável pelo desenvolvimento e pela manutenção da HP. O aumento da resistência ao fluxo sanguíneo porta parece ser o evento primário, mas há também uma variedade de alterações hemodinâmicas que contribuem para o aumento da pressão porta [17], desenvolvimento de circulação colateral entre o sistema porta e a circulação sistêmica. O aumento no fluxo sanguíneo da região esplâncnica é a principal consequência da diminuição da resistência vascular, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica, caracterizada como um aumento do débito cardíaco e uma diminuição na resistência vascular sistêmica [18, 19]. Além disso, a formação de colaterais portossistêmicos tem um papel patogênico fundamental, tanto direto, por meio da diminuição da resistência periférica, quanto indireto, permitindo que substâncias vasoativas do trato intestinal alcancem a circulação sistêmica ignorando sua passagem pelo fígado (**Figura 3**) [16].

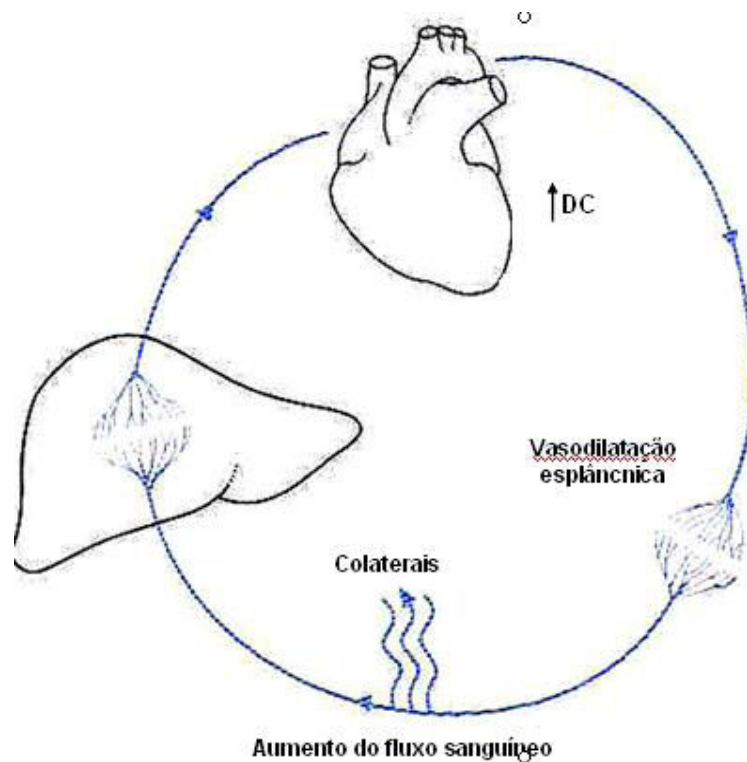


Figura 3. Fisiopatologia da HP [18]

Inúmeras veias se dilatam, incluindo as do plexo hemorroidário, da parede abdominal e da junção esofagogástrica. As veias umbilicais comunicam-se e dilatam as veias superficiais da parede abdominal, e a presença da circulação colateral abdominal é um sinal clínico importante de hipertensão portal que se caracteriza por veias dilatadas e tortuosas que se irradiam do umbigo para o abdômen superior e tórax inferior (**Figura 4a**). A presença de várias veias dilatadas e tortuosas que se dispõem radiadas do umbigo é denominada “cabeça de medusa”(Figura 4b) [11, 20]. A circulação colateral da veia gástrica esquerda para as veias ázigos é responsável pelo aparecimento de varizes esofagogástricas e aumento de circulação na mucosa gástrica, que caracterizam a complicação da hipertensão portal chamada gastropatia da hipertensão portal (GHP) [11].

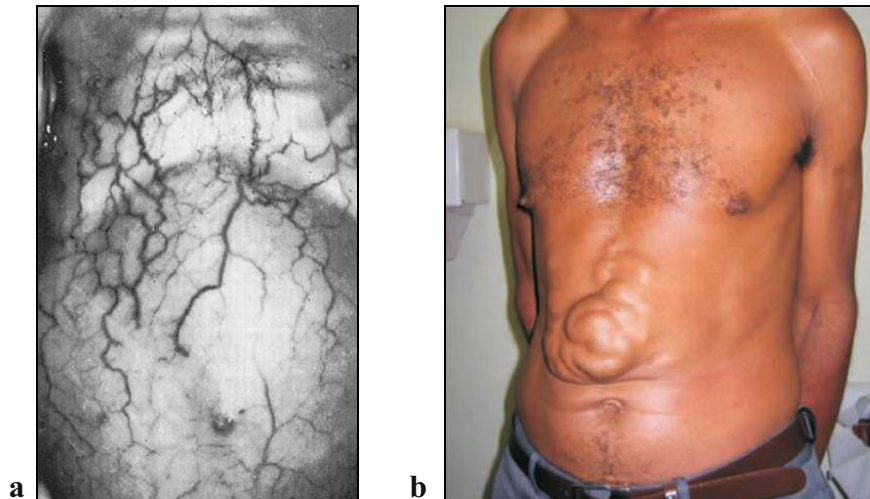


Figura 4. Varizes gástricas: **a)** vasos dilatados e irradiados pelo abdômen e tórax; **b)** vasos dilatados, colaterias portossistêmicos, caracterizando “cabeça de medusa”. [20]

1.2.2 Gastropatia da hipertensão portal

A gastropatia da hipertensão portal (GHP) é a denominação usada para definir alterações da mucosa gástrica evidenciadas na endoscopia e dependentes da hipertensão porta. O aumento da pressão no território porta determina o desenvolvimetro da circulação colateral, dilatação dos vasos e aumento da pressão endovascular. A consequência mais evidente é o aparecimento de varizes gastroesofágicas. Na gastropatia da hipertensão portal, existe um aumento de circulação com a dilatação dos vasos da submucosa do estômago [39].

As lesões na mucosa gástrica podem ser caracterizadas como leves ou severas. [40]. O padrão de mosaico, que caracteriza lesões leves, é definido por áreas rosadas e avermelhadas, semelhante a couro de cobra (**Figura 5a**) [41]. É o tipo de lesão mais comum e predomina nas áreas do corpo e fundo do estômago. A gastropatia severa se caracteriza por pontos vermelho escuros (“cherry red spots”), essas lesões podem evoluir para áreas hemorrágicas e predominam por todas as áreas do tecido, corpo, fundo e antro (**Figura 5b**) [42, 43].

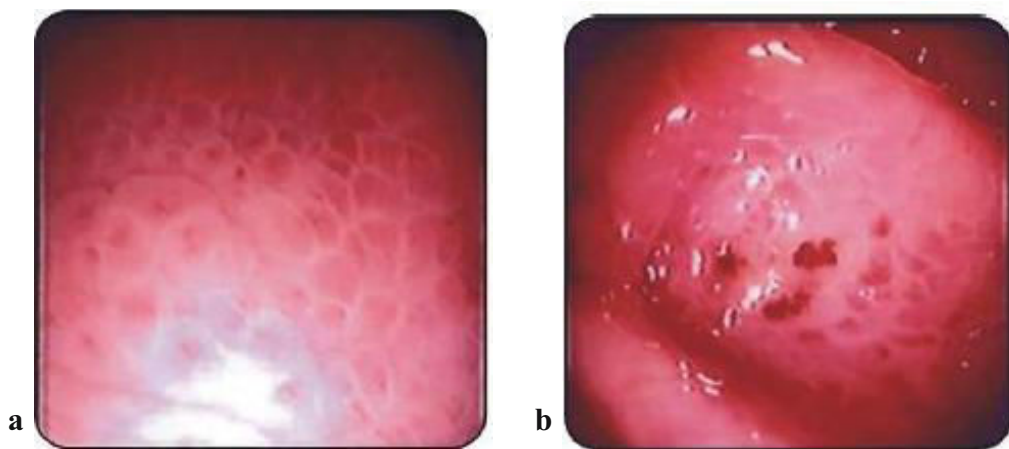


Figura 5. Lesões leves e severas na mucosa gástrica. a) lesão leve com aparência de couro de cobra; **b)** lesão severa com pontos hemorrágicos em pacientes com cirrose hepática submetidos a uma endoscopia para rastreamento de varizes. [41]

A prevalência de GHP, em pacientes com hipertensão portal, tem sido entre 20% a 80% [44]. Essa ampla variação na prevalência, provavelmente, deve-se às diferenças na população do estudo, pois uma maior taxa de GHP é observada em pacientes com doença hepática grave [45], em torno de 50-60% dos com cirrose hepática [11]. A presença de GHP está associada com sinais indiretos de hipertensão portal, tais como, a presença de vasodilatação sistêmica e esplenomegalia [45, 46]. Alguns estudos indicam que a prevalência de GHP se dá apenas com o quadro de hipertensão portal estabelecido, independente de lesão hepática ou não [47].

Estudos demonstraram, por meio de fluxometria de doppler, a presença de estresse hemocinético na mucosa gástrica em indivíduos com GHP. Tal achado pode estar relacionado com a redução dos níveis de prostaglandinas e uma alteração na resposta microcirculatória ao NO, levando a uma superprodução desse agente vasodilatador. Diante desse quadro, as alterações observadas na mucosa gástrica resultam de uma aumento e distribuição do fluxo sanguíneo, bem como, da resistência vascular portal. Aceita-se que ocorra uma elevação dos níveis de vasodilatadores e menor sensibilidade a vasoconstritores, de origem endotelial [42, 48].

1.3 Óxido nítrico: modulador da hipertensão portal

Em 1980, Furchgott *et al.* verificaram, em porções da aorta, um efeito vasodilatador, através da acetilcolina, como sendo um dos responsáveis em manter a integridade do revestimento do vaso. Esses autores também constataram a presença de outro fator, de origem endotelial, além das prostaciclina. Em 1987, Palmer *et al.* verificaram a presença de óxido nítrico (NO), no endotélio, conferindo propriedades biológicas importantes e classificando-o como um “fator de relaxamento endotelial” [21, 22].

O óxido nítrico (NO) é um gás difusível, de meia vida curta, produzido por uma família de enzimas chamada de óxido nítrico sintetases (NOS), tem sido reconhecido como um importante vasodilatador que modula a dilatação observada em excesso na hipertensão portal. O seu envolvimento no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica foi confirmado por diversos estudos realizados ao longo dos anos [13, 23-25]. O NO é produzido a partir de L-arginina pela família de enzimas NOS, formando o radical livre NO e L-citrulina, como subprodutos da reação (Figura 6). O mecanismo que causa a vasodilatação é por meio da estimulação da guanilato ciclase solúvel (GCs), formando monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) no músculo liso vascular, gerando um relaxamento da parede do vaso [26, 27].

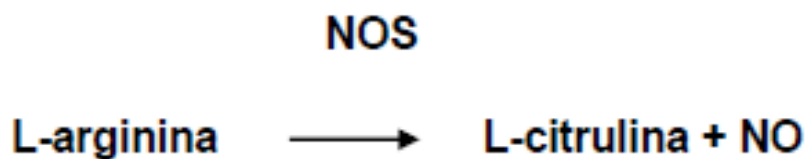


Figura 6. Síntese de NO

Óxido nítrico sintases (NOS) são hemoproteínas que produzem NO a partir L-arginina [28, 29]. Três isoformas são conhecidas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS)[30]. A principal fonte enzimática da superprodução de NO vascular é a isoforma eNOS. Recentes evidências sugerem que nNOS também apresenta “upregulation” nas artérias aorta e mesentérica de ratos submetidos ao modelo experimental de cirrose, sugerindo o seu envolvimento no desenvolvimento/manutenção da circulação hiperdinâmica esplâncnica [31]. Quanto à ação de cada uma das isoformas de NOS, sabe-se que a eNOS é encontrada no

endotélio vascular, favorecendo a redução da pressão sanguínea e auxiliando na inibição da agregação plaquetária; a nNOS regula a atividade neuronal e a iNOS é estimulada por citotoxinas e macrófagos. Desse modo, o NO está envolvido em processos de defesa do organismo e sua superprodução pode levar a sérios processos destrutivos teciduais [32].

O NO é uma molécula de efeito pleiotrópico, ou seja, possui efeito nocivo ou benéfico em diferentes tecidos, incluindo a regulação do tônus e o remodelamento vascular [33]. Em cultura de células musculares lisas, estimuladas por doadores de NO, observa-se um aumento do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)[34]. Inibidores da eNOS via VEGF reduzem a formação, migração e proliferação de células endoteliais. Outra via em que atua o VEGF é por meio da estimulação do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que estimula a eNOS dependente de Akt, aumentando os níveis de NO [35].

Diante dessa duplicidade de funções do NO, acredita-se que os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos estejam vinculados aos níveis de concentração e, quando atua em baixa concentração, comporta-se como mensageiro e fator de proteção celular (antioxidantes), interagindo com metais de transição e outros radicais livres. Quando em concentrações altas, atua como um radical livre, formando duas moléculas trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) ou peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), responsáveis por ações citotóxicas como inflamação e choque séptico. [36, 37]. Recentemente, o NO tem sido apresentado como um importante sinalizador para a manutenção da homeostasia, bem como, um agente citotóxico envolvido em inúmeras doenças [38].

1.4 Vias de sinalização intracelular na HP

1.4.1 Fator de crescimento vascular endotelial – VEGF

O aumento na formação dos vasos sanguíneos na região esplâncnica se dá mediante um processo angiogênico, que está envolvido na manutenção da circulação hiperdinâmica presente na hipertensão portal. Essa hipótese se baseia em estudos recentes que demonstram a presença de aumento na angiogênese esplâncnica e a neovascularização, responsável pela formação de colaterais portossistêmicos em modelos experimentais de HP. O estímulo para a proliferação desses novos vasos sanguíneos se dá por meio de uma complexa cascata de

eventos angiogênicos, sendo o principal modulador desse mecanismo o fator de crescimento vascular endotelial, VEGF, estimulando a proliferação e a migração de células endoteliais [2, 49-51].

A angiogênese se caracteriza pela formação de novas estruturas vasculares e tornou-se um dos fenômenos fisiopatológicos mais investigado nos últimos anos, devido ao papel fundamental que desempenha na patogênese de doenças e seu potencial como alvo terapêutico. Embora os estudos sobre angiogênese sejam relacionados ao câncer, também se sabe do seu envolvimento em quadros crônicos caracterizados por inflamação [52]. Estudos experimentais observaram o papel da angiogênese na patogênese da hipertensão portal e cirrose hepática e relataram um aumento da angiogênese no abdômen de ratos com hipertensão portal sem cirrose [53, 54]. Além disso, foi observada a redução do desenvolvimento da circulação hiperdinâmica esplâncnica e a formação de colaterais portossistêmicos em ratos hipertensos devido ao bloqueio da via de sinalização do fator de crescimento vascular endotelial [2]. Recentemente, surgiram evidências de um aumento da angiogênese na microcirculação mesentérica em modelo animal de hipertensão portal e cirrose, demonstrando um aumento da expressão de VEGF e de eNOS no leito mesentérico desses animais [55].

O VEGF exerce atividade mitogênica e angiogênica nas células endoteliais. Estimula permeabilidade vascular, com um efeito diversas vezes maior do que outras substâncias vasoativas [56]. A observação de que o crescimento de tumor está associado com aumento da permeabilidade microvascular demonstra a função original do VEGF, e, conseqüentemente, a sua primeira nomenclatura como fator de permeabilidade vascular (VPF) [57]. Por esse motivo, alguns estudos relacionados à expressão e à função do VEGF enfatizam a importância desse fator na angiogênese. O VEGF e seus receptores são expressos em regiões de crescimento do vaso sanguíneo durante a embriogênese [58, 59]. A redução dos níveis de VEGF ou de seus receptores leva à morte embrionária precoce, devido ao grave defeito na vasculogênese [60].

A existência de múltiplas isoformas de VEGF e receptores sugere um mecanismo complexo, porém explica como o VEGF é capaz de produzir uma variedade de funções

celulares na vascularização, além de modular o crescimento vascular, a morfogênese, a permeabilidade e quimiotaxia de células endoteliais. Essa multiplicidade de funções depende, em parte, do tipo celular, permitindo que o VEGF exerça funções específicas de acordo com cada tipo de tecido e papel importante no desenvolvimento de diversas doenças [61, 62].

A hipertensão portal está associada com o aumento da circulação colateral portossistêmica, levando ao desenvolvimento de varizes gástricas. Essas varizes podem se romper, gerando um quadro de hemorragia digestiva alta. Assim, a circulação colateral portossistêmica desempenha um papel fundamental nos mecanismos de várias outras complicações, podendo levar o indivíduo à morte. Recentemente, pensava-se que o desenvolvimento da circulação colateral devia-se ao relaxamento vascular em resposta ao aumento da pressão portal. No entanto, essa visão "tradicional" tem sido contestada devido a resultados que demonstram que a formação de colaterais portossistêmicos pode ser, em parte, devido à angiogênese estimulada pelo fator de crescimento vascular endotelial, VEGF [2]. Devido ao NO ser o principal modulador, envolvido na dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos, bem como, na migração, proliferação e sobrevivência das células endoteliais na HP, sugere-se que o VEGF desempenhe um papel crucial na angiogênese, superestimulando a produção de NO [63].

1.4.2 Via de sinalização VEGF – Proteína quinase Akt

A multifuncionalidade do VEGF, em nível endotelial, ocorre devido a sua capacidade de iniciar uma rede diversificada e integrada de vias de sinalização por meio de seu receptor principal, VEGFR2. A principal via mediante a qual VEGF promove a sobrevivência da célula é através do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) dependente de ativação de Akt [64, 65]. A proteína quinase Akt tem sua função mediada pela presença do VEGF, promovendo a sobrevivência das células endoteliais e mediando a produção de NO por meio da fosforilação direta de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) [66, 67]. A Akt exerce papel importante em diversos processos celulares que contribuem para a angiogênese, atuando como um importante modulador de crescimento dos vasos sanguíneos [68, 69]. Relacionado a isso, sabe-se do envolvimento da via VEGF-Akt na angiogênese, demonstrado em pele de cobaias, onde foi observado um aumento na permeabilidade vascular, contribuindo para a formação de

edema no tecido [70, 71]. O VEGF também ativa a via PI3K/AKT em outros tipos de células, como neurônios e em células musculares [72, 73].

A proteína quinase Akt exerce um papel fundamental na sinalização de todas as células eucarióticas. É uma proteína importante do grupo das quinases para a compreensão da fisiopatologia de doenças humanas. A Akt modula a fosforilação de diversas proteínas, levando a sua inibição ou ativação, contribuindo em vários processos celulares como sobrevivência, proliferação, crescimento, metabolismo e angiogênese. Estudos recentes têm observado detalhes do envolvimento na regulação molecular pela Akt e seu papel na clínica [74, 75].

A proteína Akt estimula diretamente a eNOS aumentando sua capacidade de gerar NO [35]. Existem várias formas para estimular a via da Akt, como fatores de crescimento, citocinas e forças mecânicas de tensão de cisalhamento no vaso, que ativam a liberação de NO via mecanismo fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)-dependente [35, 67]. A superprodução de NO vascular desempenha um papel central, tanto na vasodilatação sistêmica e esplâncnica, que é uma característica da hipertensão portal que faz com que seja reconhecida como a principal complicação da cirrose hepática. O aumento da expressão da eNOS e a atividade da enzima são eventos bem estabelecidos no modelo crônico de hipertensão portal [76, 77].

1.4.3 Óxido nítrico sintase endotelial – eNOS

A via de sinalização VEGF-Akt via PI3K regula uma das formas de liberação de eNOS. A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) catalisa a conversão de L-arginina para L-citrulina e óxido nítrico (NO), exercendo papel fundamental na regulação do tônus vascular, na agregação plaquetária, produção de células musculares lisas, apoptose de células endoteliais e angiogênese [78-80].

A óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) é uma NOS constitutiva e produz NO no endotélio vascular sob condições basais, mas a força de cisalhamento produzida pelo fluxo sanguíneo pode incrementar sua produção. Sua expressão é restrita a células endoteliais

vasculares, embora existam relatos da sua localização no hipocampo, sendo sua expressão em humanos significativamente suprimida pela hipóxia [81, 82].

O NO, sintetizado pela eNOS, atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a consequente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular. Quando o cGMP está alto, o cálcio intracelular diminui, relaxando as células e a vasodilatação se desenvolve, mantendo-se enquanto a difusão do NO para a musculatura lisa vascular estiver ocorrendo. Um aumento no fluxo de NO para o vaso provoca maior relaxamento na célula muscular lisa e vasodilatação (**Figura 7**). Se a formação de NO diminui, ocorre uma vasoconstrição moderada. O efeito vasodilatador do NO parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo sanguíneo e da força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares [83, 84].

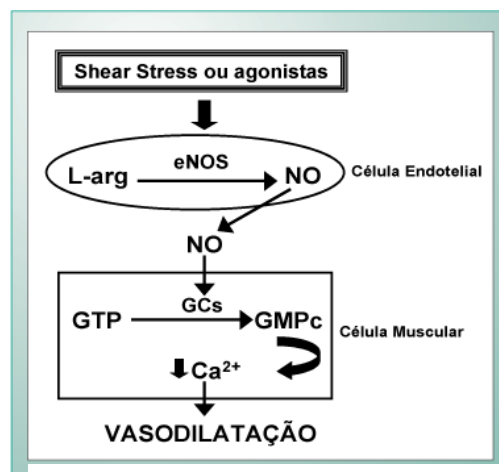


Figura 7. Esquema ilustrativo da ação da eNOS na síntese de NO

Estudos já demonstraram o envolvimento da eNOS no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica, característico na hipertensão portal, sendo considerado o primeiro evento hemodinâmico, que antecede o aumento hiperkinético dos vasos, induzindo a tensão de cisalhamento no vaso, ativando a eNOS, via Akt, contribuindo para aumentar ainda mais sua atividade.

1.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo (EO) é gerado por um desequilíbrio entre a produção de pro-oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante (AOX) a favor das oxidantes. Ele tem sido implicado na patogênese de doenças do fígado e suas complicações. Pode ocorrer em qualquer sistema biológico e é desencadeado pelo aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, ou de nitrogênio e outras tantas. Dentre as espécies reativas formadas, ocorre a formação radical livre, essas são bastante reativas levando a um desequilíbrio da arquitetura celular e à morte celular. Esses radicais podem ser formados durante o metabolismo normal da célula, gerado pela perda de elétrons de um não radical ou pelo ganho de um elétron por não radical; eles também podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada, em que cada um dos átomos fica com um elétron, em um processo conhecido como fissão homolítica e na redução monoelétrica do oxigênio molecular no processo oxidativo.[36].

Radical Livre é qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados, em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo. O oxigênio molecular (O_2), no seu estado fundamental, é paramagnético, e a sua estrutura eletrônica é triplete, ou seja, ele possui dois elétrons não emparelhados (tem dois spins paralelos), portanto é um birradical, essa restrição o torna menos reativo. É chamado de oxigênio triplete (3O_2). Para estabilizar-se necessita de 2 elétrons (e^-) antiparalelo para completar o orbital, o que restringe a reatividade dessa molécula, por apresentar Spins com mesmo sentido. Porém é um oxidante capaz de oxidar outros átomos ou moléculas, aceitando um par de elétrons. Na redução tetraelétrica do oxigênio no processo oxidativo, ocorre a formação de energia e liberação de gás carbônico sem formação de espécies intermediárias, porém, na redução monoelétrica no oxigênio, ocorre processo de transferência de elétrons, ou de absorção de energia, levando à formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) [36].

O oxigênio, além de ser um agente oxidante, é capaz de oxidar outros átomos ou moléculas aceitando um par de elétrons (**Figura 8**) [85]. Os intermediários da redução monoelétrica do oxigênio são ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2),

oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) e radical hidroxil (OH^\bullet). Todos são denominados espécies ativas de oxigênio (EAOs), por serem capazes de existir de forma independente [85].

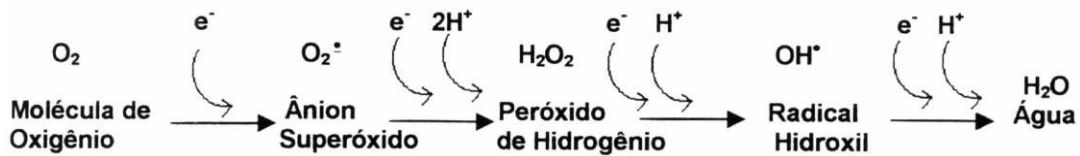


Figura 8. Esquema de produção das espécies ativas de oxigênio [85].

Os efeitos deletérios do oxigênio sobre os organismos aeróbios variam, consideravelmente, com a espécie do organismo, com a idade, com o estado fisiológico e com a dieta. Os diferentes tecidos de um mesmo animal também podem ser afetados de formas diferentes. Esses efeitos ocorrem devido à elevada produção de radicais livres ou de espécies ativas de oxigênio [86].

A excessiva formação endógena de radicais livres pode ser causada por (1) ativação aumentada de fagócitos; (2) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (3) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas; e (4) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes. Entretanto, torna-se difícil determinar se, na doença humana, os radicais livres são a causa ou potencializam o dano celular [87, 88].

As espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como $\text{O}_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$ e OH^\bullet e outros, podem ter origem endógena e exógena. As principais fontes endógenas de geração das espécies ativas de oxigênio são peroxissomos, NADPH oxidase, xantina oxidase, mitocôndria e citocromo P-450. Como vias exógenas, podem ser citadas radiação e solventes orgânicos [85].

O $\text{O}_2^{\bullet -}$ é convertido em H_2O_2 pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Essa enzima possui duas isoformas denominadas cobre-zinco-SOD e manganês-SOD, uma constitutiva e outra induzível, respectivamente [36].

Em presença de íons metálicos livres como Fe^{2+} e Cu^+ , o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é convertido em radical hidroxil HO^{\bullet} , um potente oxidante, essa reação é conhecida como de Fenton. A reação de Haber-Weiss ocorre quando o $\text{O}_2^{\bullet-}$ combina-se com H_2O_2 , também na presença de íons metálicos, como Fe^{2+} e Cu^+ , formando o radical hidroxil HO^{\bullet} . O radical hidroxil é bastante reativo, apresenta uma vida média curta e, assim que se forma, reage rapidamente com a molécula mais próxima, que pode ser com lipídios, proteínas ou bases de DNA. Isso acontece porque a taxa constante de reação do HO^{\bullet} é bastante alta quando comparada às outras espécies reativas[36]. O radical hidroxil é responsável pela toxicidade celular associada às espécies reativas de oxigênio [36].

Os radicais livres desencadeiam o processo de lipoperoxidação que leva ao dano celular. A lipoperoxidação consiste em reações em cadeia, quando 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 [36].

As alterações hemodinâmicas envolvidas na HP levam ao aumento das espécies ativas de oxigênio (EAO) na mucosa gástrica, que desencadeiam o estresse oxidativo (EO), o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica foi associado à hipertensão portal, inicialmente, por Moore, por meio do modelo experimental de ligadura parcial de veia porta em ratos [89, 90].

1.5.1 Estresse nitrosativo

O óxido nítrico (NO) é uma espécie radicalar diatômica encontrada endogenamente nos mamíferos, responsável por uma grande gama de ações biológicas importantes e amplamente estudadas [91]. Além de desempenhar um papel chave no controle da pressão sanguínea, por meio da regulação do relaxamento do músculo liso [92], o NO também regula a adesão plaquetária [93], a agregação de neutrófilos [94] e a citotoxicidade de macrófagos [95], além de estar envolvido na neurotransmissão [96].

O NO é sintetizado pela enzima intracelular NO sintase (NOS), mediante oxidação da L-arginina, que produz citrulina e NO. As três principais isoformas da NOS até agora identificadas são a NOS1 (também conhecida como nNOS, por ter sido inicialmente isolada de tecido neuronal), NOS2 (ou iNOS), que é induzível por citocinas inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo, e NOS3 (ou eNOS) predominante no endotélio. A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente e são por isso denominadas como NOS constitutivas (cNOS) [97].

A produção exagerada de espécies ativas de nitrogênio é chamada de estresse nitrosativo. Isso pode ocorrer quando a geração de espécies reativas de nitrogênio em um sistema excede a habilidade do sistema em neutralizá-las e eliminá-las [98].

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), formado nos sistemas biológicos, quando não neutralizado, pode reagir com NO formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio, um potente oxidante. A adição de $ONOO^-$ às células, aos tecidos e aos fluidos corporais leva à rápida protonação, podendo resultar depleção de grupos-SH e outros antioxidantes, oxidação e nitração de lipídeos, quebra de DNA, nitração e desaminação de bases de DNA (especialmente a guanina) promovendo ampliação do dano já iniciado pelos radicais livres de oxigênio. A nitração em resíduos de tirosina, a nitrotirosina (NTT), é amplamente usada como um biomarcador da geração de $ONOO^-$ *in vivo*. Nesse sentido, tem sido considerada um importante instrumento para estudo do estresse nitrosativo em doenças humanas, ainda que não seja um biomarcador altamente específico para $ONOO^-$ [36, 88, 99].

1.5.2 Antioxidantes

O organismo, a fim de proteger-se contra os danos oxidativos, desenvolveu inúmeras estratégias, como a prevenção da formação dos radicais livres através dos antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) capazes de neutralizar o estresse oxidativo. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células [85].

Os antioxidantes podem ser definidos, como “Qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”. O termo oxidável inclui macromoléculas (tais como, proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA). A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de espécies ativas de oxigênio em baixas concentrações e, para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas [100].

1.5.2.1 Antioxidantes enzimáticos

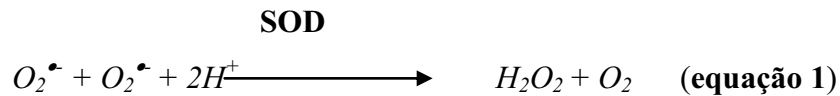
Os antioxidantes enzimáticos fazem parte do sistema de defesa primário e compreendem agentes que, cataliticamente, removem os radicais livres e outras espécies reativas. São as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como íons, ferro e cobre ou como transferinas e hepatoglobinas; proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, como proteínas de choque térmico; e substâncias de baixo peso molecular que combatem espécies ativas de oxigênio e espécies ativas de nitrogênio como glutathione, α -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros [36].

O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 , impedindo a formação do radical hidroxil, o mais lesivo dos radicais livres. Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da lipoperoxidação, e as terciárias, enzimas de reparo dos danos já instalados [101].

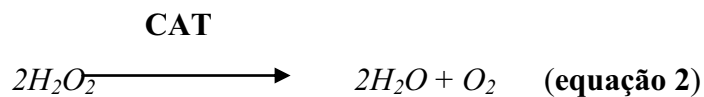
Quando a substância age neutralizando as espécies ativas de oxigênio na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de *scavenger*. Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de *quencher* [102].

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 , sendo que o primeiro é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (**equação 1**). Essa

enzima pode ser classificada em três grandes grupos, segundo o metal que se encontra presente no sítio ativo: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a SOD-manganês, presente na matriz mitocondrial e a FeSOD existente somente nos procariontes e plantas [103].



Os produtos finais da dismutação são o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando o radical hidroxila. 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 [85]. A ação da CAT sobre o peróxido é apresentada na **equação 2**.



Entre as peroxidases, que geralmente usam o grupo heme, sobressai-se a atividade da GP_x, que se localiza no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, através da oxidação da glutatona reduzida (GSH). Para reestabelecer a glutatona oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a glutatona redutase (GR) promova a regeneração da GSSH, consumindo NADPH[87].

1.5.2.2. Antioxidantes não enzimáticos

O sistema de defesa não-enzimático é formado pelos antioxidantes hidrossolúveis e antioxidantes lipossolúveis. Os antioxidantes hidrossolúveis são compostos que têm alta afinidade por água, podendo-se citar, entre eles, a glutatona (GSH), o ácido úrico e o ácido ascórbico (vitamina C). Os antioxidantes lipossolúveis são compostos que têm alta afinidade com lipídios e podendo-se citar, entre eles, os carotenóides, o α -tocoferol (vitamina E) e a bilirrubina.

A glutathiona é um tripeptídeo, γ -glutamilcisteinilglicina é um tiol de peso molecular baixo (PM= 307,3), sendo mais abundante nas células de mamíferos. A concentração intracelular é, aproximadamente, 0,5 mM, mas, às vezes, alcança níveis tão altos como 10 mM. A concentração intracelular de GSH pode manter-se em estado reduzido pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) que requer a presença de NADPH [101].

O GSH tem várias funções no metabolismo, no transporte, na catálise (atuando como cofator para a família de enzimas do tipo peroxidase). Está envolvido no metabolismo do ácido ascórbico, na comunicação intercelular, prevenindo a oxidação e as ligações cruzadas dos grupos-SH das proteínas, da cisteína e da coenzima A. Parece participar no transporte intracelular, quelando os íons Cu^{2+} e diminuindo a sua disponibilidade para gerar radicais livres. É um agente radioprotetor e cofator para várias enzimas em diferentes rotas metabólicas, incluindo as enzimas envolvidas na síntese dos leucotrienos. Intervém também em vias enzimáticas (GSH-S-transferases) e não enzimáticas de detoxificação de xenobióticos. É importante também na degradação de proteínas que contêm pontes S-S, como a insulina. A sua função mais importante é a proteção que exerce frente ao dano oxidativo, causado pelas espécies ativas de oxigênio, geradas durante o metabolismo normal das células. O GSH pode reagir por via não enzimática com essas espécies. *In vitro*, o GSH pode reagir com o radical HO^\bullet , o HOCl , o radical RO^\bullet e o radical RO_2^\bullet [36].

O ácido ascórbico apresenta muitas propriedades antioxidantes, entre elas, a capacidade de neutralizar o $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO_2^\bullet , HO^\bullet e de regenerar a vitamina E. Além disso, pode atuar como pró-oxidante quando se encontra em concentrações próxima a 1mM. Nessa concentração, o ácido ascórbico pode reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} , sendo esse último um potente indutor da reação de Fenton. A concentração e a localização intracelular do ácido ascórbico pode ser fator decisivo na atividade dessa vitamina como oxidante ou antioxidante [36]. O α -tocoferol (vitamina E) encontra-se em altas concentrações em muitos tecidos, em nível intracelular, está associado às membranas ricas em lipídios, como nas membranas mitocondriais e do retículo endoplasmático. Pode reagir tanto com lipoperóxidos como com radicais alcoxil, sendo um protetor efetivo da peroxidação lipídica de membranas biológicas. A vitamina E neutraliza o $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou o HO_2^\bullet e reage com o HO^\bullet [104].

Os β -carotenos têm sido considerados como antioxidantes porque apresentam a capacidade de neutralizar radicais. Protegem os lipídios da peroxidação porque neutralizam as espécies ativas de oxigênio, principalmente o $^1\text{O}_2$. *In vivo*, apresentam uma atividade antioxidante eficiente porque podem inibir a peroxidação lipídica induzida pelo sistema da xantina oxidase. *In vitro* podem atuar também como oxidantes, dependendo da pressão parcial de O_2 [105].

1.6 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 [106, 107]. Está presente em diferentes tecidos, em que esse 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 (**Figura 9**) [108, 109].

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 essa razão, esse aminoácido foi recentemente reclassificado como essencial [107].

A teoria dos RL propõe que as espécies ativas de oxigênio (EAOs) 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 esse 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 [110].

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 [111].

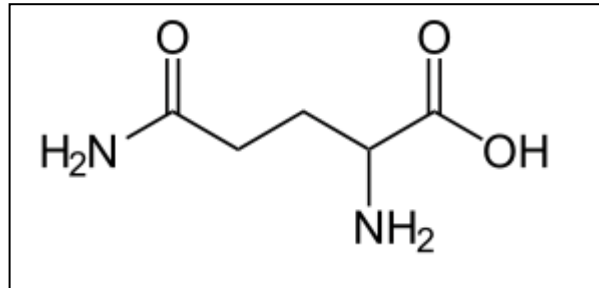


Figura 9. Fórmula química da glutamina

Em humanos, representa 20% do total de aminoácidos livres no plasma. Possui múltiplas funções do trato gastrointestinal, além de efeitos na redução da morbidade e mortalidade em modelos experimentais relacionados a danos nessa região. O TGI é um dos maiores sítios de utilização da glutamina, sendo mais da metade consumida no território esplâncnico. A glutamina ingerida pela dieta é menos importante que a circulante, em especial, em condições de doenças, pois ocorre uma redução na ingesta de alimentos [112].

Concentrações baixas de glutamina estão associadas ao estresse catabólico e à suscetibilidade a infecções. Não atua somente como fonte de energia para a célula, mas exerce um papel importante no equilíbrio oxidativo intracelular [113]. A glutamina é amplamente estudada no estresse oxidativo durante o exercício físico, quando ocorre uma redução importante dos seus níveis plasmáticos. Essa redução vem acompanhada de um aumento da atividade inflamatória e de níveis de EO medidos por meio da lipoperoxidação. A glutamina exerce papel importante no equilíbrio redox, pois é requerida para a síntese de glutatona no fígado, que se encontra na forma reduzida ou oxidada [113].

Estudos têm demonstrado o papel da glutamina como agente antioxidante, combatendo a formação de radicais livres. A suplementação com glutamina se mostrou eficiente no aumento da síntese hepática de enzimas antioxidantes, protegendo o tecido da ação de radicais livres em ratos submetidos a modelo utilizando nutrição parenteral. Em modelo de isquemia e reperfusão hepática, demonstrou que o tratamento com glutamina preservou a capacidade antioxidante, protegendo a estrutura e a função mitocondrial,

diminuindo a formação de radicais livres [114]. Em outro estudo, mostrou uma ação protetora contra lesões hepáticas, induzidas por choque hemorrágico em ratos, diminuindo a apoptose e sobrevivência celular. Sua função antioxidante tem sido estudada em outros sistemas, nos quais a administração de glutamina melhorou vascularização, reduziu a produção de citocinas e radicais livres envolvidos em um modelo experimental de choque séptico e reduziu os níveis de inflamação [115] [116].

Estudos sugerem que a glutamina pode reduzir os níveis de bilirrubina. No entanto, estudos experimentais têm demonstrado resultados conflitantes, que foram atribuídos aos modelos animais utilizados, como por exemplo, ratos submetidos à obstrução biliar extra-hepática, suplementados com glutamina, demonstraram ter níveis de gama GT significativamente mais baixos e os níveis de TGP significativamente maior no grupo que recebeu a suplementação com glutamina suplementação. No entanto, existem poucos estudos sobre o efeito da glutamina em modelos de colestase extra-hepática [117, 118].

A prevenção do EO em pacientes gravemente debilitados é benéfica, quando atua juntamente com o tratamento específico. A terapia antioxidante melhora o quadro clínico e diminui o índice global de complicações em pacientes graves [119, 120]. Diante disso, uma vez que já se sabe que o estresse oxidativo está envolvido na gênese de diversas doenças, procurou-se avaliar a ação da glutamina, como uma possível terapia antioxidante, na gastropatia da hipertensão portal.

OBJETIVOS DO ESTUDO

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar o estresse oxidativo e o envolvimento do óxido nítrico em modelo experimental de ligadura parcial de veia porta (LPVP), tratados com glutamina, intraperitonal – experimento I e intragástrica (gavagem) – experimento II, analisando as vias de liberação do NO, através da expressão de proteínas e enzimas envolvidas na regulação do tônus vascular e nos aspectos histopatológicos e imunohistoquímicos da mucosa gástrica.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Experimento I

Respondido no artigo I - *Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy*

1. Mensurar a pressão portal por meio da medida na veia mesentérica de todos os grupos de animais;
2. Avaliar os testes de função e integridade hepática, através de medidas de concentração sérica das transaminases (AST e ALT) e fosfatase alcalina (FA);
3. Avaliar a LPO, por meio técnicas de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL) em estômago de ratos;
4. Avaliar as enzimas antioxidativas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) em mucosa gástrica;
5. Avaliar presença de NO por meio de medida dos nitratos totais em mucosa gástrica;

6. Avaliar as alterações histopatológicas em estômago de ratos com hipertensão portal.

2.2.2 Experimento II

Respondido no artigo II – *Antioxidant properties of glutamine and your role in vegf-akt pathways in portal hypertension gastropathy*

1. Mensurar a pressão portal através de medida na veia mesentérica de todos os grupos de animais;
2. Avaliar a ação da glutamina na lipoperoxidação mediante a estimacão da concentração de produtos de peroxidação lipídica (TBA-RS);
3. Determinar os metabólitos do óxido nítrico (nitritos/nitratos);
4. Determinar a atividade da glutathione total e da enzima antioxidante superóxido dismutase nos animais com ou sem administração do antioxidante;
5. Avaliar a expressão da eNOS, VEGF, NTT e Akt em mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo LPVP, por imunohistoquímica;
6. Determinar a expressão da eNOS, VEGF, IP3K e p-Akt em estômago de ratos com hipertensão portal por *Western Blot* ;

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimento I

3.1.1 Delineamento da pesquisa

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo e, para isso, os animais sofreram tanto a simulação da cirurgia de ligadura parcial de veia porta como também foram induzidos a desenvolver hipertensão portal através da cirurgia de ligadura parcial da veia porta.

3.1.2 Delineamento experimental

3.1.2.1 Animais

Foram utilizados seis ratos machos Wistar para cada grupo experimental, peso médio de 250 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 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 ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. A água e a ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram fornecidos livremente. O número de animais utilizados no estudo foi baseado em cálculo amostral, o qual referia que, para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de grande efeito), considerando $\alpha=0,05$ e poder de confiança de 90%, são necessários, no mínimo, seis animais por grupo.

Os procedimentos com os animais realizaram-se de acordo com as normas preconizadas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação de Clínicas de Porto Alegre [121].

3.1.2.2 Grupos experimentais

O modelo utilizado foi o de hipertensão portal, de acordo com o estabelecido por Sikuler [122], através da ligadura parcial de veia porta. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo 1 - *Sham Operated* + Veículo (**SO**) - Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura parcial da veia porta e a administração de Veículo (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal;
- Grupo 2 - Ligadura parcial da veia porta + Veículo (**LPVP**) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e à administração de Veículo (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal;
- Grupo 3 - *Sham Operated* + Glutamina (**SO + G**) Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura parcial da veia porta e à administração de glutamina (25mg/Kg) por via intraperitoneal;
- Grupo 4 - Ligadura Parcial da veia porta + glutamina (**LPVP + G**) – Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e à administração de glutamina (25mg/Kg) por via intraperitoneal.

3.1.3 Procedimentos experimentais

3.1.3.1 Ligadura parcial da veia porta

O processo iniciou com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos e posicionamento para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com realização de tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, as alças intestinais foram expostas delicadamente por sobre uma gaze umidificada com soro fisiológico e a veia porta isolada. Uma agulha de 20G foi colocada sobre a veia porta e ambas unidas por um fio seda 3.0, sendo retirada a

agulha delicadamente após a ligadura. Deve-se certificar de que não tenha ocorrido a trombose da veia porta durante sua manipulação [122]. A cavidade abdominal foi fechada com pontos individuais no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados com pontos contínuos. Os animais recuperaram-se da anestesia em caixas individuais forradas com maravalha em encubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos às condições padrão da Unidade de Experimentação.

Os animais dos grupos 1 (SO) e 3 (SO+G) não foram submetidos à ligadura parcial da veia porta, sendo realizada somente a manipulação da veia porta mediante o estresse cirúrgico. Após 14 dias, os animais foram mortos por exsanguinação [123, 124].

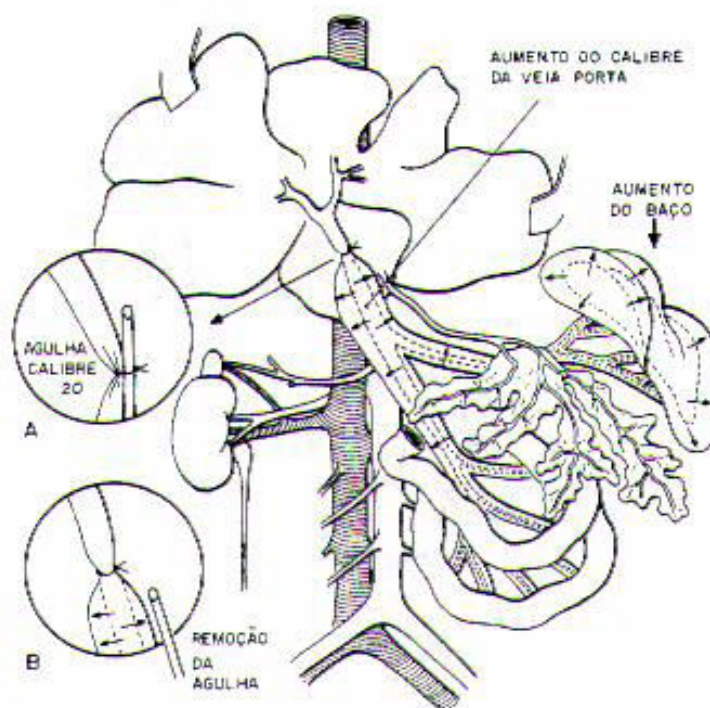


Figura 10. Modelo de Ligadura Parcial de Veia Porta (LPVP), estabelecido por Sikuler [122].

3.1.3.2 Administração do veículo e da glutamina

O tratamento com a glutamina iniciou 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.

3.1.3.3 Aferição da Pressão Venosa Portal; Morte dos Animais e Obtenção das amostras de tecido e sangue

No 15º dia, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente.

Primeiramente foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro [125]. Esse material foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das enzimas séricas aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Para a determinação da AST (aspartato-aminotransferase EC 2.6.1.1) e da ALT (alanina-aminotransferase EC 2.6.1.2) no plasma, foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática da AST e ALT foi obtida por meio da medição cinética a 567 nm. A atividade da fosfatase alcalina no plasma foi determinada pelo método enzimático automatizado. Para isso, utiliza-se como substrato o para-nitrofenilfosfato mais água, que formou para-nitrofenol, composto intensamente amarelo, com o máximo de absorbância de 400nm.

Posteriormente, realizaram-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com laparotomia ventral média, exposição das alças intestinais para visualização da veia mesentérica, onde foi realizada a aferição da pressão portal através de um catéter introduzido no vaso, ligado a um polígrafo (Lettica) que registra a pressão e expressa o valor aferido em mmHg.

Dando continuidade, foi retirado o estômago, sendo este pesado, e, posteriormente, separado em fragmentos:

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 posteriores análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes e avaliação de nitritos e nitratos.

3.1.3.4 Preparação do homogeneizado

Para homogeneizar o estômago, foram colocados 10 μ L de PMSF por cada mL de KCl, por grama de tecido. A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante quarenta segundos, à temperatura de 0 a 4° C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) durante dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer, à temperatura de -80 °C, para posteriores dosagens.

3.1.3.5 Dosagem de proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de estômago foi determinada, utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 μ L). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 μ L) em 780 μ L 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 dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteau diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm [126].

3.1.3.6 Determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico

Foi determinada a lipoperoxidação por meio 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 consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e de outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico. Foram colocados em tubo de ensaio, nessa 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, agitaram-se os tubos, os quais foram aquecidos à

temperatura de 100° C durante quinze minutos. Posteriormente, 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 [127].

3.1.3.7 Quimiluminescência

O método consistiu em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido. Avaliou-se a capacidade de resposta mediante a determinação da quimiluminescência (QL) produzida pela reação. Em tecidos expostos ao estresse oxidativo, o valor da QL iniciado por hidroperóxido de tert-butila (t-BOOH) foi maior que o valor correspondente ao tecido em condições basais. A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado, utilizando-se o canal de trítio (*Liquid Scintillation Correnter*, 1209 Rack beta, LKB WALLAR). Os homogeneizados de tecido (0,5 mL) foram colocados em viais de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos viais, ativada pela luz fluorescente, foram conservados na obscuridade até o momento do uso e as mensurações foram realizadas em sala escura. As condições da reação consistiam em solução reguladora de KCl 120 mM; fosfato 40 mM, pH 7,4, cuja concentração de proteínas do homogeneizado foi, aproximadamente, 1mg/mL, na concentração de t-BOOH 3mM (30µL). Os resultados foram expressos em contas por segundo por mg de proteína (cps/MG prot) [128].

3.1.3.8 Atividade da enzima superóxido dismutase – SOD

A atividade dessa enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o $O_2^{\bullet-}$. A técnica de medida da SOD foi baseada na inibição dessa reação. Para isso, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, 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). 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/mg de proteína (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) [129].

3.1.3.9 Atividade da enzima catalase - CAT

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional a atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem com respeito ao peróxido de hidrogênio. O ensaio consistiu em medir nas cubetas o meio de reação (solução reguladora de fosfato a 50mM) com distintas alíquotas de amostras. Depois se fez um gráfico com uma linha de base. Em seguida, adicionaram-se 20uL de H₂O₂ 300mM. A concentração foi expressa em nmol/mg de proteína [130].

3.1.3.10 Atividade da enzima glutathione peroxidase - GPx

A enzima catalisa a redução do H₂O₂ 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 da oxidação de NADPH em uma mistura de reação. Em uma cubeta, foram colocados 500uL de solução reguladora de fosfatos de potássio (100mM, pH 7,0), 100uL de H₂O bidestilada, 50uL de azida sódica 20mM, com 50uL de glutathione reduzida (GSH) 40mM, 50uL de glutathione reductase (GR) e 50uL NADPH. Essa mistura foi encubada durante 3 minutos e, logo após, se adicionaram 100uL de amostra diluída e 100uL de H₂O₂. As amostras foram lidas a 340nm. A atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína [131].

3.1.3.11 Avaliação dos metabólitos do óxido nítrico

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. 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 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 será incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Posteriormente foram utilizados 750 µL dessa mistura e adicionados 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 [132].

3.1.3.12 Histologia

A mucosa gástrica permaneceu durante doze horas em formaldeído 10% e após a amostra de estômago foi embebida em parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomo (Leitz[®] 1512) no qual se realizavam cortes com três micra (3µ). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante cinco 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 áreas selecionadas foram avaliadas em um microscópio equipado com uma câmera digital e conectado a um programa de captura de imagem (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) no Setor de Patologia da Santa Casa de Porto Alegre.

3.1.3.13 Análise Estatística

A partir dos dados coletados, as médias e os erros padrão das médias de cada grupo foram calculados, 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% ($P < 0,05$).

3.2 Experimento II

3.2.1 Delineamento da pesquisa

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo e, para isso, os animais sofreram tanto a simulação da cirurgia de ligadura parcial de veia porta como também foram induzidos desenvolver hipertensão portal por meio da cirurgia de ligadura parcial da veia porta.

3.2.2 Delineamento experimental

3.2.2.1 Animais

Foram utilizados seis ratos machos Wistar para cada grupo experimental, peso médio de 250 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 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 ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. A água e a ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram fornecidos livremente. O número de animais utilizados no estudo foi baseado em cálculo amostral, o qual referia que para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de grande efeito), considerando $\alpha = 0,05$ e poder de confiança de 90%, são necessários, no mínimo, seis animais por grupo.

Os procedimentos com os animais ocorreram conforme o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação de Clínicas de Porto Alegre [121].

3.2.2.2 Grupos experimentais

O modelo utilizado foi o de hipertensão portal, de acordo com o estabelecido por Sikuler [122], mediante ligadura parcial de veia porta. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo 1 - *Sham Operated* + Veículo (**SO**) - Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura parcial da veia porta e a administração de Veículo (NaCl 0,9%) por via intragástrica;
- Grupo 2 - Ligadura parcial da veia porta + Veículo (**LPVP**) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e à administração de Veículo (NaCl 0,9%) por via intragástrica;
- Grupo 3 - *Sham Operated* + Glutamina (**SO + G**) Grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura parcial da veia porta e à administração de glutamina (25mg/Kg) por via intraperitoneal;
- Grupo 4 - Ligadura Parcial da veia porta + glutamina (**LPVP + G**) – Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e à administração de glutamina (25mg/Kg) por via intraperitoneal.

3.2.3 Procedimentos experimentais

3.2.3.1 Ligadura parcial da veia porta

O processo iniciou com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos e posicionamento para cirurgia. Foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente. A intervenção cirúrgica iniciou com realização de tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, as alças intestinais foram expostas delicadamente por sobre uma gaze umidificada com soro fisiológico e a veia porta isolada. Uma agulha de 20G foi colocada sobre a veia porta e ambas unidas por um fio seda 3.0, sendo retirada a agulha delicadamente após a ligadura. Deve-se certificar de que não tenha ocorrido a trombose da veia porta durante sua manipulação [122]. A cavidade abdominal foi

fechada com pontos individuais no plano cutâneo, e o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados com pontos contínuos. Os animais recuperaram-se da anestesia em caixas individuais forradas com maravalha em encubadora para recém-nascidos (FANEM - SP), antes de serem devolvidos às condições padrão da Unidade de Experimentação.

Os animais dos grupos 1 (SO) e 3 (SO+G) não foram submetidos à ligadura parcial da veia porta, sendo realizada somente a manipulação da veia porta mediante o estresse cirúrgico. Após 14 dias, os animais foram mortos por exsanguinação [123, 124].

3.2.3.2 Administração do veículo e da glutamina

O tratamento com a glutamina iniciou a partir do 8º dia do procedimento cirúrgico, diariamente, por via intragástrica (gavagem), na dose de 14 mg de glutamina por Kg de peso do animal. Os animais controle receberam o veículo (solução fisiológica – NaCl 0,9%) no volume de 1mL.

3.2.3.3 Aferição da pressão venosa portal; Morte dos animais e Obtenção das amostras de tecido e sangue

No 15º dia, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal intraperitonealmente.

Primeiramente foi coletado sangue pela técnica da punção de plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro [125]. Esse material foi utilizado para avaliar integridade hepática por meio das análises das enzimas séricas aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Posteriormente, realizaram-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com laparotomia ventral média, exposição das alças intestinais para visualização da veia mesentérica, em que foi realizada a aferição da pressão portal através de um catéter introduzido no vaso, ligado a um polígrafo (Lettica) que registra a pressão e expressa o valor aferido em mmHg. Após, o estômago foi retirado, pesado e dividido em fragmentos para as demais análises.

1º) Um pequeno fragmento do estômago foi imergido em solução de formolaldeído 10% durante doze horas para posterior análise imunohistoquímica;

2º) Um pequeno fragmento do estômago foi imergido em *eppendorfs* em nitrogênio líquido e após congelado a -80°C para análises de *Western Blot*;

3º) O restante do estômago foi congelado a -80°C para posteriores análises de lipoperoxidação, enzima antioxidante e avaliação de nitritos e nitratos,

3.2.3.4 Preparação do homogeneizado

Para homogeneizar o estômago, foram colocados 10uL de PMSF por cada mL de KCl, por grama de tecido. A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante quarenta segundos, à temperatura de 0 a 4° C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) durante dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer, à temperatura de -80 °C, para posteriores dosagens.

3.2.3.5 Preparação do extrato celular para análise de Western blot

A mucosa gástrica foi lavada rapidamente com PBS gelado e homogeneizada em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de Triton X-100, 5mM Na₃VO₄, 1mM Naf, 1mM NaPPi e 1mM de PMSF) em tubo Dalce com pistilo de teflon, em ciclos de 30 segundos, seguido de repouso em gelo por 30 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000rpm por 30 minutos em centrífuga Beckman J-21B rotor JA 20. Após alíquotagem das amostras, realizou-se reação de Bradford [133] para determinação da concentração de proteínas. As amostras foram armazenadas a -80°C para posterior utilização para ensaios de pull down e co-imunoprecipitação para posteriores estudos de interação e caracterização de parceiros moleculares das proteínas estudadas.

3.2.3.6 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de fígado foi determinada, utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se

volumes de 50, 100 e 150 μL). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 μL) em 780 μL de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 ml de NaHCO_3 , 0,5 mL do reativo B1 ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, foram aguardados dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 625 nm [126].

3.2.3.7 Determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico

Foi determinada a lipoperoxidação por meio 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 consequente 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, nessa 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, agitaram-se os tubos, 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 dez 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 [127].

3.2.3.8 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com o $\text{O}_2^{\bullet-}$. A técnica de medida dessa enzima baseou-se na inibição dessa reação. Para isso, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo $\text{O}_2^{\bullet-}$ 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 µL de adrenalina (60 mM, pH 2,0). 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/mg de proteína (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) [129].

3.2.3.9 Glutathiona total

As quantidades de GSH e GSSG intracelulares, bem como a relação entre as concentrações desses dois metabólitos fornecem o índice do estado redox intracelular. Para análise de GSH e GSSG, foi utilizada técnica, onde os fígados foram homogeneizados com 5% (w/v) de ácido metafosfórico. Após a centrifugação (16000 xg, durante 2 minutos), o tecido homogeneizado foi avaliado espectrofotometricamente (415 nm) em um leitor de microplacas, por modificação do 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) [DTNB, Sigma]/GSSG reductase (Sigma) método de reciclagem, utilizando o N-ethylmaleimide (NEM, Fluka) conjugando técnica para a preparação da amostra GSSG. Amostras (10 ml) tanto para GSH e determinações GSSG, foram analisadas em 105 mL volumes, em placas de 96 poços de poliestireno (Corning) a 37 ° C na presença de 10 mM DTNB, 0.17mm β-NADPH (Sigma, dissolvido em 0,5% (w/v) NaHCO₃ como um agente estabilizador) e 0,5 U/ml GSSG reductase. Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteína¹⁶⁵.

3.2.3.10 Avaliação dos metabólitos do óxido nítrico

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. Dessa forma, a medida do NO faz-se de forma indireta, por meio 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 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 foram utilizados 750 µL dessa mistura e adicionados 750 µL do reativo de Griess, incubando-a novamente, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A leitura foi realizada a 550 nm e será feita uma curva padrão para a determinação de nitritos e nitratos [132].

3.2.3.11 Western Blot

A técnica utilizada para essa quantificação foi a de Western blot, utilizando o sistema descrito por Laemmli para a eletroforese [134], e para o blotting a técnica descrita por Towbin e colaboradores [135]. Foi determinada a expressão das proteínas eNOS, PI3K, p-Akt e VEGF. As proteínas (80µg) foram separadas por gel de poliacrilamida 10-15% e transferidas eletricamente para membranas de difluorido de polivinilideno (Millipore, Bedford, MA, USA). Posteriormente as membranas foram colocadas na solução de bloqueio Tris/salina-tamponada/Tween-20 (TBST - 5% de leite em pó desnatado em tampão fosfato salina-Tris contendo 0,05% Tween 20) durante 60 minutos, a 37° C. A membrana ficou incubada durante toda a noite a 4°C com anticorpo policlonal eNOS e VEGF (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), p-AKT, (1:300 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) e PI3K (1:250 Sigma, USA). Depois disso, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas durante uma hora em temperatura ambiente com um anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, unido a HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca). As proteínas foram detectadas mediante quimiluminescência, utilizando o kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e a densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagem (ImageJ, USA).

3.2.3.12 Imunohistoquímica

Os cortes do tecido (4µm de espessura) embebido em formalina e fixado em parafina foram submetidos à técnica de imunohistoquímica [136]. A técnica consiste nas seguintes etapas: desparafinização, rehidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio de reações inespecíficas. O anticorpo primário foi incubado por 12 horas a 4C, conforme diluição específica indicada na bula de cada anticorpo utilizado. Após foi aplicado o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, DAKO), revelação com diaminobenzidina tetrahydroclorido (Kit DAB, DAKO) e contrastado com hematoxilina. Os anticorpos utilizados foram **eNOS** e **VEGF** (1:200 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), **Akt** (1:300 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) e **NTT** (1:300 Sigma, USA) em mucosa gástrica.

3.2.3.13 Análise estatística

Os dados foram calculados e analisados utilizando ANOVA. *Post hoc* de múltiplas comparações foi executado com teste de *Student Newman-Keuls*. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa estatístico Prisma Graphpad versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy[◆]

Camila Marques,* José L. Mauriz,[§] Douglas Simonetto,[†]
Claudio A. Marroni,[†] María J. Tuñon,[§] Javier González-Gallego,[§] Norma P. Marroni*[‡]

* Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS. Brazil.

[†] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre-UFCSPA. Brazil. [‡] Universidade Luterana do Brasil-ULBRA. Brazil.

[§] Institute of Biomedicine, University of León and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD). Spain.

ABSTRACT

Background and rationale. Portal hypertension (PHI) is a clinical syndrome characterized by increases of the blood flow and/or of the vascular resistance in the portal system. A direct consequence of PHI can appearance different lesions on the gastric mucosa and submucosa, cumulatively termed portal hypertensive gastropathy (PHG). **Aims.** To investigate the effects of glutamine on oxidative stress in an experimental model of PHG induced by partial portal vein ligation (PPVL). **Material and methods.** Portal pressure, transaminase and alkaline phosphatase activity were quantified. Gastric tissue damage was assessed by histological analysis. Oxidative stress was measured by quantification of cytosolic concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), hydroperoxide-initiated chemiluminescence (QL), and nitric oxide (NO) production. Moreover, activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) were analyzed. **Results.** Transaminase and alkaline phosphatase activities were not significantly modified by PPVL, indicating absence of liver injury. Histological analysis of gastric sections showed a lost of normal architecture, with edema and vasodilatation. TBARS, QL, and NO production were significantly increased in PPVL animals. A reduction of SOD activity was found. Glutamine administration markedly alleviated histological abnormalities and oxidative stress, normalized SOD activity, and blocked NO overproduction. **Conclusions.** Our results confirm that the use of molecules with antioxidant capacity can provide protection of the gastric tissue in portal hypertension. Glutamine treatment can be useful to reduce the oxidative damage induced by PHI on gastric tissue.

Key words. Portal hypertension. Glutamine. Nitric oxide.

INTRODUCTION

Portal hypertension (PHI) is a clinical syndrome which is usually secondary to intrahepatic or extrahepatic obstruction of portal flow. Increased resistance to portal blood flow is the primary factor in

the pathophysiology of portal hypertension.¹ As the portal pressure elevates, portal-systemic collaterals develop gradually to diverse blood flow from the portal system. Gastroesophageal varices are most prominent collaterals and gastroesophageal variceal hemorrhage can lead to a high morbidity and mortality. Different lesions characterized by marked dilatation of the gastric mucosa and submucosa, with a mosaic-like pattern with or without red spots, have been detected in both patients with cirrhotic or non-cirrhotic portal hypertension.^{2,3} These morphological alterations have been cumulatively termed portal hypertensive gastropathy (PHG), as they are considered a direct consequence of PHI.⁴

The lesions of the gastric mucosa observed during endoscopy in patients with portal hypertension and cirrhosis are very common, occurring in between 7 and 98% of cases, according to different series.^{4,5} Approximately 65-90% of those patients have mild PHG, whereas 10-25% of patients have severe

[◆]This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Correspondence and reprint request: Claudio Augusto Marroni, M.D., Ph.D.
Departamento de Gastroenterologia
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Jose Kanan Aranha 102, Porto Alegre
91760-470, Brasil
Fax: (+55 51) 9964-3011
E-mail: nmarroni@terra.com.br

*Manuscript received: May 11, 2011.
Manuscript accepted: May 27, 2011.*

PHG.⁶ The likelihood of developing PHG is thought to be dependent on the aetiology of portal hypertension and the severity of liver disease. However, PHG can occur in patients who do not have cirrhosis,^{7,8} in patients awaiting liver transplantation,⁹ or in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) therapy for portal hypertension associated bleeding.¹⁰

The molecular mechanisms involved in the pathogenesis of PHG have not been fully elucidated. Cellular redox state is a consequence of the precise balance between the levels of oxidizing and reducing equivalents, such as reactive oxygen species (ROS) and endogenous antioxidants. ROS are kept at physiologically optimal levels under normal conditions by antioxidant defense systems, including the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT). Perturbation of this equilibrium due to increased ROS production and/or reduced antioxidants leads to oxidative stress. A role for oxidative stress in the development of the hyperdynamic circulation associated to PHI has been proposed by some authors,¹¹ and recently gastric tissue oxidative changes in patients with PHG have been described.¹²

Increases in the synthesis of nitric oxide (NO) have also been reported in liver of rats with PHI.¹³ Moreover, NO production has been implicated in the pathogenesis of PHG, with increases in NO serum levels in patients with PHG. The enhanced synthesis of NO induces hyperdynamic circulation and peroxynitrite overproduction by reaction with ROS, increasing the susceptibility of gastric mucosa to damage.^{3,14}

Glutamine, a nonessential amino acid, has received increasing attention because it becomes essential during stress and catabolic conditions.^{15,16} Glutamine administration can result in an enhanced antioxidant capacity in different situations such as critical illness or sepsis.¹⁷ In stomach, glutamine is able to protect against peptic ulceration, and improves the healing process of ulcers.¹⁸ Because glutamine plays a role in the efficient treatment of various diseases, the present study was designed to investigate the potential beneficial effects of glutamine administration on gastric oxidative stress, NO production, and the histological modifications in an experimental model of PHG.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental groups

Male Wistar rats with mean weight of 250 g were used. Animals were obtained from the Center for

Breeding of Laboratory Animals (CREAL) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Rats were caged at 20-24 °C, with a 12 h light/dark cycle, and free access to food and water. All animals received humane care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985). The rats were randomly divided into four groups of fourteen animals each:

- S (sham-operated rats receiving only CIna as vehicle).
- S+G (sham-operated rats receiving glutamine).
- PPVL (PPVL rats receiving vehicle).
- PPVL+G (PPVL rats receiving glutamine).

Experimental procedures

During the procedure, rats were anesthetized with ketamine chlorhidrate (Ketalar, Parke Davis, 100 mg/kg), and xilazine 2% (Rompun, Bayer, 50 mg/kg) cocktail i.p. PHI was induced by partial portal vein ligation (PPVL) as described by Moreira, *et al.*⁴ Briefly, the portal vein was isolated and a 3-0 silk ligature was tied around both the portal vein and adjacent 20 gauge blunt-tipped needle. The needle was then removed, and the vein allowed to re-expand. A second loose ligature was left around the portal vein with two endings of the ligature placed on each side in the abdominal cavity. The abdomen was then closed and the animal allowed to recover. Control rats underwent a similar operation but without occlusion of portal vein. Sham operated animals received only vehicle (CIna, 1 mL/kg, i.p.). Glutamine was administered daily (25 mg/kg, daily, i.p.) by 7 days, beginning on the eighth day after the surgical protocol. All rats were anesthetized and sacrificed on the fifteenth day of the protocol. Stomachs were immediately removed and blood samples were centrifuged at 1,800 g for 15 min at 4 °C to obtain plasma.

Histology

For histological examination a piece of the stomach was trimmed, and fixed by immersion in Bouin's solution for 12 h, and then transferred to 10% buffered formalin. The blocks were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in paraffin wax. Serial 3- μ m. It was performed a semi-quantitative analysis, being used as a parameter 0 to 4 (absent,

very small amount, small, moderate and heavy), by two observers.

Sections were stained with hematoxylin and eosin. Five sections from each sample were analyzed by two independent pathologists who had no prior knowledge of the animal groups.

Hemodynamic studies and plasma enzyme activities

Portal pressure (PP) was evaluated by cannulating the superior mesenteric vein with PE-50 catheter connected to a pressure transducer (Braun AG, Melsungen, Germany). PP recordings were made on a Letica polygraph (Letica, Rochester, MI, USA). The plasma activity of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP) was estimated by commercially available kits (Boehringer, Mannheim, Mannheim, Germany).

Oxidative stress determinations

Gastric oxidative stress was evaluated by measuring both the concentration of aldehydic products (TBARS), and the hydroperoxide-initiated chemiluminescence (QL). Briefly, the frozen tissue was homogenized in 140 mM KCl, 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 14,000 g for 10min. For TBARS analysis the amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid reaction using 3 mg of protein per sample. The samples were incubated at 90 °C for 30 min after adding 500 μ L of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid, and then centrifuged at 2,000 g for 15 min. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant at 535 nm.¹⁹ For QL determination, 0.5 mL of homogenate were added to 120 mM KCl, 30 mM phosphate buffer (pH 7.4), and 3 mM tert-butyl hydroperoxide at 30 °C and assayed for chemiluminescence in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode.

NO quantification

Nitric oxide production in the gastric tissue was measured indirectly using a quantitative colorimetric assay based on the Griess reaction. This method is sensitive for both nitrite and nitrate ions.²⁰ Briefly, the samples were deproteinized and subsequently centrifuged for 20 min at 12,000 g. After incubation of the supernatants with *E.coli* nitrate

reductase (37 °C, 30 min) to convert nitrates to nitrites, 1 mL of Griess reagent (0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfonylamide, 25% phosphoric acid) was added. The reaction was performed at room temperature for 20 minutes, and absorbance at 546 nm was measured, using a sodium nitrate solution as standard.

Antioxidant enzyme activities

Cytosolic superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assayed spectrophotometrically by rate of epinephrine auto-oxidation, which is progressively inhibited by amounts of SOD in the homogenate, the amount of enzyme that inhibits auto-oxidation at 50% of the maximum inhibition is defined as 1 unit of SOD activity.²¹ Glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.19) was carried out according to Flohé and Gunzler,²² cummene hydroperoxide was used as the substrate, and 1 unit of enzyme activity was defined as the amount of protein that oxidizes 1 μ mol of reduced NADPH/min. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was determined by measuring the exponential disappearance of H₂O₂ at 240 nm.²³

Statistical analysis

Results are expressed as mean values \pm SEM. The data were compared by analysis of variance (ANOVA); when the analysis indicated the presence of a significant difference post hoc comparisons were carried out using the Newman-Keuls test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data were analyzed using the statistical software SPSS+ version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

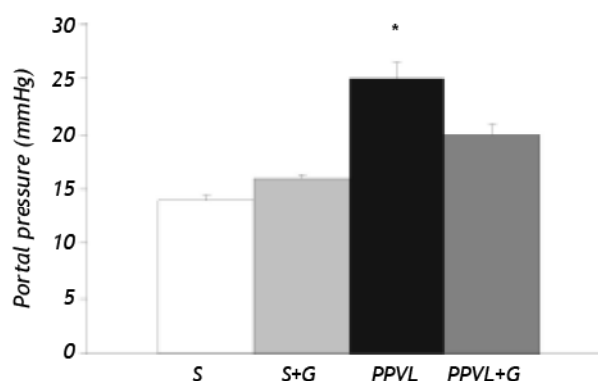


Figure 1. Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and glutamine (G) administration on portal pressure. Portal pressure was evaluated by cannulating the superior mesenteric. Values are means \pm SEM for 14 rats. * $p < 0.05$ against sham-operated group.

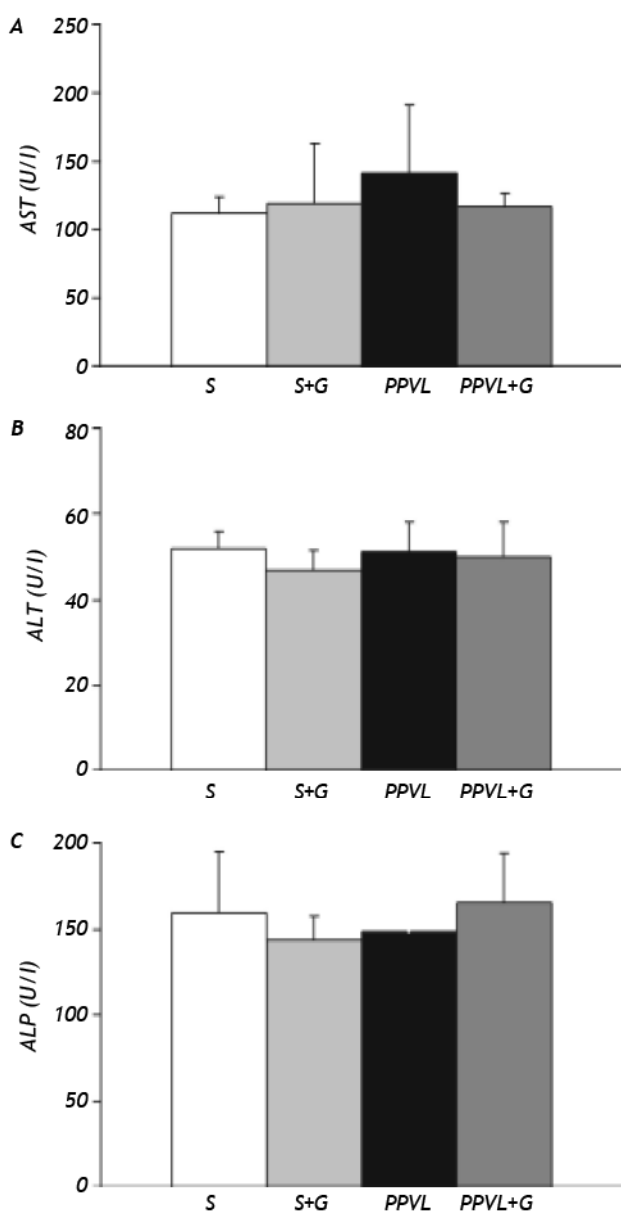


Figure 2. Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and glutamine (G) administration on serum transaminases (AST and ALT) and alkaline phosphatase (ALP) activities. Values are means \pm SEM for 14 rats.

RESULTS

Portal pressure and transaminase activities. There was a significant difference in portal pressure between sham-operated rats and those with portal vein ligation (+80%). This increase was partially prevented by glutamine administration in PPVL+G rats (Figure 1). Transaminase and alkaline phosphatase

activities did not significantly differ between the different experimental groups (Figure 2).

Histology

Histological examination of gastric sections in PPVL animals showed modifications of normal structure, with congestion and oedema in the submucosa, vasodilatation and proliferation of blood vessels (Figure 3A and 3B). Administration of glutamine markedly alleviated the histological abnormalities (Figure 3C and 3D). No histological changes were detected in the livers of different groups (data not shown).

Markers of oxidative stress

The cytosolic concentration of TBARS increased in the animals with portal hypertension (PPVL group) (+620%), while values did not significantly differ from the controls in PPVL rats treated with glutamine (Figure 4A). A significant increase in lipoperoxidation measurement by hydroperoxide-initiated chemiluminescence (QL) was also observed in PPVL rats (+127%). This increase was precluded by the administration of glutamine in PPVL+G rats (Figure 4B).

Nitric oxide levels

Figure 5 shows concentration of nitrites in gastric tissue. Values were significantly higher in PPVL rats (+100%). Moreover, this parameter was completely normalized in animals receiving glutamine.

Antioxidant enzyme activities

Analysis of antioxidant enzyme activities showed that portal vein ligation induced an important reduction of gastric SOD activity in the PPVL group (-45%). Values were increased by glutamine administration. However, no significant difference in both GPx and CAT activities was found between the different experimental groups (Figure 6).

DISCUSSION

PHG is recognized as a clinical entity in PHI, but the exact pathogenesis of PHG is still unclear. The PPVL animal model has been extensively studied and found to be a useful tool for understanding the pathophysiology of PHI and PHG.^{3,24} This model has been developed in different animal species such as

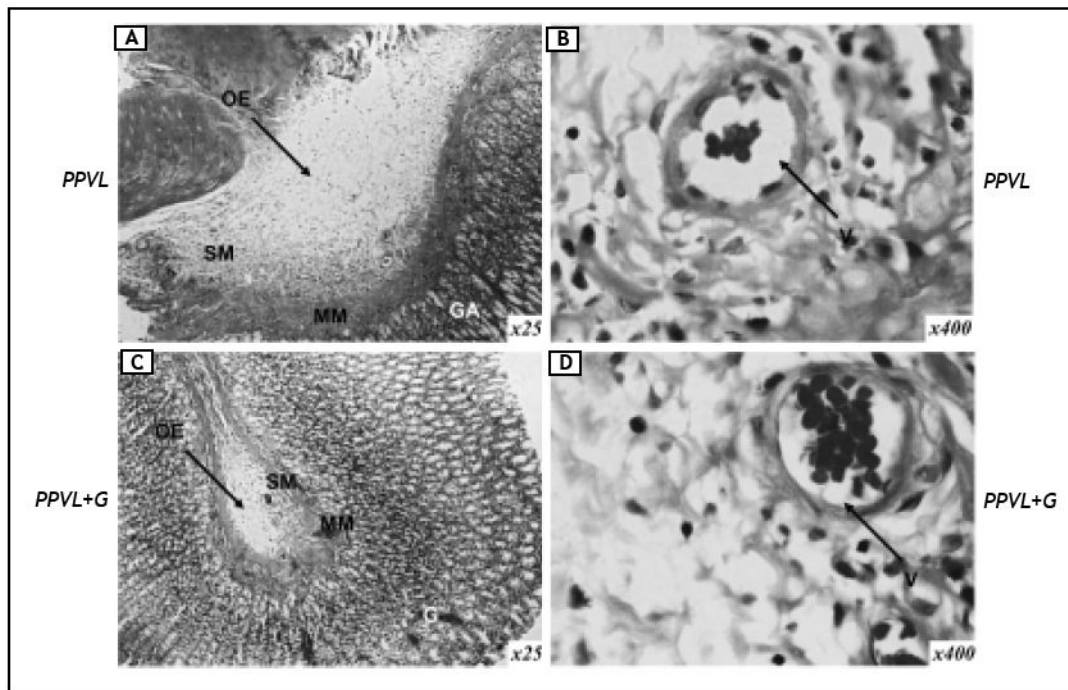


Figure 3. Representative micrographs of gastric tissue in rats with partial portal vein ligation (PPVL) (A and B) and rats with portal vein ligation and glutamine treatment (PPVL + G) (C and D). G: glandular tissue. MM: muscular mucosa. SM: submucosa. Hematoxylin and eosin staining; original magnification x 25 (A and C), x 400 (B and D). Oedema (OE) and vasodilatation (V) were evident in PPVL-rats. Glutamine treatment was able to ameliorate histological changes.

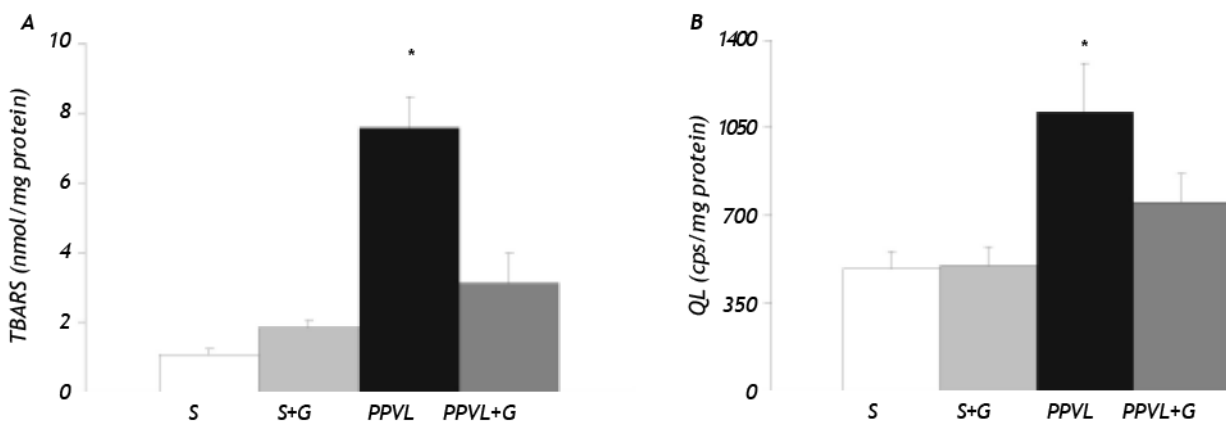


Figure 4. Effect of partial portal vein ligation (PPVL) and glutamine (G) administration on gastric oxidative stress. (A) TBARS concentration. (B) chemiluminescence (QL). Values are means \pm SEM for 14 rats. * $p < 0.05$, against sham-operated group.

rats, mice or rabbits,²⁵ and it is presently accepted to be suitable for investigating the pathogenesis of PHI and PHG, because is very reproducible and easy to perform, and portal hypertension develops rapidly.²⁵ The model used in our study is characterized by prehepatic portal hypertension, with a maintained hepatic structure, an hyperdynamic circulation and portal-systemic shunting.^{24,25} The percentage of portal-systemic shunting approaches 100% after the

7th. day. Moreover, mesenteric vasodilatation and increased cardiac output are detectable at the 4th day.²⁴ This model can provide measurements in the portal circulation which cannot be performed accurately in humans because of ethical and technical limitations.

In our experimental work, portal hypertension was accompanied by the presence of edema and dilated vessels in the gastric submucosae (Figure 3) but

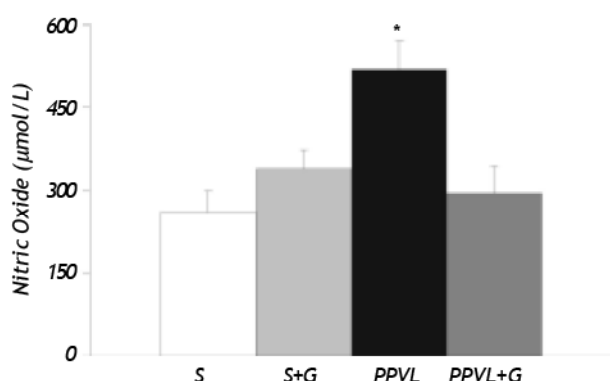


Figure 5. Effect of partial portal vein ligation (PPVL) and glutamine (G) administration on gastric nitric oxide (NO) production. Values are means \pm SEM for 14 rats. * $p < 0.05$, against Sham-operated group.

no alteration was seen in liver histology or transaminase activities (Figure 2). This confirms previous findings that the procedure of PPVL, although causing a transient reduction in the metabolic activity of the liver,²⁶ does not produce hepatocellular damage,²⁷ and supports the suggestion that portal hypertension seems to be the key factor for the development of PHG, being equally common in portal hypertensive patients with or without liver disease.²⁸ Different authors have demonstrated that PPVL rats show abnormalities of the gastric microvasculature comparable to those observed in PHG in humans.^{25,29} In our study glutamine administration was able to reduce portal hypertension and ameliorate all the gastric histopathological changes, with reduction of edema and vasodilatation. It has been described that administration of a mixture of aminoacids containing glutamine is able to reduce the histological changes on acid-induced gastric damage in starved rats.³⁰ Moreover, other studies show that glutamine is able to protect against peptic ulceration, and improves the healing of ulcers in stomach.³¹

Oxidative stress can be the result of excessive generation of reactive oxygen species (ROS), depletion of intracellular defenses or a combination of both, leading to an imbalance in the redox status of cell. ROS overproduction have been implicated on several pathophysiological situations,^{20,32} and have been also described in PHI and PHG.^{3,33} Moreover, the fact that PPVL results in oxidant injury was first demonstrated by Fernando, *et al.*,³⁴ which concluded that formation of ROS may be important in the pathogenesis of hemodynamic changes and the development of the hyperdynamic circulation. Our data

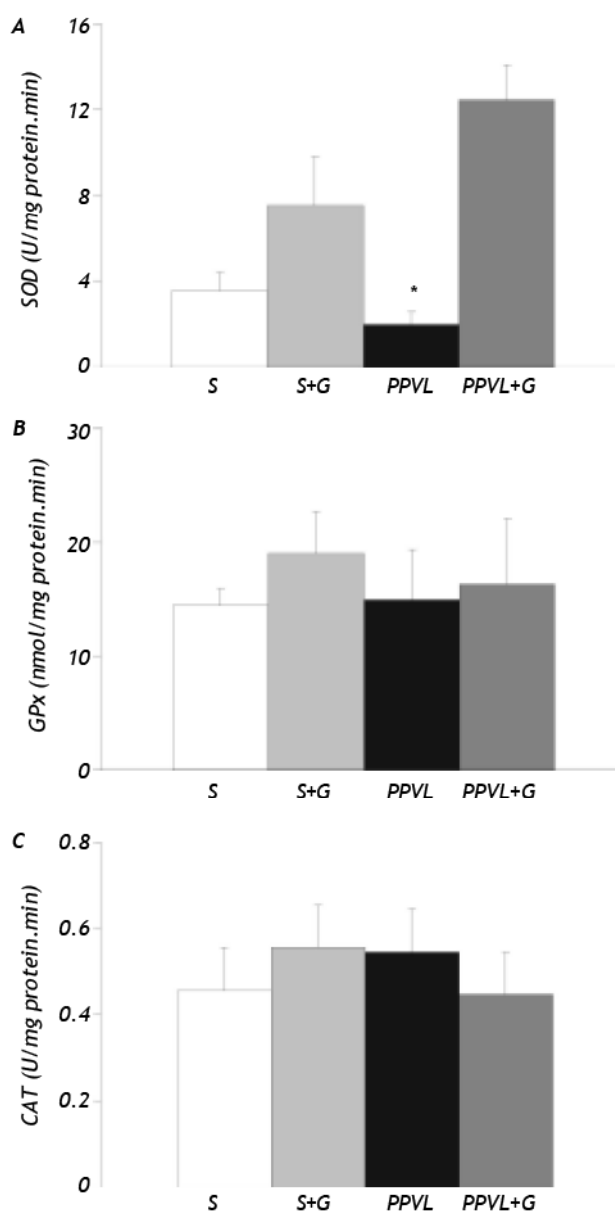


Figure 6. Effect of partial portal vein ligation (PPVL) and glutamine (G) administration on gastric antioxidant enzyme activities. A. Superoxide dismutase (SOD) activity. B. Glutathione peroxidase (GPx) activity. C. Catalase (CAT) activity. Values are means \pm SEM for 14 rats. * $p < 0.05$, against sham-operated group.

demonstrate that glutamine is able to induce a significant reduction of oxidative stress induced by PHG, as indicated by the lowering of TBARS concentration and hydroperoxide-initiated chemoluminescence (Figure 4). Different studies have shown the antioxidant capacity of different aminoacids or their derivatives, such as cysteine, methionine, glyci-

ne, glutamine, etc.³ Glutamine is required for glutathione synthesis, the most abundant intracellular thiol and antioxidant. A decrease of glutathione levels in portal hypertensive rats has been reported by different authors. Studies about the effect of toxic agents on the gastric mucosa have revealed that a decrease in glutathione (20-25%) can lead to significant damage to the gastric mucosa by lipid peroxidation.³¹ Moreover, it has been described that enteral glutamine supplementation in an animal model of ileitis enhances the intestinal glutathione content,³⁵ and it has been reported that prophylactic glutamine administration is associated with decreased TBARS and increased glutathione levels in colonic mucosa of rats with TNBS-induced colitis.³⁶ Studies have demonstrated increased oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of HP in gastric mucosa. Demonstrating the involvement of lipid peroxidation, but also an increase in the levels of nitrotyrosine in gastric mucosa.³⁷ Some research, conducted with other antioxidants like vitamin E and lazaroid show the reduction of lipid peroxidation in a model of intestinal injury scheme and HP, respectively, induced by oxidative stress. These studies demonstrated a reduction of lipid peroxidation in experimental groups subjected to these models.³⁸ Therefore, antioxidant properties of glutamine³⁹ could contribute to their beneficial effects in experimental PHG.

Nitric oxide (NO), is a potent vasodilator, is generated from L-arginine by an enzyme called NO synthase (NOS). Distinct cDNAs for NOS enzyme have been described for an inducible isoform (iNOS) and 2 constitutive isoforms (eNOS and nNOS).⁴⁰ Studies have shown the activation of eNOS and, although this increase in their levels may explain the increased levels of NO in gastric mucosa of HP animals, we know the existence of other pathways involved in this mechanism. For example, via PI 3-kinase-Akt. These data suggest that activation of eNOS in gastric mucosa is not only caused by the increase of eNOS protein, but is also caused by direct phosphorylation of eNOS through the activation of PI 3-kinase-Akt and contributes to increase NO production.⁴¹ Molecular studies indicate that the lesion secondary to HP in the gastric mucosa induced by alcohol may inhibit ERK2 activation in response to injury, with an elevation of MKP-1. Research conducted in transfected cell lines shows an overexpression of MPK-1, suggesting an inhibition of ERK, indicating a pre-expression of MPK-1 in lesions of HP, in an experimental model induced by alcohol.⁴²

In the gastric mucosa, NO can play different roles. NO protects the gastric mucosa against injury by ethanol and endothelin-1, whereas the inhibition of NO can increase the gastric mucosal injury.⁴³ However, the excessive increase of NO production has a cytotoxic potential, enhancing mucosal injury. We have detected an increased production of NO in our experimental model, which can be related to the induction on eNOS, nNOS, and iNOS mRNA expression, previously described in portal hypertensive gastric mucosa.^{44,45} Excessive NO synthesis, associated with ROS production, plays an important role in the increased susceptibility to gastric damage by peroxynitrite overproduction, which initiates membrane lipid peroxidation and thus contribute to cell injury.⁴⁶ As a result, NO and peroxynitrite overproduction may be an underlying mechanism for the increased susceptibility to damage and is probably related to the pathogenesis of PHG. Some authors have described a reduction on gastric damage by inhibition of endogenous NO production, which may be in part associated with a significant decrease in expression of gastric mucosa iNOS mRNA.³⁵ A previous report of our group has shown that the administration of quercetin, an antioxidant molecule, is able to reduce NO production by a reduction of iNOS protein level in PPVL rats.³ Considering that NO levels rise in the experimental groups, this could be the explanation for the reduction of portal pressure by glutamine. And NO produced through the action of NOS on L-arginine, which are released from L-citrulline and NO. Reliant addition, it is suggested that L-arginine would have a limited role in the presence of glutamine, inhibiting the formation of NO by reducing portal pressure.^{46,47} Furthermore, in a rat model of acetic acid-induced colitis, we have also found that glutamine administration can reduce both iNOS expression and oxidative stress.⁴⁸

Antioxidant enzymes such as SOD, GPx and CAT play critical roles in oxidative stress protection by converting ROS into less harmful products. Our results indicate that LLPV induces an important reduction of the SOD activity, without changes on GPx and CAT activities. The decrease of SOD activity is in line with previous studies which have shown a similar effect in NSAID-induced gastropathy and in PPLV rats.^{3,48} The drop of SOD activity could be explained by the increase in NO production. In this way, it has been previously described that SOD inactivation can be induced by NO overproduction; moreover, administration of NO synthase inhibitors can prevent the loss of SOD activity.⁴ This reduction may enhance lipid peroxidation as well as

aggravate the injury to gastric mucosa. In our study, glutamine administration was able to block the reduction on SOD activity, thus contributing to normalize the gastric antioxidant defense. Although the potential role of antioxidant therapy has not been studied widely, our group has described previously that the administration of quercetin was able to normalize SOD activity and reduce oxidative stress, alleviating gastric damage induced by PHI, in PPLV rats.³ The non-significant increase in SOD activity induced by glutamine even in absence of PHI is difficult to explain, but could be, at least partly related to the induction of superoxide generation that has been occasionally reported in different cell types. Moreover, the increase in SOD activity in PPLV group can be related to its capacity to block the NO overproduction by reduction of iNOS expression in portal hypertensive gastric mucosa,⁴⁹ ameliorating the SOD inactivation by NO.⁵⁰

In this paper, we describe the beneficial effects of glutamine treatment on oxidative stress, but more experimental studies are needed to better understand the molecular mechanisms of action of this amino acid in hypertensive gastropathy. The reduction of portal pressure, associated with a marked reduction of histological changes, the normalization of SOD, the reduction in NO production and inhibition of lipid peroxidation induced by glutamine, confirms that use of molecules with antioxidant capacity could provide a new therapeutic modality for protecting the gastric tissue in portal hypertension. Studies have shown that the formation of L-citrulline from L-arginine is inhibited by high levels of glutamine. As the formation of NO occurs through the action of NOS on L-arginine, it is suggested that glutamine acts by inhibiting the release of endothelium-derived NO, the main modulator of HP, thus reducing the pressure in the splanchnic.

REFERENCES

- Rodríguez-Vilarrupla A, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC. Current concepts on the pathophysiology of portal hypertension. *Ann Hepatol* 2007; 6: 28-36.
- Thuluvath PJ, Yoo HY. Portal hypertensive gastropathy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2973-8.
- Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroñi C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1939-46.
- Vigneri S, Termini R, Piraino A, Scialabba A, Pisciotta G, Fontana N. The stomach in liver cirrhosis. Endoscopic, morphological, and clinical correlations. *Gastroenterology* 1991; 101: 472-8.
- Carpinelli L, Primignani M, Preatoni P, Angeli P, Battaglia G, Beretta L, et al. Portal hypertensive gastropathy: reproducibility of a classification, prevalence of elementary lesions, sensitivity and specificity in the diagnosis of cirrhosis of the liver. A NIEC multicentre study. New Italian Endoscopic Club. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 533-40.
- Pique JM. Portal hypertensive gastropathy. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1997; 11: 257-70.
- Sarin SK, Sreenivas DV, Lahoti D, Saraya A. Factors influencing development of portal hypertensive gastropathy in patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1992; 102: 994-9.
- Amarapurkar DN, Dhawan PS, Chopra K, Shankaran K, Kalro RH. Stomach in portal hypertension. *J Assoc Physicians India* 1993; 41: 638-40.
- Zaman A, Hapke R, Flora K, Rosen H, Benner K. Prevalence of upper and lower gastrointestinal tract findings in liver transplant candidates undergoing screening endoscopic evaluation. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 895-99.
- Urata J, Yamashita Y, Tsuchigame T, Hatanaka Y, Matsukawa T, Sumi S, et al. The effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunt on portal hypertensive gastropathy. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 1061-7.
- 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; 29: 1358-63.
- Seckin Y, Harputluoglu MM, Batcioglu K, Karıncaoglu M, Yildirir B, Oner RI, et al. Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1154-8.
- Prieto I, Jiménez F, Aller MA, Nava MP, Vara E, Garcia C, et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide: induction of liver megamitochondria in prehepatic portal hypertensive rats. *World J Surg* 2005; 29: 903-38.
- Ohta M, Yamaguchi S, Gotoh N, Tomikawa M. Pathogenesis of portal hypertensive gastropathy: a clinical and experimental review. *Surgery* 2002; 131: S165-S170.
- De Aguilar-Nascimento JE, Caporossi C, Dock-Nascimento DB, de Arruda IS, Moreno K, Moreno W. Oral glutamine in addition to parenteral nutrition improves mortality and the healing of high-output intestinal fistulas. *Nutr Hosp* 2007; 22: 672-6.
- Fontana Gallego L, Sáez Lara MJ, Santisteban Bailón R, Gil Hernández A. Nitrogenous compounds of interest in clinical nutrition. *Nutr Hosp* 2006; 21: 14-27.
- Powell-Tuck J. Nutritional interventions in critical illness. *Proc Nutr Soc* 2007; 66: 16-24.
- Shive W, Snider RN, DuBilier B, Rude JC, Clarke GE, Ravel JO. Glutamine treatment of peptic ulcer. *Texas State J Med* 1957; 53: 840-2.
- Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, et al. Effects of low-level laser therapy (LLL) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 704-13.
- Cattell V, Cook T, Moncada S. Glomeruli synthesise nitrite in experimental nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 1990; 38: 1056-60.
- 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; 247: 3170-5.
- Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
- Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in

- a rat model. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 1985; 248: G618-G625.
25. Abralde JG, Pasarín M, García-Pagán JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6577-84.
 26. Sabra R, Shuman S. Influence of phenobarbital on changes in Na handling, hemodynamics and liver function due to portal vein ligation in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 413: 287-94.
 27. Yokoyama Y, Baveja R, Sonin N, Clemens MG, Zhang JX. Hepatic neovascularization after partial portal vein ligation: novel mechanism of chronic regulation of blood flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G21-G31.
 28. Bayraktar Y, Balkanci F, Uzunalimoglu B, Gokoz A, Koşoğlu T, Batman F, et al. Is portal hypertension due to liver cirrhosis a major factor in the development of portal hypertensive gastropathy? *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 554-8.
 29. Panes J, Casadevall M, Fernandez M, Pique JM, Bosch J, Casamitjana R, et al. Gastric microcirculatory changes of portal-hypertensive rats can be attenuated by long-term estrogen-progestagen treatment. *Hepatology* 1994; 20: 1261-70.
 30. Hung CR, Neu SL. Acid-induced gastric damage in rats is aggravated by starvation and prevented by several nutrients. *J Nutr* 1997; 127: 630-6.
 31. Elia M, Lunn PG. The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man. *Nutrition* 1997; 13: 743-7.
 32. Mauriz JL, Linares P, Macias RI, Jorquera F, Honrado E, Olcoz JL, et al. TNP-470 inhibits oxidative stress, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Free Radic Res* 2003; 37: 841-8.
 33. Villegas I, Martín MJ, La Casa C, Motilva V, Alarcon de la Lastra C. Effects of oxamic acid inhibitors of cyclooxygenase on oxidative stress generation in rat gastric mucosa. A comparative study. *Free Radical Res* 2002; 36: 769-77.
 34. 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 rats. *Hepatology* 1998; 28: 689-94.
 35. Sido B, Seel C, Hochlehnert A, Breitzkreutz R, Dröge W. Low intestinal glutamine level and low glutaminase activity in Crohn's disease: a rationale for glutamine supplementation? *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2170-9.
 36. Değer C, Erbil Y, Giriş M, Yanik BT, Tunca F, Olgaç V, et al. The effect of glutamine on pancreatic damage in TNBS-induced colitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1841-6.
 37. Kinjo N, et al. Significance of ERK nitration in portal hypertensive gastropathy and its therapeutic implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G1016-G1024.
 38. Kawanaka H, et al. Defective mitogen-activated protein kinase (ERK2) signaling in gastric mucosa of portal hypertensive rats: potential therapeutic implications. *Hepatology* 2001; 34: 990-999.
 39. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, et al. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* 2005; 204: 392-401.
 40. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994; 31: 131-43.
 41. Kawanaka H, et al. Activation of eNOS in Rat Portal Hypertensive Gastric Mucosa Is Mediated by TNF- α Via the PI 3-Kinase-Akt Signaling Pathway. *Hepatology* 2002; 35: 393-402.
 42. Kawanaka H. Portal hypertensive gastric mucosa has reduced activation of MAP kinase (ERK2) in response to alcohol injury: a key to impaired healing? *FASEB J* 2001; 15(3): 574-6.
 43. Lopez-Belmonte J, Whittle BJR, Moncada S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 73-8.
 44. Ohta M, Tanoue K, Tarnawski AS, Pai R, Itani RM, Sander FC, et al. Overexpressed nitric oxide synthase in portal-hypertensive stomach of rat: a key to increased susceptibility to damage? *Gastroenterology* 1997; 112: 1920-30.
 45. Hsieh JS, Wang JY, Lin SR, Lian ST, Chen FM, Hsieh MC, et al. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in gastric mucosa of rats with portal hypertension: correlation with gastric mucosal damage. *J Surg Res* 2003; 115: 24-32.
 46. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10480-4.
 47. Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8612-6.
 48. Tarnawski AS, Tomikawa M, Kawanaka H, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Increased oxygen free radicals, nitrotyrosine and enhanced lipid peroxidation in portal hypertensive gastric mucosa: A key to increased susceptibility to injury. *Gastroenterology* 1999; 116: A1282.
 49. Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, González-Gallego J, et al. Glutamine inhibits overexpression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology* 2007; 236: 217-26.
 50. Joe B, Lokesh BR. Studies on the inactivation of superoxide dismutase activity by nitric oxide from rat peritoneal macrophages. *Mol Cell Biochem* 1997; 168: 87-93.

Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy

Marques C *et al.* Glutamine and portal hypertensive gastropathy

Camila Marques, Francielli Licks, Ingrid Zattoni, Beatriz Borges, Luiz Eduardo Rizzo de Souza, Claudio Augusto Marroni, Norma Possa Marroni

Norma Possa Marroni, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-PPG Fisiologia, Universidade Luterana do Brasil, Porto Alegre 90000100, Brazil

Claudio Augusto Marroni, Departamento de Medicina, Interna-Gastroenterologia-Universidade, Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre 90000100, Brazil

Camila Marques, Francielli Licks, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-PPG Fisiologia, Porto Alegre 90000100, Brazil

Beatriz Borges, Luiz Eduardo Rizzo de Souza, Ingrid Zattoni, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81531900, Brazil

Author contributions: Marques C, Licks F, Borges B, Souza LER, Marroni CA and Marroni NP contributed equally to this work; Marroni NP designed the research; Licks F, Marques C, Borges B, Rizzo LE and Zattoni I performed the research; Marques C wrote the manuscript.

Supported by Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE 07284 e 09195), CNPq

Correspondence to: Norma Possa Marroni, PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90000100, Brazil. nmarroni@terra.com.br

Received: December 27, 2011

Revised: March 15, 2012

Accepted: **Published online:**

Abstract

AIM: To investigate the effects of glutamine on oxidative/nitrosative stress and the VEGF-Akt-eNOS signaling pathway in an experimental model of portal hypertension induced by partial portal vein ligation (PPVL).

METHODS: Portal hypertension was induced by partial portal vein ligation (PPVL). The PPVL model consists of a partial obstruction of the portal vein, performed using a 20G blunt needle as a guide, which is gently removed after the procedure. PPVL model was performed for 14 d beginning treatment with glutamine on the seventh day. On the fifteenth day, the mesenteric vein pressure was checked and the stomach was removed to test immunoreactivity and oxidative stress markers. We evaluated the expression and the immunoreactivity of proteins involved in the VEGF-AKT-eNOS pathway by Western blot and immunohistochemical analyses. Oxidative stress was measured by quantification of the cytosolic concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as well as the levels of total glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) activity, nitric oxide (NO) production and nitrotyrosine immunoreactivity.

RESULTS: All data are presented as the mean \pm standard error (SE). The production of TBARS and NO was significantly increased in PPVL animals. A reduction of SOD activity was detected in PPVL+G group. In the immunohistochemical analyses of nitrotyrosine, Akt and eNOS, the PPVL group exhibited significant increases, whereas decreases were observed in the PPVL + G group, but no difference in VEGF was detected between these groups. Western blot analysis detected increased expression of IP3K, P-Akt and eNOS in the PPVL group compared with the PPVL + G group, which was not observed for the expression of VEGF when comparing these groups. Glutamine administration markedly alleviated oxidative/nitrosative stress, normalized SOD activity, increased levels of total glutathione (GSH) and blocked NO overproduction as well as the formation of peroxynitrite.

CONCLUSION: Glutamine treatment demonstrated to reduce oxidative damage but does not reduce angiogenesis induced by PH in gastric tissue, demonstrating a beneficial role for the IPK3-Akt-eNOS pathway.

Key words: Partial portal vein ligation; Oxidative stress; Glutamine; Portal hypertension; Rats

Peer reviewers: Dr. Mohamed Hassan, University Hospital of Duesseldorf, Mooren Street 5, Duesseldorf 40225, Germany; Dr. Naoaki Sakata, Division of Hepato-Biliary Pancreatic Surgery, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan

Marques C, Licks F, Borges B, Souza LER, Marroni CA, Marroni NP, Rizzo LE, Zattoni I. Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy.

World J Gastroenterol 2012;

Available from:

DOI:

INTRODUCTION

Portal hypertension (PH) is a clinical syndrome that is usually secondary to obstruction of the intra- or extra-hepatic portal flow. It is considered the main complication of liver disease, being responsible for the development of other liver diseases, such as portal hypertensive gastropathy, ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome, hepatopulmonary syndrome, portopulmonary hypertension, hyperkinetic syndrome and hepatic encephalopathy [1].

PH is characterized by an increase in pressure above 5 mmHg in the portal venous system. When the pressure reaches 8 to 10 mm Hg, in the esophagus and stomach, gastroesophageal varices arise, which develop from a network of collateral circulation through the vessels that form the splanchnic circulation. Bleeding from gastroesophageal varices can occur when the portal pressure gradient reaches values above 12 mmHg [2-4].

Numerous veins dilate, including the hemorrhoidal plexus, abdominal wall and esophagogastric junction. The umbilical vein communicates with and dilates the superficial veins of the abdominal wall, and the presence of abdominal collateral circulation is an important clinical sign of portal hypertension, which is characterized by dilated and tortuous veins radiating from the navel to the upper abdomen and lower chest [5, 6]. Collateral circulation of the left gastric vein to the azygos vein is responsible for esophagogastric varicose veins and increased circulation in the gastric mucosa, which characterize the complications of portal hypertension referred to as portal hypertension gastropathy (PHG) [5].

The vascular endothelium releases vasodilators, including nitric oxide (NO) and prostacyclins, and vasoconstrictors, including endothelin, angiotensin and thromboxane. The function of vascular tone is maintained by balancing these agents. The increased peripheral resistance is maintained by elevation of vasoconstrictors or vasodilators or by reducing the levels of both. The blood exerts a force against endothelial cells, which are the main agonist in the release of NO [7].

Increases in NO synthesis have also been reported in the liver of rats with PH. Moreover, NO production has been implicated in the pathogenesis of PHG, with increases in NO serum levels being detected in patients with PHG [5]. When present in high concentrations, NO acts as a free radical, forming two molecules of dinitrogen trioxide (N₂O₃) or peroxynitrite (ONOO), which are responsible for cytotoxic effects such as inflammation and septic shock. Recently, NO has been presented as an important signal of the maintenance of homeostasis, as well as a

cytotoxic agent involved in numerous diseases [8-10].

Increased formation of blood vessels in the splanchnic region occurs through the process of angiogenesis, which is involved in the maintenance of hyperdynamic circulation in portal hypertension. This hypothesis is based on recent studies that demonstrate the presence of increased splanchnic angiogenesis and neovascularization, which are responsible for the formation of portosystemic collaterals in experimental models of PH [11]. The stimulus for the proliferation of new blood vessels occurs through a complex cascade of angiogenic events, and it is the main modulator of this mechanism, vascular endothelial growth factor, VEGF, that stimulates the proliferation and migration of endothelial cells. Overproduction of NO is stimulated by eNOS, which can be stimulated by both VEGF and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). In turn, PI3K-Akt also receives stimulation through the VEGF pathway, and the shear stress that occurs in PH can be a factor in stimulation *via* PI3K-Akt as well [12-14]. The Akt protein directly stimulates eNOS by increasing the capacity of eNOS to generate NO. There are several ways to stimulate the Akt pathway, including through growth factors, cytokines and the mechanical force of shear stress in a blood vessel, which activates the NO release mechanism in a PI3K-dependent manner [15,16]. Overproduction of vascular NO plays a central role in both systemic and splanchnic vasodilations, which are characteristics of portal hypertension that cause it to be recognized as a major complication of liver cirrhosis. The increased expression and activity of eNOS are well-established events in chronic models of portal hypertension [17,18].

Glutamine, a nonessential amino acid, has received increasing attention because it becomes essential during stress and catabolic conditions [19]. Glutamine administration can result in an enhanced antioxidant capacity in various situations, such as critical illness or sepsis [20]. In the stomach, glutamine is able to protect against peptic ulceration and improves the healing of ulcers [21]. The present study was designed to investigate the potential beneficial effects of glutamine administration on gastric oxidative stress and to evaluate the role of the VEGF-PI3K-Akt-eNOS pathway in NO overproduction in an experimental model of PHG.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

All animals received humane care according to the criteria outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences and published

by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23, revised 1985).

Animals and experimental groups

Male Wistar rats with a mean weight of 250 g were used. The animals were obtained from the Center for Breeding of Laboratory Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul. The rats were held in cages at 20°C -24°C with a 12 h light/dark cycle and given free access to food and water. They were randomly divided into the following four groups of fourteen animals each: (1) [sham-operated (SO) rats receiving only NaCl as a vehicle]; (2) SO+G (SO rats receiving glutamine); (3) PPVL (PPVL rats receiving vehicle); and (4) PPVL+G (PPVL rats receiving glutamine).

Partial partial portal vein ligation and sham operation

During the procedure, rats were anesthetized with a ketamine (Ketalar, Parke Davis, 100 mg/kg) and xylazine 2% (Rompun, Bayer, 50 mg/kg) cocktail i.P. PH was induced by partial portal vein ligation (PPVL) as described by Moreira *et al* [22]. Briefly, the portal vein was isolated, and a 3-0 silk ligature was tied around both the portal vein and an adjacent 20 gauge blunt-tipped needle. The needle was subsequently removed, and the vein was allowed to re-expand. The abdomen was then closed, and the animal was allowed to recover. Control rats underwent a similar operation but without ligation of the portal vein. Sham-operated animals received only vehicle (NaCl, 1 mL/kg, i.g.). Glutamine was administered daily (14 mg/kg, daily, i.g.) for 7 d beginning on the eighth day after the surgical protocol. All rats were anesthetized and sacrificed on the fifteenth day of the protocol. Their stomachs were immediately removed and divided into four subsamples that were stored in a freezer at -80°C for analysis of oxidative stress, total glutathione, immunohistochemistry and Western blotting.

Oxidative stress determinations

Gastric oxidative stress was determined by measuring the concentration of aldehydic products (TBARS). Briefly, the frozen tissue was homogenized in a solution containing 140 mmol KCl and 20 mmol phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 14000 ×g for 10 min. For TBARS analysis, the amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was measured *via* the thiobarbituric acid reaction using 3 mg of protein per sample. The samples were incubated at 90°C for 30 min following the addition of 500 mL of 0.37% thiobarbituric acid in 15%

trichloroacetic acid and then centrifuged at 2000 ×g for 15 min. The spectrophotometric absorbance of the supernatant was determined at 535 nm^[23].

Nitric oxide quantification

Nitric oxide production in the gastric tissue was measured indirectly using a quantitative colorimetric assay based on the Griess reaction. This method is sensitive for both nitrite and nitrate ions^[24]. Briefly, the samples were deproteinized and subsequently centrifuged for 20 min at 12000 ×g. After incubation of the supernatants with *E. coli* nitrate reductase (37°C, for 30 min) to convert nitrates to nitrites, 1 mL of Griess reagent (0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfonylamide, 25% phosphoric acid) was added. The reaction was allowed to proceed at room temperature for 20 min, after which the absorbance at 546 nm was measured using a sodium nitrate solution as a standard.

Antioxidant enzyme activities

Cytosolic superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assayed spectrophotometrically based on the rate of epinephrine autooxidation, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate; the amount of enzyme that results in 50% of the maximum inhibition of autooxidation is defined as 1 unit of SOD activity^[25]. For analysis of GSH and GSSG, the livers were homogenized with 5% (w/v) metaphosphoric acid. After centrifugation (16000 ×g for 2 min), the tissue homogenate was assessed spectrophotometrically (415 nm) in a microplate reader employing a modified version of the 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) [DTNB, Sigma]/GSSG reductase (Sigma) recycling method using the 43 N-ethylmaleimide (NEM, Fluka) conjugating sample preparation technique for GSSG. Samples (10 L) for both GSH and GSSG determination were assayed in 96-well polystyrene plates (Corning) at 37°C in the presence of 10 mmol DTNB, 0.17 mm β-NADPH (Sigma, dissolved in 0.5% (w/v) NaHCO₃ as a Stabilizing agent) and 0.5 U/mL GSSG reductase.

Western blot analysis

The technique used for this measurement was protein expression by Western blot analysis employing the system described by Laemmli *et al*^[27] for electrophoresis and the blotting technique described by Towbin and colleagues^[28]. Proteins (80 g) were separated in a

10%-15% polyacrylamide gel and transferred electrically to polyvinylidene difluoro membranes (Millipore, Bedford, MA, United States). Subsequently, the membranes were placed in Tris/saline-tamponade/Tween-20 blocking solution (TBST-5% milk powder in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20) for 60 min at 37°C. The membrane was incubated overnight at 4°C with polyclonal eNOS and VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States), P-Akt and PI3K (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States). Thereafter, the membranes were washed with TBST and incubated for one hour at room temperature with an anti-rabbit immunoglobulin antibody coupled to HRP (SIGMA, Glostrup, Denmark). The proteins were detected by chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), and the density of specific bands was quantified using a densitometer image (ImageJ, United States).

Immunohistochemistry

Tissues sections (4 m) soaked in a formalin fixative and embedded in paraffin were subjected to immunohistochemical analysis [29]. This technique consisted of the following steps: deparaffinization, rehydration, antigen retrieval, inactivation of endogenous peroxidase and blocking of nonspecific reactions. The samples were incubated with the primary antibody for 12 h at 4°C using the specific dilution of each antibody indicated in the instructions. After we applied the streptavidin-biotin complex (LSAB, DAKO) using a diaminobenzidine revelation tetrahydrochloride Kit (DAB, DAKO) and the samples were counterstained with hematoxylin. The antibodies used in the gastric mucosa samples were eNOS and VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States), AKT (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States) and NTT (Sigma, United States).

Statistical analysis

The data were calculated and analyzed using ANOVA. A post-hoc multiple comparisons test was performed using the Student Newman-Keuls test. Values were considered significant when $P < 0.05$. All calculations were performed using the statistical program Graphpad Prism, version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, United States).

RESULTS

Markers of oxidative stress

The cytosolic concentration of TBARS increased in PPVL group, compared to SO. And decrease significantly on PPVL+G group compared to PPVL. Glutamine administration was effective in diminishing TBARS production (Figure 1A).

Nitric oxide levels

The concentrations of nitrites in the gastric tissue (Figure 1B), the values were significantly higher in PPVL group compared to SO. Moreover, nitrite concentrations were similar to PPVL+G and SO groups. This parameter was restored to baseline levels in animals PPVL receiving glutamine.

Antioxidant enzyme activities

Analysis of antioxidant enzyme activities showed that portal vein ligation induced a considerable reduction of gastric SOD in PPVL group compared to SO, SO+G and PPVL+G. Glutamine treatment increased SOD activity and GSH activity (Figure 1C) on PPVL+G group.

Western blot analysis

Analyses of the protein expression of IPK3 (Figure 4B), P-Akt (Figure 4A) and eNOS (Figure 2A) showed that there was reduced expression in the PPVL + G group compared with the PPVL group. This effect was not observed for the expression of VEGF (Figure 2B), for which a significant increase was observed in the PPVL group compared with the SO group, although no reduction was observed when compared with the PPVL + G group.

Immunohistochemistry

Analyses of the reactivity of the eNOS (Figure 3A), Akt (Figure 3C) and NTT (Figure 3D) proteins in the gastric mucosa of rats showed that there was reduced expression in the PPVL+G group compared with the PPVL group. This effect was not observed for the expression of VEGF (Figure 3B), for which a significant increase was observed in the PPVL group compared with the SO group, although no reduction was observed when compared with the PPVL + G group.

DISCUSSION

PHG is recognized as a clinical condition in PHI, but the exact pathogenesis of PHG is still

unclear. The PPVL model has been extensively studied and found to be a useful tool for understanding the pathophysiology of PHI and PHG. This model has been developed in different animal species, such as rats, mice and rabbits, and it is presently accepted to be suitable for investigating the pathogenesis of PHI and PHG because it is highly reproducible and easy to perform, and portal hypertension develops very rapidly. The model used in our study is characterized by prehepatic portal hypertension with maintenance of hepatic structure, hyperdynamic circulation and portal-systemic shunting. Treatment of portal hypertension to prevent complications, particularly gastrointestinal bleeding, is of fundamental importance and occurs under three clinical scenarios: prevention of first bleeding (primary prophylaxis), treatment after an episode of bleeding and prevention of secondary bleeding (secondary prophylaxis). These treatments can be performed using vasoconstrictors, which reduce portal venous flow; vasodilators, which reduce intrahepatic resistance; or a combination of both treatments [30].

Treatment using chemicals or natural products that would prevent complications of PH would represent a significant advance in therapy and could be a way to decrease mortality. Development of experimental models exhibiting pathogenic characteristics similar to those of human disease may help in understanding the mechanisms of portal hypertension and allow testing of new therapeutic modalities. Thus, an experimental model of PH was employed in this study and has contributed to improving our understanding of the pathophysiological conditions presented in humans. PH may be triggered by various agents, leading to cirrhosis. A study assessing the damage caused by oxidative stress in the gastric mucosa showed that there was an increase of LPO and decreases in the levels of the enzymes SOD, CAT and GPx in injured animals, suggesting that oxidative stress is involved in gastric tissue damage [31]. When we assessed lipid peroxidation in the stomachs of rats, an increase in the level of substances reacting with thiobarbituric acid (TBA-RS) was detected in the PPVL group compared with the SO group, which is suggested to be related to increased oxidative stress. This conclusion was supported by the amounts of TBA-RS observed in the PPVL + G group compared with the PPVL group. Similar results have been shown in other studies that used the flavonoid quercetin and NAC, suggesting that the amino acid glutamine exhibits antioxidant potential [32]. In the present study, glutamine reduced submucosal edema and vasodilation as well as reducing lipid peroxidation in homogenized stomachs from animals in the PPVL + G group. Glutamine, as a potential antioxidant, appears to protect the gastric mucosa and decrease

oxidative damage to the gastrointestinal tract, which was observed both in this study and in previous studies of colitis employing glutamine [33].

The enzyme superoxide dismutase (SOD), which is responsible for the dismutation of superoxide anion radicals into hydrogen peroxide, is the first line of defense against cellular oxidative stress. The SOD activity determined in the gastric mucosa in a study of patients with liver disease showed that this enzyme is found at reduced levels in these patients compared with control subjects with cirrhosis. However, individuals with chronic liver disease showed no significant changes in the levels of SOD. In liver diseases such as hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma, there are high levels of LPO in the stomach, suggesting involvement of oxidative stress in gastric mucosal lesions in these liver diseases [34]. Studies relate the decrease in SOD enzyme activity to increased oxidative stress [35, 36]. In the present study, we observed a decrease in SOD activity in the PPVL group compared with other groups, which could be related to the inactivation of superoxide anions, as this enzyme was acting in the dismutation of EAOS and the formation of H₂O₂. In contrast, animals in the PPVL +G group maintained values of SOD enzyme activity similar to controls. This increased activity of SOD in the PPVL group was due to the increased formation of EAOS, causing oxidative stress. Total glutathione (GSH) has a special physiological importance because glutamine serves as a substrate for glutathione formation. Studies have demonstrated the direct involvement of GSH in colitis [37]. A relationship was shown with glutathione colitis, in which rats with experimental colitis caused by TNBS showed a significant decrease in the level of glutathione compared with the control group [38].

In the evaluation of NO metabolites in stomach homogenates, we observed a reduction in the production of these metabolites in the PPVL+G group compared to the PPVL group. This increase in NO production in the PPVL group can be explained by the process of angiogenesis, which occurs in this model for the purpose of shunting of blood from the obstructed area to the systemic circulation. Moreover, these increased levels of nitric oxide could be reacting with superoxide anions to form peroxynitrite radicals, which are extremely harmful. This NO release becomes more pronounced due to the need for the formation of new blood vessels so that blood can reach the systemic circulation, triggering an increase in RL, thus stimulating lipid peroxidation and oxidative stress [39].

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of PH because in association with the overproduction of superoxide anions and nitric oxide observed in the model of partial

portal vein ligation, peroxynitrite formation occurs. Researchers have noted specific actions of ONOO as a modulator of intracellular signaling pathways regulating inflammatory responses, including induction of angiogenesis and vascular endothelial growth factor (VEGF).

The significant reduction of lipid peroxidation observed in animals in the PPVL + G group demonstrates effective action of the glutamine in the process of lipid peroxidation. This result is consistent with the expected capacity of glutamine in the formation of inactivating EAOS, especially in reducing the formation of peroxynitrite. Peroxynitrite reacts with free tyrosine and tyrosine residues in protein molecules to produce nitrotyrosine. Alternatively, EAOS can activate tyrosine to form tyrosyl, a radical that in turn oxidizes NO to produce nitrotyrosine (NTT) [40, 41]. The generation of peroxynitrite was assessed based on the level of expression and immunoreactivity of NTT, with significant reductions being observed for both parameters in animals in the PPVL + G group, demonstrating the effectiveness of glutamine with respect to the oxidative/nitrosative damage that occurs in the gastric mucosa.

Upregulation of eNOS initiates the post-translational level mediated by Akt, which increases its activity at any concentration of cytosolic Ca^{2+} [42]. During early cirrhosis, this pathway is stimulated by different types of stimuli, such as VEGF, inflammatory cytokines and mechanical shear forces [42]. In advanced stages of portal hypertension, bacterial translocation also activates eNOS *via* tumor necrosis factor, increasing tetrahydrobiopterin, which is an essential element that acts as a cofactor of the enzyme. According to several studies, other mechanisms, such as changes in the subcellular localization of eNOS [43], S-nitrosylation [44] or degradation of asymmetrical dimethylarginine, may be involved in regulating the activity of eNOS [45]. We observed in this study that glutamine reduced eNOS protein expression and the immunoreactivity of the enzyme in the gastric mucosa of animals in the PPVL + G group. One explanation for this finding is that glutamine, due to its involvement in NO synthesis, is involved in reduction of the cytosolic levels of Ca^{2+} , which is related to the levels of Akt; in turn, Akt levels are stimulated by mechanical stress shear. Throughout this process, this hemodynamic mechanism would be inhibited due to reduced levels of NO triggered by the action of glutamine.

Angiogenesis is characterized by the formation of new vascular structures and a pathophysiological phenomenon that has been further investigated in recent years due to the critical role it plays in the pathogenesis of disease and its potential as a therapeutic target. Additionally, angiogenesis contributes to a number of physiological processes, such as wound

healing and the reproductive cycle [46]. NO released by dilation and increased vascular permeability as well as the migration, proliferation and survival of endothelial cells plays a crucial role in angiogenesis. Many molecules have been implicated as modulators of the angiogenic process, such as tumor necrosis factor, interleukins, angiopoietins and growth factors, including VEGF. Indeed, VEGF stimulates NO production by NOS, increasing vascular permeability and the proliferation and survival of endothelial cells [47].

Furthermore, overproduction of peroxynitrite (ONOO), which is formed by the reaction of superoxide anions and nitric oxide, is observed under inflammatory conditions [48], whereas cytotoxic actions of ONOO have been reported *via* the modulation of intracellular signaling pathways that regulate inflammatory responses, including induction of angiogenesis and increased levels of VEGF. Studies in the retina of rats with diabetes induced by streptozotocin demonstrated the formation of nitrotyrosine and increased effects regarding stimulation of VEGF. These conditions have been studied because they induce the generation of reactive oxygen species (ROS). EAOS are involved in triggering the overexpression of VEGF in various cell types [49,50], but the molecular mechanisms underlying this effect remain to be elucidated. Studies in patients, in animals and *in vitro* indicate that formation of nitrotyrosine, a marker of ONOO, is associated with increased VEGF expression during diabetic microvascular disease, atherosclerosis and tumor angiogenesis [51, 52]. In addition, studies using a cultured cell line showed that formation of ONOO stimulates an increase in VEGF [53]. In the present study, we observed increased expression and immunoreactivity of VEGF in animals in the PPVL group, but there was no significant reduction of these parameters in animals in the PPVL + G group. We suggest that these results demonstrate direct action of glutamine on NO synthesis to reduce its levels, rather than only affect the action of growth factors and the associated cascade of events.

VEGF also acts by stimulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), which activates eNOS in an Akt-dependent manner, resulting in activation of eNOS and increased NO production. PI3K phosphorylates Akt, which can rapidly activate eNOS [54]. The Akt pathway has emerged as a signaling pathway in all cells of higher eukaryotes, and Akt has been found to be one of the most important and versatile kinases for understanding human physiology and disease. Recent studies have been performed to elucidate the molecular details of the regulation of Akt and its role in human disease. The NO released due to eNOS stimulation is involved in vasodilation, vascular remodeling and angiogenesis [55]. The Akt signaling pathway also leads

to increased production of transcription factors induced by hypoxia (HIF1 α and HIF2 α), partly through the activation of an mTOR-dependent mechanism [56]. The activation of eNOS through Akt/B kinase leads to increased NO production, vasodilatation and increased splanchnic circulation [57]. Akt activation occurs due to an increase in shear stress-induced endothelial disruption, although other mechanisms may be involved [58].

In this study, we observed a significant increase in the expression and immunoreactivity of Akt in the PPVL group and a reduction in these parameters in the PPVL+G group. These results can be explained by the role that glutamine plays in the production of NO, which in turn, triggers a chain reaction, is overproduced and dilates the splanchnic vessels, gradually increasing shear stress, which is the mechanical stimulus for the activation of Akt. In addition, it was observed that VEGF levels are unchanged in the PPVL + G group compared to the PPVL group, and the VEGF RTK pathway acts as a means for the release of PIK3, eNOS and P-Akt, leading to the production of more NO, which is a feature present in the hyperdynamic circulation associated with PH. Therefore, glutamine acts to mitigate this situation not by reducing the levels of NO *via* VEGF, but by reducing the shear stress triggered by NO synthesis through inhibition of L-arginine, thereby reducing the levels of Akt, which is stimulated by mechanical stress in blood vessels. In conclusion, we describe the beneficial effects of glutamine treatment on oxidative stress, including reduced portal pressure, normalization of SOD and reduction of NO production by eNOS, mediated by the PI3K-Akt-eNOS pathway. VEGF levels tended to decrease, although this trend was not found to be statistically significant.

COMMENTS

Background

Portal hypertension (PH) is the main complication of cirrhosis and is through its development is arising other liver diseases. Among them we mention the gastropathy of portal hypertension, which is characterized by the development of hyperdynamic splanchnic circulation. The main modulator of this process is nitric oxide release and their pathways in the pathophysiology of PH is still being studied. As there is no effective treatment forhp, it was decided to study the role of glutamine, an amino acid that has been used in the treatment of colitis, the clinic and evaluate its involvement both in oxidative stress, as in the intracellular stimulus for release nitric oxide (NO).

Research frontiers

Studies are relevant in clinical hypertension, especially in hepatology. In addition, PH may be associated with other diseases such as schistosomiasis and budd-chiari syndrome. Therefore, the study of PH has a great clinical relevance for gastroenterology, since there is still no effective therapeutic treatment.

Innovations and breakthroughs

There are numerous studies using the experimental model of partial portal vein ligation, with which it mimics the complications of PH. Have been evaluated for treatment of other molecules such as PH, quercetin and NAC. The results were similar with glutamine to these molecules, but there is when the comparative results on the role of intracellular pathways.

Applications

These results suggest that the amino acid glutamine is a molecule with therapeutic potential and can be used in the treatment of portal hypertension, reducing damage to the gastric mucosa caused by hypertension portal gastropathy.

Terminology

Portal hypertension is characterized by increased vascular resistance and/or blood splanchnic flow. Glutamine: Essential amino acid involved in several cellular functions, among them acting as a substrate for the synthesis of antioxidants such as glutathione. Gastropathy of portal hypertension: clinical syndrome secondary to cirrhosis, which is characterized by the formation of edema and dilation of gastric submucosal tissue.

Peer review

This is a quantitative study, in which the authors analyze the antioxidant effect and the possible involvement of glutamine in the gastric mucosa in an animal model of PH. The results are interesting and show that this molecule may have therapeutic potential in treatment of gastric mucosal lesions triggered by PH.

REFERENCES

- 1 **Fernandez M**, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004; **126**: 886-894 [PMID: 14988842 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.12.012]
- 2 **Pugh RN et al.** Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*, 1973. **60**(8): P. 646-9.
- 3 **Garcia-Tsao G**, Groszmann RJ, Fisher RL, Conn HO, Atterbury CE, Glickman M. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. *Hepatology* ; **5**: 419-424 [PMID: 3873388]
- 4 **Wright AS**, Rikkers LF. Current management of portal hypertension. *J Gastrointest Surg* 2005. **9**(7): P. 992-1005.
- 5 **Rahimi RS**, Rockey DC. Complications of cirrhosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; : [PMID: 22343347]
- 6 **Bernardi M**, Trevisani F. Systemic and regional hemodynamics in pre-ascitic cirrhosis. *J Hepatol* 1997; **27**: 588-591 [PMID: 9314140 DOI: 10.1016/S0168-8278(97)80367-4]
- 7 Mattos, A.A. and . Mattos, A.Z, Tratado de Hepatologia. 2010, Rio de Janeiro: Rubio.
- 8 **Farias-Silva E**, Cola M, Calvo TR, Barbastefano V, Ferreira AL, De Paula Michelatto D, Alves de Almeida AC, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Brito AR. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Planta Med* 2007; **73**: 1241-1246 [PMID: 17973201 DOI: 10.1055/s-2007-981613]
- 9 **Halliwell B**, Gutteridge J. Free radical and biology and medicine. 2007 New York: Oxford.
- 10 **Reichen J**, Lebrech D. The future treatment of portal hypertension. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; **21**: 191-202 [PMID: 17223505 DOI: 10.1016/j.bpg.2006.07.006]
- 11 **Rodríguez-Vilarrupla A**, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC. Current concepts on the pathophysiology of portal hypertension. *Ann Hepatol* ; **6**: 28-36 [PMID: 17297426]
- 12 **Papazian A**, Braillon A, Dupas JL, Sevenet F, Capron JP. Portal hypertensive gastric mucosa: an endoscopic study. *Gut* 1986; **27**: 1199-1203 [PMID: 3781334]
- 13 **Payen JL**, Calès P, Voigt JJ, Barbe S, Pilette C, Dubuisson L, Desmorat H, Vinel JP, Kervran A, Chayvialle JA. Severe portal hypertensive gastropathy and antral vascular ectasia are distinct entities in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1995; **108**: 138-144 [PMID: 7806035]
- 14 **Primignani M**, Carpinelli L, Preatoni P, Battaglia G, Carta A, Prada A, Cestari R, Angeli P, Gatta A, Rossi A, Spinzi G, De Franchis R. Natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis. The New Italian Endoscopic Club for the study and treatment of esophageal varices (NIEC). *Gastroenterology* 2000; **119**: 181-187 [PMID: 10889167]
- 15 **Dimmeler S**, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; **399**: 601-605 [PMID: 10376603]
- 16 **Fulton D**, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; **399**: 597-601 [PMID: 10376602]
- 17 **Xu DL**, Martin PY, St John J, Tsai P, Summer SN, Ohara M, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. *Am J Physiol* 1996; **271**: R1739-R1745 [PMID: 8997377]
- 18 **Niederberger M**, Ginés P, Martin PY, Tsai P, Morris K, McMurtry I, Schrier RW. Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. *Hepatology* 1996; **24**: 947-951 [PMID: 8855203]

- 19 **Fontana Gallego L**, Sáez Lara MJ, Santisteban Bailón R, Gil Hernández A. Nitrogenous compounds of interest in clinical nutrition. *Nutr Hosp* 2006; **21 Suppl 2**: 14-27, 15-29 [PMID: 16771070]
- 20 **Powell-Tuck J**. Nutritional interventions in critical illness. *Proc Nutr Soc* 2007; **66**: 16-24 [PMID: 17343768]
- 21 **SHIVE W**, SNIDER RN, DUBILIER B, RUDE JC, CLARK GE, RAVEL JO. Glutamine in treatment of peptic ulcer; preliminary report. *Tex State J Med* 1957; **53**: 840-842 [PMID: 13486539]
- 22 **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; **68**: 1939-1946 [PMID: 15476665]
- 23 **Buege JA**, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; **52**: 302-310 [PMID: 672633]
- 24 **Granger DL**, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 1999; **301**: 49-61 [PMID: 9919553]
- 25 **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; **247**: 3170-3175 [PMID: 4623845]
- 26 **Flohé L**, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 114-121 [PMID: 6727659]
- 27 **Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685 [PMID: 5432063]
- 28 **Towbin H**, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 4350-4354 [PMID: 388439]
- 29 **Gaffey MJ**, Mills SE, Swanson PE, Zarbo RJ, Shah AR, Wick MR. Immunoreactivity for BER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol* 1992; **16**: 593-599 [PMID: 1599037]
- 30 **Segawa M**, Sakaida I. Diagnosis and treatment of portal hypertension. *Hepatol Res* 2009; **39**: 1039-1043 [PMID: 19796043]
- 31 **Seckin Y**, Harputluoglu MM, Batcioglu K, Karıncaoglu M, Yildirim B, Oner RI, Uyumlu B, Aydogdu N, Hilmioğlu F. Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 1154-1158 [PMID: 17345161]
- 32 **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; **41**: 759-765 [PMID: 12738181]
- 33 **Marques C**, Mauriz JL, Simonetto D, Marroni CA, Tuñón MJ, González-Gallego J, Marrón NP. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. *Ann Hepatol* ; **10**: 531-539 [PMID: 21911895]
- 34 **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; **78**: 289-309 [PMID: 1335597]
- 35 **Hodgson EK**, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* 1975; **14**: 5299-5303 [PMID: 172122]
- 36 **Santiard D**, Ribiére 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; **19**: 121-127 [PMID: 7635354]

- 37 **Pravda J.** Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 2371-2384 [PMID: 15832404]
- 38 **Ardite E**, Sans M, Panés J, Romero FJ, Piqué JM, Fernández-Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 2000; **80**: 735-744 [PMID: 10830784]
- 39 **La Villa G**, Gentilini P. Hemodynamic alterations in liver cirrhosis. *Mol Aspects Med* ; **29**: 112-118 [PMID: 18177931]
- 40 Halliwell, B. and J. Gutteridge, Free radical and biology and medicine. 2007, New York: Oxford. [ISBN: 0198500459]
- 41 **Eiserich JP**, Butler J, van der Vliet A, Cross CE, Halliwell B. Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals. *Biochem J* 1995; **310 (Pt 3)**: 745-749 [PMID: 7575405]
- 42 **Shah V**, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999; **117**: 1222-1228 [PMID: 10535886]
- 43 **Iwakiri Y**, Tsai MH, McCabe TJ, Gratton JP, Fulton D, Groszmann RJ, Sessa WC. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **282**: H2084-H2090 [PMID: 12003815]
- 44 **Wiest R**, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 2003; **38**: 1508-1515 [PMID: 14647062]
- 45 **Fulton D**, Babbitt R, Zoellner S, Fontana J, Acevedo L, McCabe TJ, Iwakiri Y, Sessa WC. Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt- versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release. *J Biol Chem* 2004; **279**: 30349-30357 [PMID: 15136572]
- 46 **Erwin PA**, Mitchell DA, Sartoretto J, Marletta MA, Michel T. Subcellular targeting and differential S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2006; **281**: 151-157 [PMID: 16286475]
- 47 **Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; **9**: 653-660 [PMID: 12778163]
- 48 **Beckman JS**, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; **271**: C1424-C1437 [PMID: 8944624]
- 49 **Khatri JJ**, Johnson C, Magid R, Lessner SM, Laude KM, Dikalov SI, Harrison DG, Sung HJ, Rong Y, Galis ZS. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation* 2004; **109**: 520-525 [PMID: 14744973]
- 50 **Gao N**, Shen L, Zhang Z, Leonard SS, He H, Zhang XG, Shi X, Jiang BH. Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Mol Cell Biochem* 2004; **255**: 33-45 [PMID: 14971644]
- 51 **Ceriello A**, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, Berrino L, Rossi F, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 2002; **51**: 1076-1082 [PMID: 11916928]
- 52 **Turko IV**, Murad F. Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 2002; **54**: 619-634 [PMID: 12429871]
- 53 **Konopka TE**, Barker JE, Bamford TL, Guida E, Anderson RL, Stewart AG. Nitric oxide synthase II gene disruption: implications for tumor growth and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res* 2001; **61**: 3182-3187 [PMID: 11306506]
- 54 **Dimmeler S**, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 1998; **9**: 697-698 [PMID: 9889419]

55 **Morbidelli L**, Donnini S, Chillemi F, Giachetti A, Ziche M. Angiosuppressive and angiostimulatory effects exerted by synthetic partial sequences of endostatin. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 5358-5369 [PMID: 14614021]

56 **Semenza GL**. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 721-732 [PMID: 13130303]

57 **Tsai MH**, Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mesenteric vasoconstriction triggers nitric oxide overproduction in the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1452-1461 [PMID: 14598261]

58 **Chen YC**, Ginès P, Yang J, Summer SN, Falk S, Russell NS, Schrier RW. Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 2004; **39**: 1075-1087 [PMID: 15057912]

S-Editor Gou SX **L-Editor** **E-Editor**

Figure 1A

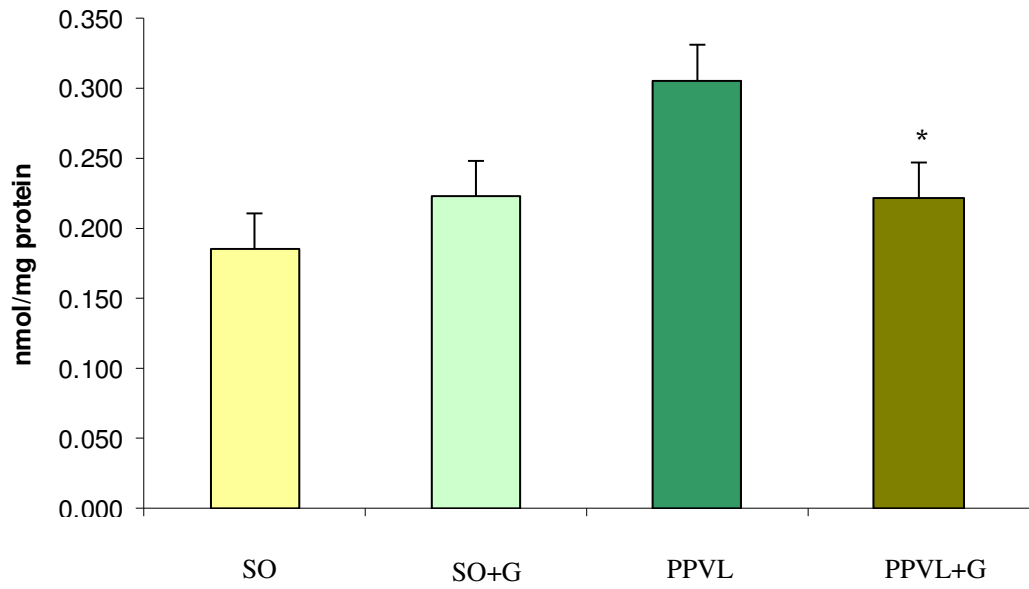


Figure 1B

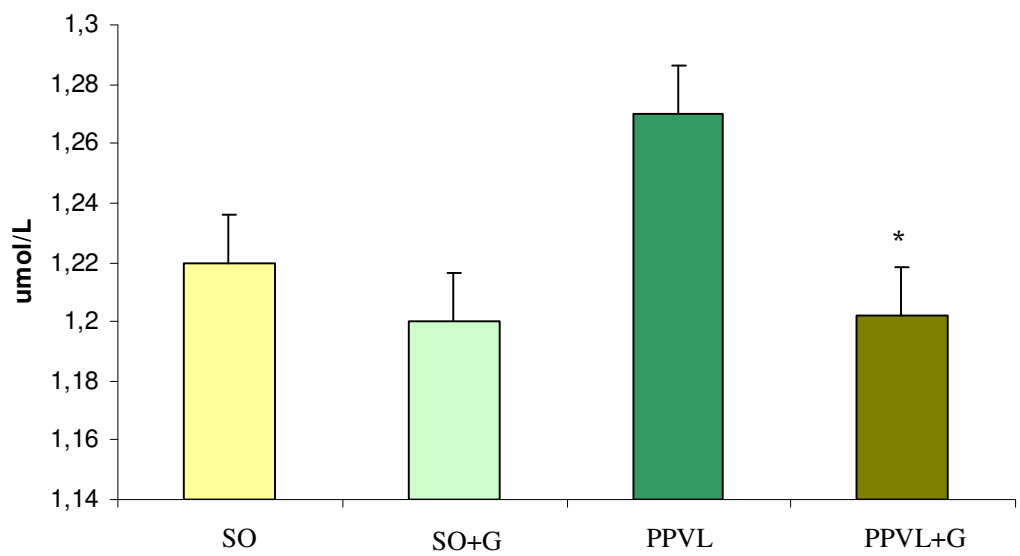
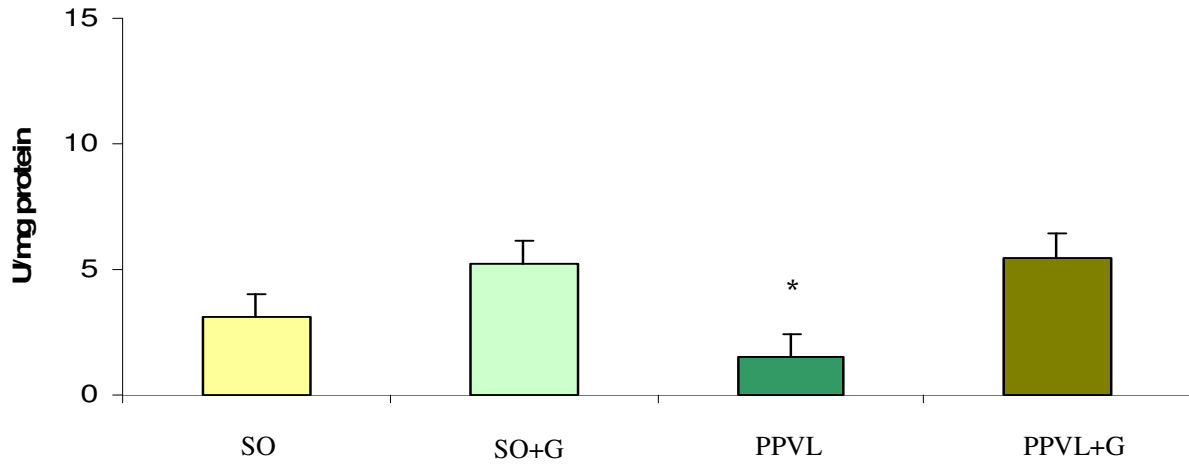


Figure 1C

1



2

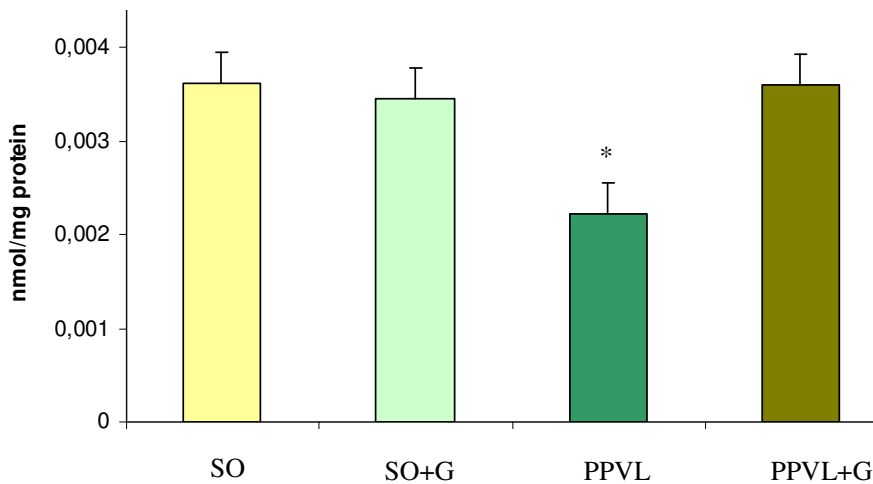


Figure 1 Effect of partial portal vein ligation and glutamine administration on gastric oxidative stress, nitric oxide production, antioxidant enzyme activities. A: Effect of partial portal vein ligation and glutamine administration on gastric oxidative stress; B: Effect of partial portal vein ligation and glutamine administration on gastric nitric oxide production; C: Effect of partial portal vein ligation and glutamine administration on gastric antioxidant enzyme activities: (1) SOD activity; (2) GSH activity. TBARS concentration. Values are the mean \pm SE

for 14 rats. ^a*P* < 0.05 *vs* the sham-operated group. PPVL: Partial portal vein ligation; G: Glutamine; SOD: Superoxide dismutase; GSH: Glutathione; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; SO: Sham-operated.

Figure 2A

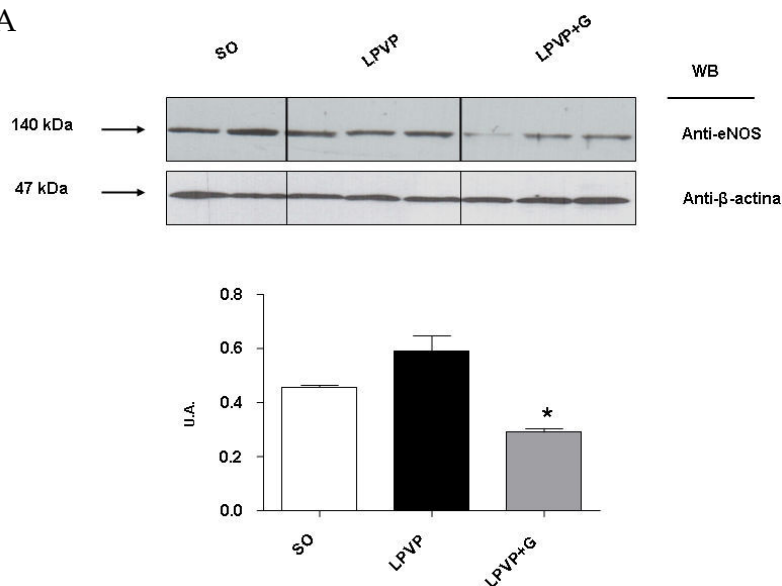


Figure 2B

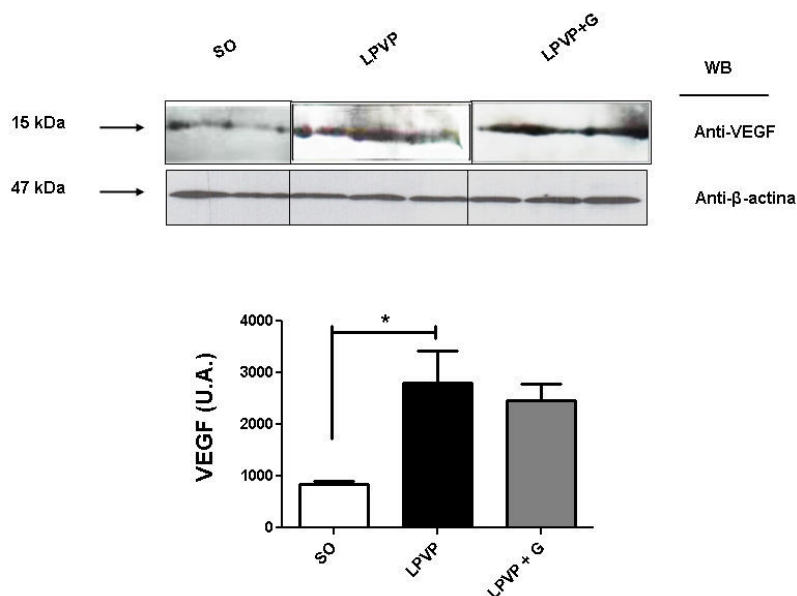
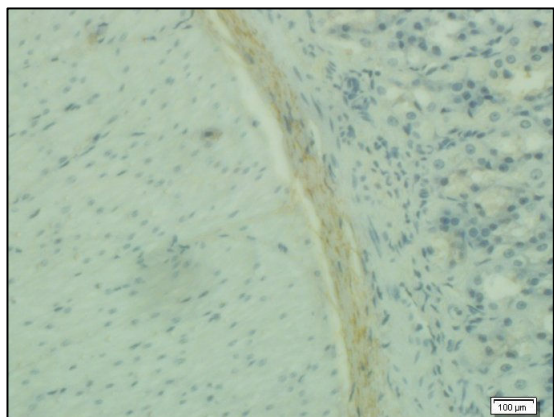
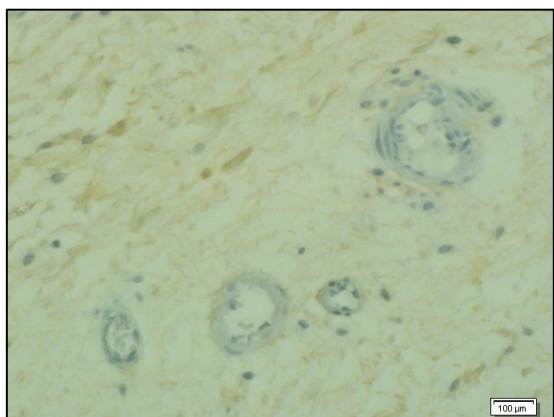


Figure 2 Expression of eNOS and VEGF determined by Western blotting in gastric tissue from rats in the sham-operated group, the partial portal vein ligation group and rats subjected to partial portal vein ligation and glutamine treatment. A: An increase in eNOS expression was observed in the PPVL group compared with the SO group. The PPVL + G group showed reduced expression of this enzyme compared with the PPVL group; B: An increase in VEGF expression was detected in the PPVL group compared with the SO group. The PPVL + G group did not show a reduction in the expression of VEGF when compared with the PPVL group. SO: Sham-operated; PPVL: Partial portal vein ligation; G: Glutamine.

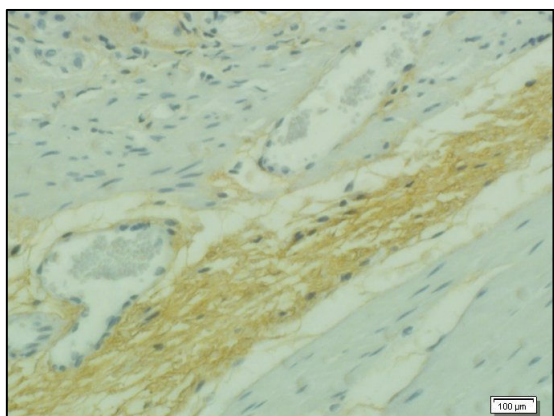
Figure 3A



SO



PPVL



PPVL+G

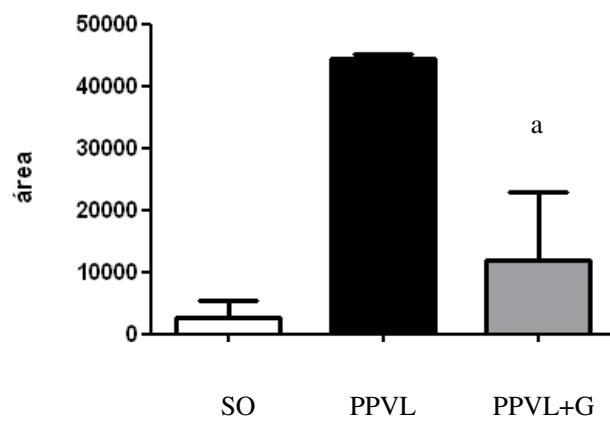
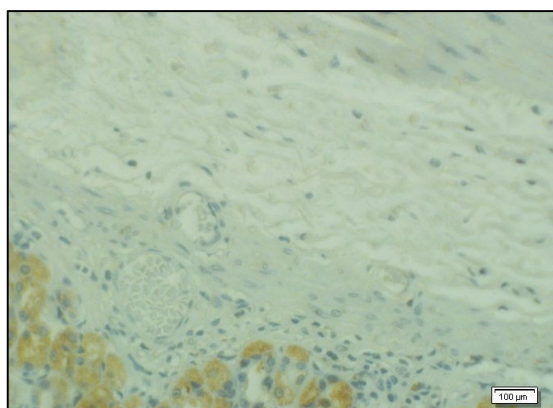
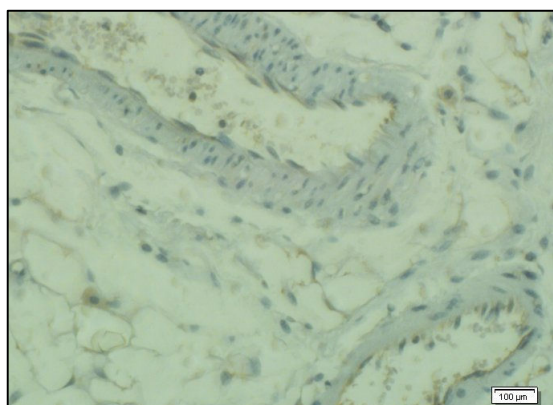


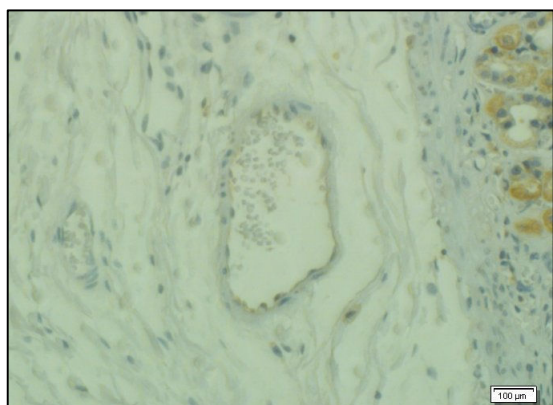
Figure 3B



SO



PPVL



PPVL+G

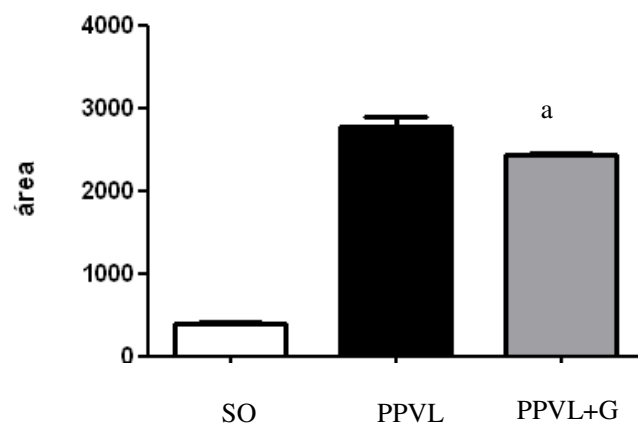
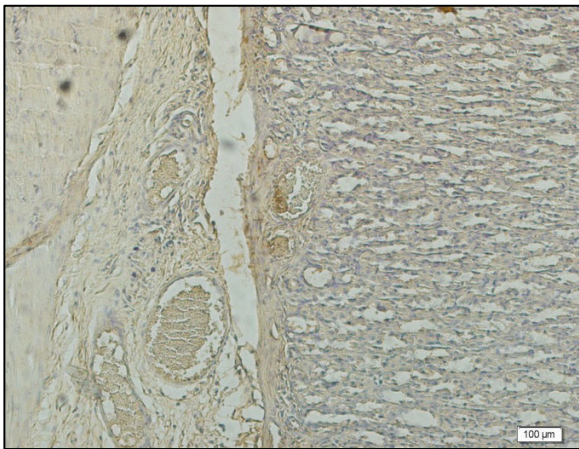
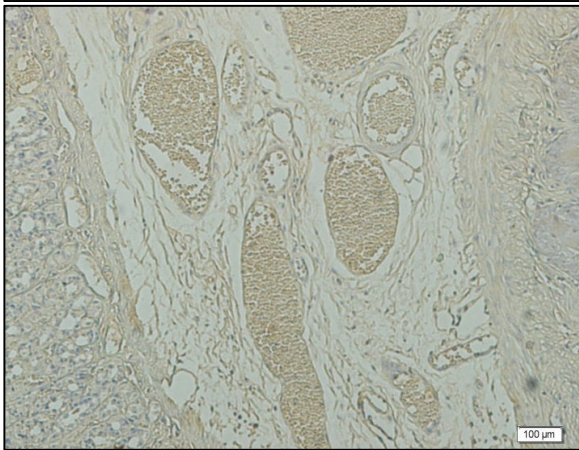


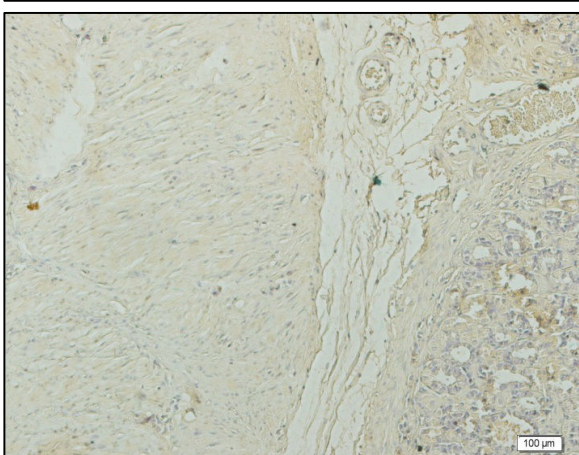
Figure 3C



SO



PPVL



PPVL+G

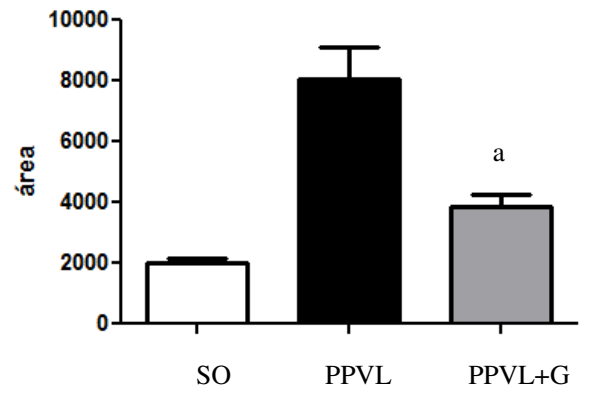


Figure 3D

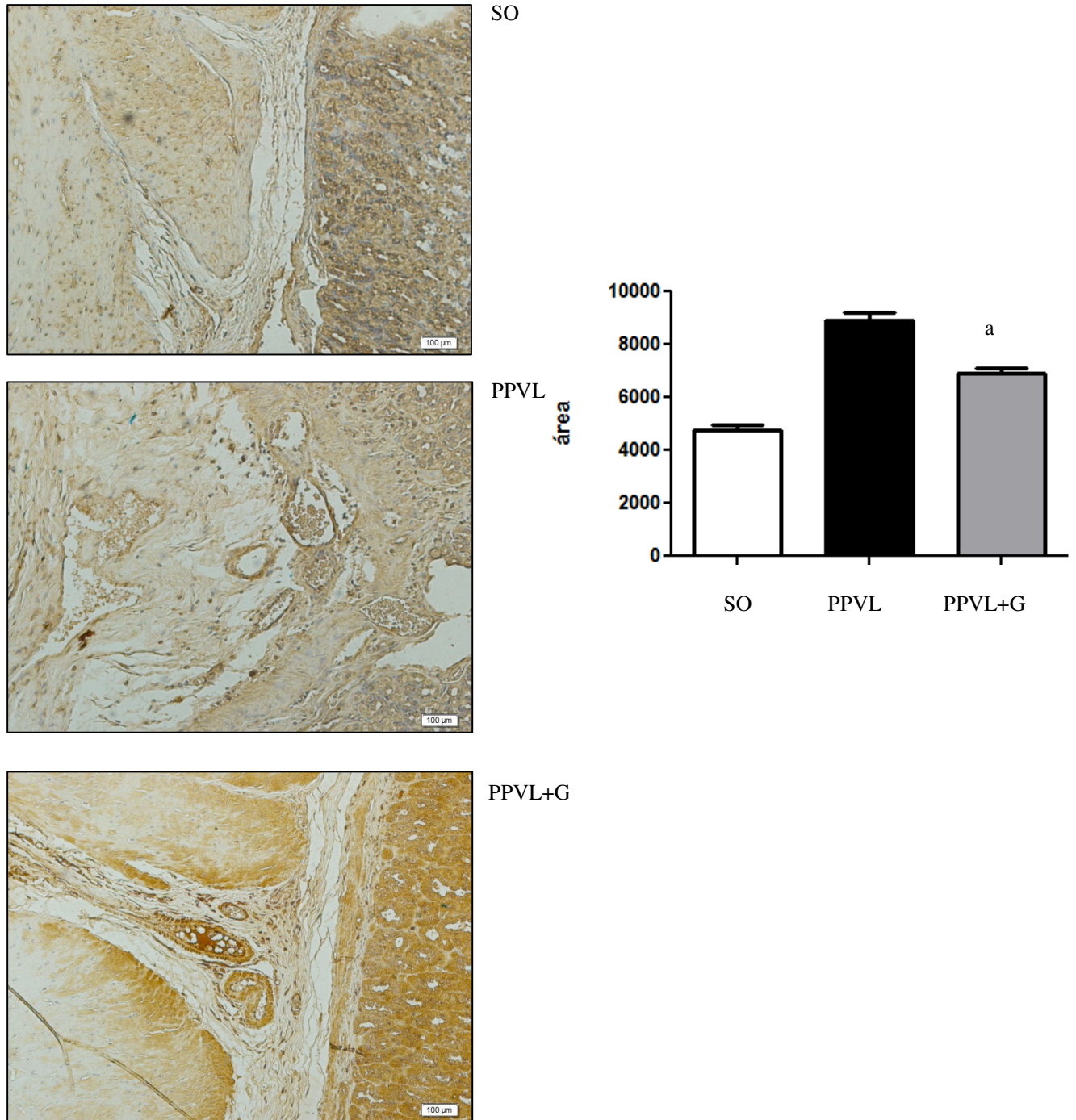


Figure 3 Representative expression of Enos, VEGF, Akt and nitrotyrosine determined by immunohistochemical analysis of gastric tissue from rats in the sham-operated group, the partial portal vein ligation group and rats subjected to partial portal vein ligation and

glutamine treatment. A: An increase in eNOS expression was observed in the PPVL group compared with the SO group. The PPVL + G group showed reduced expression of this enzyme when compared with the PPVL group; B: An increase in VEGF expression was observed in the PPVL group compared with the SO group. The PPVL + G group did not show a reduction in the expression of VEGF compared with the PPVL group; C: An increase in Akt protein expression was found in the PPVL group compared with the SO group. The PPVL + G group showed a reduction in the expression of this enzyme when compared with the PPVL group; D: An increase in nitrotyrosine expression was observed in the PPVL group compared with the SO group. The PPVL + G group showed reduced expression of this enzyme compared with the PPVL group. Analysis of the field was carried out precisely in the submucosal region, where there is evidence of edema and vasodilatation. eNOS staining; original magnification 10×. SO: Sham-operated; PPVL: Partial portal vein ligation; G: Glutamine.

Figure 4A

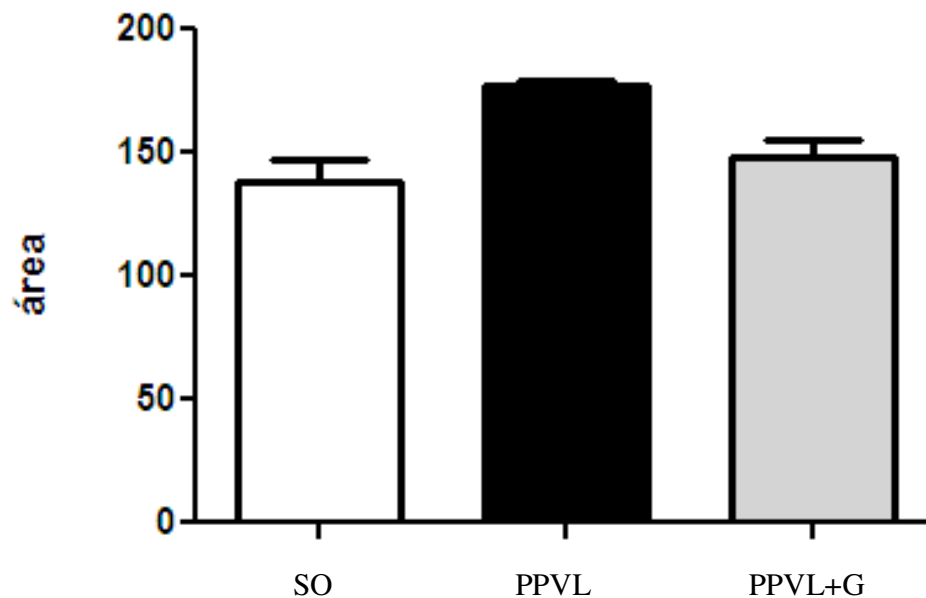


Figure 4B

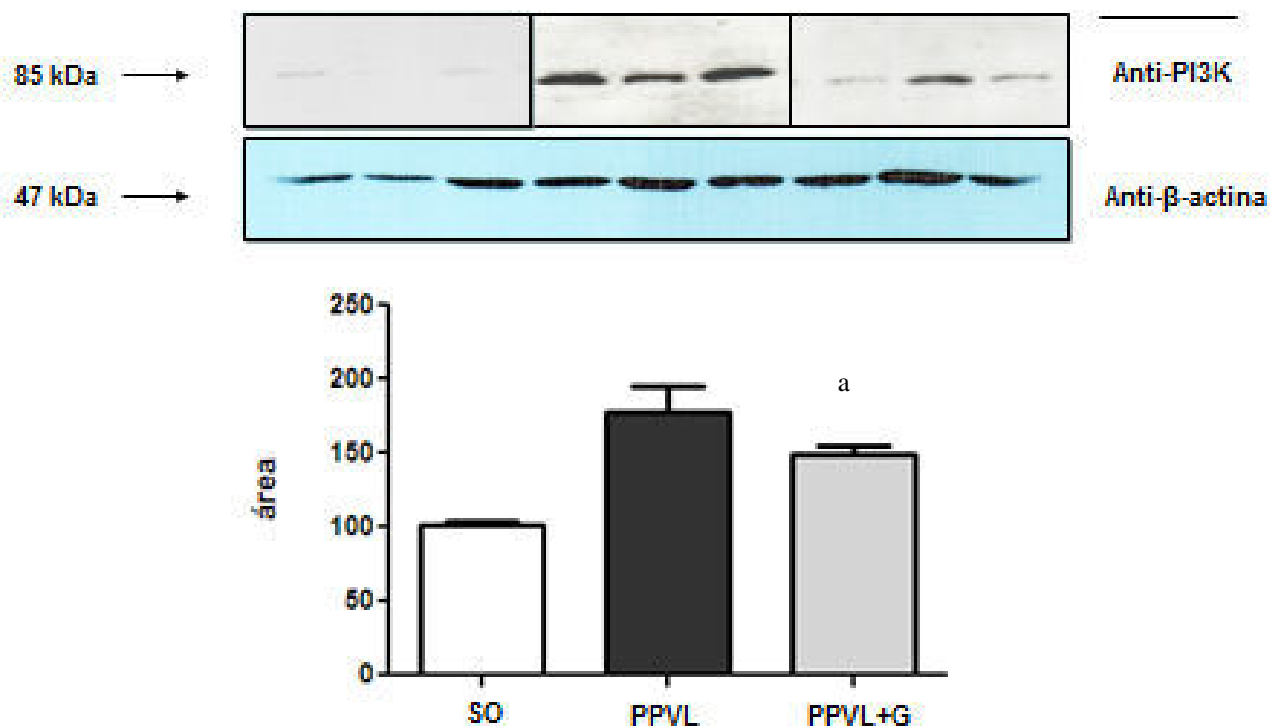


Figure 4 Expression of P-Akt and IP3K determined by Western blotting in gastric tissue from rats in the sham-operated group, the partial portal vein ligation group and rats subjected to portal vein ligation and glutamine treatment. A: An increase in P-Akt protein expression was detected in the PPVL group compared with the SO group; B: An increase in PI3K protein expression was found in the PPVL group compared with the SO group. The PPVL + G group showed reduced expression of this enzyme compared with the PPVL group. SO: Sham-operated; PPVL: Partial portal vein ligation; G: Glutamine.

DISCUSSÃO GERAL

5. DISCUSSÃO GERAL

A hipertensão portal (HP) é uma complicação grave da cirrose, que se caracteriza pelo aumento do fluxo sanguíneo e/ou aumento da resistência vascular no sistema porta e causa a mortalidade entre os pacientes com cirrose hepática pelas suas complicações [2].

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. Essa situação faz com que ocorra o desenvolvimento de uma circulação hiperdinâmica no território esplâncnico e pelo processo angiogênico instalado onde há grande circulação colateral [2].

O termo gastropatia da hipertensão portal (GHP) caracteriza as lesões macroscópicas que aparecem na mucosa gástrica de pacientes com hipertensão portal, como consequência da formação excessiva de vasos. Histologicamente, essas 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” [137].

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 mediante 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 [48].

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. Nesse 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 consequências. Em 7 dias, a HP encontra-se estabelecida, porém não evidenciando complicações hepáticas [122].

Em estudos anteriores, foi observado que o fluxo sanguíneo venoso portal aumentado é resultante da vasodilatação arteriolar e contribui para o agravamento e manutenção da HP. A intervenção com glutamina, via intraperitoneal, teve início depois do desenvolvimento da circulação hiperdinâmica para demonstrar o efeito benéfico desse aminoácido no processo da HP [138, 139].

Os valores da pressão portal (mmHg), 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. Esses resultados foram semelhantes em animais tratados com quercetina [90, 140].

Os resultados das análises das enzimas AST, ALT e FA não mostraram comportamento alterado no modelo empregado no estudo. A AST e a ALT estão diretamente relacionadas à lesão e à necrose celular, e a FA está diretamente relacionada à doença hepatobiliar. Com esses 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 [122, 141].

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 [142]. Foram encontrados resultados semelhantes, utilizando o tratamento com ácido lipóico como antioxidante. Entretanto, nesses estudos, os mecanismos para esclarecer os efeitos antioxidantes dessa substância não foram bem definidos [143].

Recentemente a administração aguda de vitamina C tem mostrado reverter a hiperreatividade 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 [144].

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 [145].

Quando se avalia a lipoperoxidação, no estômago de ratos, observa-se um aumento das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e também da quimioluminescência (QL), 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. Esses resultados já foram evidenciados em outros trabalhos que utilizaram o flavonóide quercetina e NAC, sugerindo um potencial antioxidante do aminoácido glutamina [90, 146]. Em nosso estudo, a glutamina reduziu o edema da submucosa e a vasodilatação, além de reduzir a lipoperoxidação no homogeneizado de estômago dos animais do grupo LPVP+G. A melhora nos achados histológicos da mucosa gástrica vem acompanhada de uma modificação dos parâmetros enzimáticos, assim como a restauração da integridade da membrana plasmática

traduzida pela redução da LPO [147]. 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 [90, 148].

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 (EAOs) e é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Essas enzimas não estão exclusivamente no citosol, mas também nas mitocôndrias, onde grande parte dos radicais livres é produzida [149, 150].

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 [36].

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 [151].

Trabalhos relacionam a diminuição da atividade da enzima SOD ao aumento do estresse oxidativo [152, 153]. Em nosso estudo, observou-se uma diminuição da atividade da SOD nos animais do grupo LPVP em relação aos demais grupos, o que poderia estar relacionado com a inativação do ânion superóxido, pois a mesma estaria sendo utilizada na dismutação das EAO e formação de H_2O_2 . 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 [90, 154].

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 se observou alteração significativa entre os grupos.

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 [155]. 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 [156].

Neste estudo, observou-se a diminuição da GPx no grupo LPVP, quando comparado ao controle, 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 desses RL, o que estaria levando ao consumo dessa enzima, também, pelo grupo LPVP+G [115].

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 [90, 142].

Em indivíduos com cirrose, a hipertensão portal é frequentemente 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 [157].

Além disso, estudos observam que o aumento da resistência intra-hepática 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 intra-hepática. 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 ciclooxigenase-derivados prostaglandinas) e a produção de vasodilatadores, principalmente óxido nítrico (NO). Esses 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 diminuída devido ao aumento de vasodilatadores (NO e adenosina). Isso sugere diferentes disponibilidades de NO [158].

Na avaliação dos metabólitos do NO, em homogeneizado de estômago, observou-se uma redução de 19% na produção desses metabólitos, no grupo LPVP+G, em relação ao grupo LPVP. Esse aumento da produção de NO pelo grupo LPVP pode ser explicado devido ao processo de angiogênese, que se instala nesse modelo, para realizar o desvio do sangue da área obstruída para a circulação sistêmica. Além disso, esse aumento da produção de óxido nítrico poderia estar reagindo com o ânion superóxido, formando o radical peroxinitrito, extremamente lesivo. Essa 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 [89].

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 [159].

Em ratos com colite induzida por ácido acético, também se observou um aumento do NO nos animais do grupo colite em relação ao controle. Esses animais, quando tratados com glutamina, tiveram uma redução da produção de NO e consequente melhora da mucosa intestinal [115].

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 [160].

O NO é o principal mediador da vasorreatividade e de anormalidades angiogênicas [161]. 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 [115]. 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 [162].

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 ureia, creatina e agmatina. A suplementação de L-Arginina em pacientes com doença vascular é bem relatada, por beneficiar terapêuticamente. A disponibilidade de L-Arginina depende do fluxo de outros aminoácidos no organismo, incluindo L-glutamina, L-glutamato, L-ornitina, L-citrulina e L-lisina [163].

Na avaliação histológica da mucosa gástrica, por meio da coloração de hematoxilina-eosina, confirmou-se o desenvolvimento de edema e vasodilatação no grupo LPVP, devido ao processo de angiogênese instalado, quando comparado aos animais SO. Os animais LPVP+G apresentaram uma atenuação desse fenômeno, semelhante aos achados em estudo que utilizou a quercetina como agente antioxidante [90].

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

A discussão que segue é pertinente ao **experimento II**, apresentado no **artigo II**. O estresse oxidativo tem um importante papel na etiopatogenia da hipertensão portal, pois, com a superprodução de ânion superóxido e óxido nítrico observados no modelo de ligadura parcial da veia porta, ocorre formação de peroxinitrito. Estudos têm observado as ações específicas do ONOO⁻ como modulador de vias de sinalização intracelular regulando respostas inflamatórias, incluindo a angiogênese e a indução de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [164]. Neste estudo, observou-se um aumento da lipoperoxidação e uma redução nos níveis da enzima SOD nos animais do grupo LPVP. Esses resultados podem ser uma resposta ao dano oxidativo que ocorre na mucosa gástrica ocasionado pelo aumento na formação de EAOs, ocasionando aumento da lipoperoxidação, como demonstrado pelo aumento de TBARS e, dessa forma, provocando uma redução dos níveis da enzima SOD, que faz um importante papel no balanço redox celular, na tentativa de dismutar radicais livres e proteger tecidos contra possíveis danos oxidativos, dessa forma sendo consumida (**Fig. 1 e 3a**) [36, 165]. Esses resultados também foram observados no experimento I, onde foi utilizada a via de administração intraperitoneal, nesse experimento II a administração da glutamina foi via intragástrica (gavagem).

A redução significativa da lipoperoxidação nos animais LPVP + G demonstra uma ação efetiva no processo da lipoperoxidação. Esse resultado está de acordo com a capacidade esperada pela glutamina em inativar a formação de EAOs, em especial, NO

reduzindo a formação de peroxinitrito. O peroxinitrito reage com a tirosina livre e os resíduos de tirosina em moléculas proteicas para produzir nitrotirosina. Alternativamente, as EAOs podem ativar a tirosina para formar tirosil, um radical que, por sua vez, oxida NO, produzindo nitrotirosina (NTT) [36, 166]. A geração de ONOO⁻ teve seus níveis avaliados mediante expressão da NTT, que neste estudo observou-se uma redução significativa na sua expressão nos animais LPVP+G em relação aos animais LPVP, demonstrando a eficiência da glutamina ao dano oxidativo/nitrosativo que ocorre na mucosa gástrica.

Um fato muito importante neste experimento foi o efeito protetor da glutamina sobre a mucosa gástrica nos níveis dos metabólitos do NO, foi observado aumento nos níveis de NO no grupo LPVP, quando comparado ao grupo SO, bem como uma redução nos níveis do grupo LPVP+G, quando comparado ao LPVP (**Fig. 2**). Estudos demonstraram que a formação de L-citrulina a partir de L-arginina é inibida pela ação de glutamina. Sugerindo que a L-arginina seria limitante para a formação de NO quando a glutamina está presente. Além disso, sabe-se que a glutamina inibe a liberação de NO derivado do endotélio em resposta ao ADP. Isso levanta a possibilidade de que a glutamina afeta a liberação de NO derivado do endotélio por outros mecanismos, não apenas o de inibição de L-arginina [167].

O NO, para que ocorra a vasodilatação, é o responsável por um aumento de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), que é o agente responsável final para o relaxamento do sistema vascular por meio da liberação de Ca²⁺ citosólico. A NO endotelial sintase (eNOS) é responsável por grande parte da síntese de NO vascular, modulando a reação em que a L-arginina é oxidada a L-citrulina e NO [168]. Tem sido observado que pode ocorrer redução na produção de NO, apesar da expressão de eNOS apresentar-se em níveis normais [169]. Isso se atribui, em parte, à redução da atividade da eNOS, causada pelas várias alterações na regulação enzimática, como a expressão aumentada da caveolina ou um defeito no co-fator da eNOS, tetrahydrobiopterina (BH4), reduzindo sua fosforilação[170].

Observou-se, neste estudo, que a glutamina reduziu a expressão da proteína eNOS, em mucosa gástrica no grupo LPVP+G, quando comparado ao grupo LPVP (**Fig. 4 e 6**). Durante a cirrose precoce, esse caminho é estimulado por diferentes fontes de estímulos,

como VEGF, citocinas inflamatórias e forças mecânicas de cisalhamento [35, 67]. De acordo com diversos estudos, outros mecanismos, tais como, alterações na localização subcelular de eNOS [171] s-nitrosilação [172] ou degradação assimétrica da dimetilarginina, podem estar envolvidos na regulação de sua atividade [173]. Uma explicação para essas evidências é a de que a glutamina, devido ao seu envolvimento na síntese de NO, estaria envolvida na redução dos níveis citosólicos de Ca^{2+} , os quais estão relacionados com os níveis de Akt, que por sua vez é estimulada pelo estresse mecânico de cisalhamento. Dessa forma, todo esse mecanismo hemodinâmico seria inibido, devido à redução dos níveis de NO, desencadeados pela ação da glutamina.

A angiogênese se caracteriza pela formação de novas estruturas vasculares e tornou-se um dos fenômenos fisiopatológicos mais investigados nos últimos anos, devido ao papel fundamental que desempenha na patogênese de doenças e seu potencial como alvo terapêutico. Muitas moléculas têm sido implicadas como moduladoras do processo angiogênico, como fator de necrose tumoral, interleucinas, angiopoetinas e fatores de crescimento, dentre eles, o VEGF. De fato, o VEGF estimula a produção de NO pelas NOS, aumentando a permeabilidade vascular, proliferação e sobrevivência das células endoteliais [63]. Neste estudo, observou-se aumento da expressão do VEGF nos grupo LPVP, quando comparado ao grupo SO, porém sem observar redução significativa desses parâmetros no grupo LPVP+G, quando comparado ao LPVP (Fig. 5 e 7).

Além disso, a superprodução de peroxinitrito ($ONOO^-$), como observado neste estudo, é demonstrada pelo aumento da expressão da NTT no grupo LPVP, quando comparado ao grupo SO, bem como uma redução no grupo LPVP+G (Fig. 9). As ações citotóxicas do $ONOO^-$ têm sido descritas através da modulação de vias de sinalização intracelular que regulam respostas inflamatórias, incluindo a indução de angiogênese e aumento dos níveis de VEGF. Estudos em retina de ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, demonstraram a formação de nitrotirosina e aumento dos efeitos na estimulação do VEGF [164]. Essas condições têm sido estudadas pois induzem à geração de espécies ativas de oxigênio (EAOs). As EAOs estão envolvidas no desencadeamento da superexpressão de VEGF em vários tipos celulares [174, 175], mas os mecanismos moleculares desse efeito ainda devem ser elucidados. Estudos em pacientes, em animais e *in vitro* indicam que a formação de nitrotirosina, um marcador para $ONOO^-$, está associado ao aumento da expressão do VEGF durante a doença microvascular diabética,

aterosclerose e na angiogênese tumoral [176, 177]. Além disso, estudos usando linhagens celulares apresentaram formação de ONOO^- que estimula o aumento de VEGF [178]. Pode-se sugerir que esses resultados demonstram a ação da glutamina diretamente na síntese de NO, para a redução de seus níveis e não exatamente atuando sobre ação de fatores de crescimento e sua cascata de sinalização.

Neste estudo, observou-se um aumento significativo da expressão da Akt no grupo LPVP e uma redução desses parâmetros no grupo LPVP+G (**Fig. 8**). O VEGF também atua estimulando o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que ativa a via eNOS-Akt-dependente, resultando na ativação da eNOS e aumento da produção de NO [67, 179]. PI3K é a via de estímulo da Akt, que pode rapidamente ativar eNOS [179]. A Akt surgiu como uma via de sinalização em todas as células de eucariotos superiores, além de apresentar-se como uma das proteínas mais importantes e versáteis do grupo das quinases no entendimento da fisiopatologia de doenças humanas. A liberação de NO produzido pela estimulação da eNOS está envolvida na vasodilatação, remodelamento vascular e angiogênese [180]. A sinalização via Akt também leva a um aumento da produção de fator induzido por hipóxia ($\text{HIF1}\alpha$ e $\text{HIF2}\alpha$), fatores de transcrição e, em parte, através da ativação da via mTOR-dependente [181]. A ativação da eNOS através da proteína Akt leva ao aumento da produção de NO, vasodilatação e aumento da circulação esplâncica [182, 183]. A ativação de Akt ocorre devido a um aumento do estresse de cisalhamento induzido pelo desarranjo endotelial, embora outros mecanismos possam estar envolvidos [184]. Esses resultados são explicáveis devido ao papel que a glutamina exerce na produção de NO que, por sua vez, irá desencadear uma reação em cadeia, sendo superproduzido e dilatando os vasos do território esplâncico, aumentando gradativamente o estresse de cisalhamento, que é o estímulo mecânico de ativação da Akt. Além disso, neste estudo foi observado que os níveis de VEGF não se alteram no grupo LPVP+G em relação ao grupo LPVP e o VEGF, via RTK, atua como via de liberação de eNOS, através da via de Akt, produzindo mais NO, caracterizando a circulação hiperdinâmica presente na HP. Portanto, a glutamina atuaria atenuando esse quadro, não reduzindo os níveis de NO, através do VEGF, mas pela redução do estresse de cisalhamento, desencadeado pela síntese de NO, através da inibição de L-arginina e, com isso, reduzindo os níveis de Akt, estimulada pela tensão mecânica nos vasos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1 Experimento I

1. Os valores da pressão portal mostraram que houve aumento significativo no grupo LPVP comparado ao grupo SO. A glutamina (LPVP+G) diminuiu 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 se observaram alterações nos valores dessas enzimas;
3. Em relação à lipoperoxidação, utilizando os métodos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL) em estômago de ratos, observou-se um aumento do TBA-RS e também da QL no grupo LPVP, sugerindo que o aumento desse 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;
5. A enzima antioxidante catalase (CAT) não apresentou alteração significativa na mucosa gástrica;

6. A atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx), demonstrou aumento nos grupos SO+G e no LPVP+G, apresentando redução significativa no grupo LPVP em relação aos demais grupos.
7. A presença dos metabólitos do NO, através de nitritos e nitratos no estômago de ratos com hipertensão portal, mostrou um incremento no grupo LPVP.
8. 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 desse fenômeno.

6.2 Experimento II

1. Os valores da pressão portal mostraram que houve aumento significativo no grupo LPVP comparado ao grupo SO. A glutamina (LPVP+G) diminuiu a pressão portal nesse modelo utilizado.
2. O grupo LPVP apresentou aumento da lipoperoxidação na mucosa gástrica avaliado por TBARS. O grupo tratado LPVP+G apresentou redução nos níveis de LPO, quando comparado ao grupo LPVP. Demonstrando eficiência da glutamina no combate ao dano oxidativo.
3. A administração da glutamina apresentou diferenças na dosagem dos metabólitos do NO nos grupos estudados. O grupo LPVP apresentou aumento nos níveis de NO, quando comparados ao grupo SO, bem como, houve uma redução dos níveis de NO no grupo LPVP+G, quando comparado aos LPVP.
4. Houve redução da atividade da enzima SOD no grupo LPVP. No grupo LPVP+G, a atividade da enzima permaneceu próxima aos índices encontrados nos animais dos grupos SO. Sugerindo que a SOD estaria em atividade devido aos níveis elevados de TBARS observados no grupo LPVP.

5. Na glutathiona total (GSH), a glutamina elevou os níveis no grupo LPVP+G, apresentando redução significativa no grupo LPVP em relação aos demais grupos. Esse padrão poderia ser explicado devido ao maior aumento na síntese de glutathiona, pois a glutamina atua como substrato para a produção desse antioxidante. Bem como, pela formação de peroxinitrito, onde o mecanismo de dismutação não ocorresse;
6. A glutamina mostrou ser efetiva na redução da expressão das proteínas eNOS, PI3K e Akt em mucosa gástrica. Demonstrando papel importante na redução do evento de sinalização intracelular que desencadeia a liberação de NO. O mesmo não foi observado na expressão do VEGF.
7. A expressão da eNOS, Akt e NTT em mucosa gástrica apresentou redução nos animais LPVP+G quando comparados ao grupo LPVP. Nos níveis de VEGF não houve alteração significativa entre os grupos analisado.

6.3 Conclusão Geral

A glutamina, aminoácido utilizado neste experimento, por via i.p. e i.g., apresenta propriedade antioxidante eficiente na redução do estresse oxidativo no modelo de ligadura parcial da veia porta. Demonstra ação benéfica no manejo da HP, melhorando as complicações vasculares. Em contrapartida, observou-se que parece não se envolver na regulação dos níveis de fator de crescimento vascular endotelial, sugerindo que sua ação na rota VEGF-eNOS não seja tão eficiente, porém demonstrando relação na redução do estresse de cisalhamento, desencadeado pela circulação hiperdinâmica que caracteriza HP. E que, por sua vez, estimula a via de liberação Akt-eNOS-NO. A glutamina atenua essa via sendo eficiente na redução dos níveis de formação de NO, através da inibição da formação de citrulina e NO, pela L-arginina, reduzindo seus níveis e seu efeito modulador da vasodilatação, atenuando o estresse de cisalhamento que, por sua vez, inibe a ativação da Akt. Demonstra igualmente eficácia no tratamento da HP. Isso justifica a continuidade de estudos com a glutamina, podendo ser avaliado seu papel em outras rotas moleculares e suas vias de regulação.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A hipertensão portal e a cirrose, em humanos e em modelos animais, de doença hepática, estão associadas a distúrbios vasculares devido ao desenvolvimento da circulação hiperdinâmica, caracterizada pelo aumento do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica presente. Além disso, as alterações vasculares na homeostase também se manifestam pela resposta dos vasos sanguíneos para diversos agentes vasoconstritores e dilatadores influenciadas por reflexos regulados pelo centro cardiovascular, como o barorreflexo [185]. Como exemplo, em casos de cirrose e hipertensão portal crônica, há uma diminuição da sensibilidade pressórica e uma resposta cronotrópica reduzida em respostas às catecolaminas [186]. Em modelos animais, observou-se uma elevação do fluxo sanguíneo mesentérico arterial e uma redução da resposta a vasoconstritores. Fatores neurais podem estar envolvidos na gênese deste desarranjo hemodinâmico, envolvendo a função vascular, em especial o sistema adrenérgico, o qual apresenta uma evidência indireta de hiperatividade [187].

Há trabalhos demonstrando o envolvimento da regulação nervosa autonômica nessa disfunção vascular associada à cirrose e/ou hipertensão portal [186, 188, 189]. O aumento da pressão no território esplâncnico pode determinar redução nos níveis de catecolaminas, demonstrando um “downregulation” nos receptores adrenérgicos. Esses achados sugerem que fatores neurais estejam envolvidos na gênese dessa alteração hemodinâmica, em especial o sistema simpático, por apresentar um envolvimento indireto nessa hiperatividade circulatória. [190, 191].

Diante destes estudos, surge uma nova perspectiva propondo avaliar o papel da regulação nervosa autonômica, em especial, a via adrenérgica, no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica, desencadeada pela hipertensão portal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

1. Sherwood, L., *Fisiologia Humana das Células aos Sistemas*. 2010, New York: Cengage Learning.
2. Fernandez, M., et al., *Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(3): p. 886-94.
3. Whittle, B.J. and S. Moncada, *Nitric oxide: the elusive mediator of the hyperdynamic circulation of cirrhosis?* *Hepatology*, 1992. **16**(4): p. 1089-92.
4. Martell, M., et al., *Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension*. *World J Hepatol*. **2**(6): p. 208-20.
5. Minano, C. and G. Garcia-Tsao, *Clinical pharmacology of portal hypertension*. *Gastroenterol Clin North Am*. **39**(3): p. 681-95.
6. Benini, A. and S.K. Bonar, *Andreas Vesalius 1514-1564*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1996. **21**(11): p. 1388-93.
7. Ferreira, C.T., E. Carvalho, and L.R. Silva, *Gastroenterologia e Hepatologia em Pediatria: Diagnóstico e Tratamento* 2003, Porto Alegre: Medsi.
8. Pugh, R.N., et al., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices*. *Br J Surg*, 1973. **60**(8): p. 646-9.
9. Garcia-Tsao, G., et al., *Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding*. *Hepatology*, 1985. **5**(3): p. 419-24.
10. Wainwright, P.E., et al., *The effects of dietary fatty acid composition combined with environmental enrichment on brain and behavior in mice*. *Behav Brain Res*, 1994. **60**(2): p. 125-36.
11. Nogueira Jr, A., *Doenças do aparelho digestivo* 1981, São Paulo: Byk.
12. Cristina Targa Ferreira , Elisa de Carvalho, and L.R.d. Silva, *Gastroenterologia e Hepatologia em Pediatria: Diagnóstico e Tratamento* 2003, Porto Alegre: Medsi.
13. MATTOS, A.A. and A.Z. MATTOS, *Tratado de Hepatologia*. 2010, Rio de Janeiro: Rubio.
14. Moreno, A.H., et al., *Portal blood flow in cirrhosis of the liver*. *J Clin Invest*, 1967. **46**(3): p. 436-45.
15. Benoit, J.N., et al., *"Forward" and "backward" flow mechanisms of portal hypertension. Relative contributions in the rat model of portal vein stenosis*. *Gastroenterology*, 1985. **89**(5): p. 1092-6.
16. Gatta, A., M. Bolognesi, and C. Merkel, *Vasoactive factors and hemodynamic mechanisms in the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis*. *Mol Aspects Med*, 2008. **29**(1-2): p. 119-29.

17. Matei, V., et al., *The eNOS cofactor tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in livers of rats with CCl4 cirrhosis*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 44-52.
18. Gatta, A., et al., *Portal hypertension: state of the art*. Ital J Gastroenterol Hepatol, 1999. **31**(4): p. 326-45.
19. Bernardi, M. and F. Trevisani, *Systemic and regional hemodynamics in pre-ascitic cirrhosis*. J Hepatol, 1997. **27**(3): p. 588-91.
20. Lambertucci, J.R., L.C. dos Santos Silva, and L.M. Andrade, *Caput medusae in schistosomiasis mansoni*. Rev Soc Bras Med Trop, 2006. **39**(6): p. 584-5.
21. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
22. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
23. Wiest, R., et al., *NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G1043-51.
24. Vallance, P. and S. Moncada, *Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?* Lancet, 1991. **337**(8744): p. 776-8.
25. Genesca, J., et al., *Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(1): p. 169-77.
26. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(1): p. 65-70.
27. Ignarro, L.J., R.E. Byrns, and K.S. Wood, *Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein*. Circ Res, 1987. **60**(1): p. 82-92.
28. Davis, K.L., et al., *Novel effects of nitric oxide*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 203-36.
29. Moreau, R. and D. Lebrec, *Molecular and structural basis of portal hypertension*. Clin Liver Dis, 2006. **10**(3): p. 445-57, vii.
30. Bredt, D.S., P.M. Hwang, and S.H. Snyder, *Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide*. Nature, 1990. **347**(6295): p. 768-70.
31. Jurzik, L., et al., *Up-regulation of nNOS and associated increase in nitrenergic vasodilation in superior mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension*. J Hepatol, 2005. **43**(2): p. 258-65.
32. Liaudet, L., F.G. Soriano, and C. Szabo, *Biology of nitric oxide signaling*. Crit Care Med, 2000. **28**(4 Suppl): p. N37-52.
33. Garthwaite, J. and C.L. Boulton, *Nitric oxide signaling in the central nervous system*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 683-706.
34. Jozkowicz, A., et al., *Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(4): p. 773-83.
35. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
36. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free radical and biology and medicine*. 2007, New York: Oxford.
37. Farias-Silva, E., et al., *Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa*. Planta Med, 2007. **73**(12): p. 1241-6.

38. Reichen, J. and D. Lebrec, *The future treatment of portal hypertension*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2007. **21**(1): p. 191-202.
39. Quintero, E., 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. **93**(5): p. 1054-61.
40. Spina, G.P., et al., *Gastric endoscopic features in portal hypertension: final report of a consensus conference, Milan, Italy, September 19, 1992*. J Hepatol, 1994. **21**(3): p. 461-7.
41. Ripoll, C. and G. Garcia-Tsao, *Management of gastropathy and gastric vascular ectasia in portal hypertension*. Clin Liver Dis. **14**(2): p. 281-95.
42. Papazian, A., et al., *Portal hypertensive gastric mucosa: an endoscopic study*. Gut, 1986. **27**(10): p. 1199-203.
43. Payen, J.L., et al., *Severe portal hypertensive gastropathy and antral vascular ectasia are distinct entities in patients with cirrhosis*. Gastroenterology, 1995. **108**(1): p. 138-44.
44. Primignani, M., et al., *Natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis. The New Italian Endoscopic Club for the study and treatment of esophageal varices (NIEC)*. Gastroenterology, 2000. **119**(1): p. 181-7.
45. Fontana, R.J., et al., *Portal hypertensive gastropathy in chronic hepatitis C patients with bridging fibrosis and compensated cirrhosis: results from the HALT-C trial*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(5): p. 983-92.
46. Merli, M., et al., *The natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis and mild portal hypertension*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(10): p. 1959-65.
47. Bellis, L., et al., *Hepatic venous pressure gradient does not correlate with the presence and the severity of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis*. J Gastrointest Liver Dis, 2007. **16**(3): p. 273-7.
48. de Franchis, R., A. Dell'Era, and F. Iannuzzi, *Diagnosis and treatment of portal hypertension*. Dig Liver Dis, 2004. **36**(12): p. 787-98.
49. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
50. Lyons, J.M., 3rd, et al., *The role of VEGF pathways in human physiologic and pathologic angiogenesis*. J Surg Res. **159**(1): p. 517-27.
51. Pepper, M.S., et al., *Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **189**(2): p. 824-31.
52. Bekinschtein, P., et al., *BDNF and memory formation and storage*. Neuroscientist, 2008. **14**(2): p. 147-56.
53. Sieber, C.C., et al., *In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide*. J Hepatol, 2001. **34**(5): p. 644-50.
54. Sumanovski, L.T., et al., *Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: role of nitric oxide*. Hepatology, 1999. **29**(4): p. 1044-9.
55. Geerts, A.M., et al., *Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study*. Liver Int, 2006. **26**(7): p. 889-98.
56. Senger, D.R., et al., *Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor*. Cancer Res, 1990. **50**(6): p. 1774-8.

57. Keck, P.J., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.
58. Breier, G., M. Clauss, and W. Risau, *Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development*. Dev Dyn, 1995. **204**(3): p. 228-39.
59. Flamme, I., G. Breier, and W. Risau, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo*. Dev Biol, 1995. **169**(2): p. 699-712.
60. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
61. Adamis, A.P. and D.T. Shima, *The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease*. Retina, 2005. **25**(2): p. 111-8.
62. Zhang, L., et al., *Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(4): p. 1169-78.
63. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
64. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30336-43.
65. Thakker, G.D., et al., *The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(15): p. 10002-7.
66. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
67. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
68. Hixon, M.L., et al., *Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization*. J Clin Invest, 2000. **106**(8): p. 1011-20.
69. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1243-50.
70. Larcher, F., et al., *VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development*. Oncogene, 1998. **17**(3): p. 303-11.
71. Kaner, R.J., et al., *Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(6): p. 657-64.
72. Jin, K.L., X.O. Mao, and D.A. Greenberg, *Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10242-7.
73. Banerjee, S., et al., *VEGF-A165 induces human aortic smooth muscle cell migration by activating neuropilin-1-VEGFR1-PI3K axis*. Biochemistry, 2008. **47**(11): p. 3345-51.
74. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
75. Bellacosa, A., et al., *Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting*. Adv Cancer Res, 2005. **94**: p. 29-86.
76. Xu, D.L., et al., *Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 2): p. R1739-45.

77. Niederberger, M., et al., *Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats*. Hepatology, 1996. **24**(4): p. 947-51.
78. Ignarro, L.J., *Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein*. Circ Res, 1989. **65**(1): p. 1-21.
79. Hoffmann, J., et al., *Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide*. Circ Res, 2001. **89**(8): p. 709-15.
80. Cirino, G., S. Fiorucci, and W.C. Sessa, *Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation?* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(2): p. 91-5.
81. Wong, G.K. and P.A. Marsden, *Nitric oxide synthases: regulation in disease*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11**(1): p. 215-20.
82. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
83. Lyons, C.R., *The role of nitric oxide in inflammation*. Adv Immunol, 1995. **60**: p. 323-71.
84. Wennmalm, A., *Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease*. J Intern Med, 1994. **235**(4): p. 317-27.
85. Llesuy, S., *Introducción y especies activas de oxígeno*, in *Estresse oxidativo e antioxidantes*, ULBRA, Editor. 2002, MARRONI, N. P.(org): Canoas. p. 21-32.
86. Farber, J., M. Kyle, and J. Coleman, *Mechanisms of cell injury by activated oxygen species*. Lab Invest, 1990. **62**(6): p. 670-9.
87. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed ed. 1999, New York: Oxford University Press.
88. Dröge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
89. Rodriguez-Vilarrupla, A., J. Bosch, and J.C. Garcia-Pagan, *Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension*. J Hepatol, 2007. **46**(2): p. 193-7.
90. Moreira, A.J., et al., *Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(10): p. 1939-46.
91. Ignarro, L., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
92. Wanstall, J., et al., *Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(3): p. 463-72.
93. Tziros, C. and J. Freedman, *The many antithrombotic actions of nitric oxide*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(10): p. 1243-51.
94. Forslund, T., H. Nilsson, and T. Sundqvist, *Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(2): p. 482-7.
95. Billack, B., *Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B*. Am J Pharm Educ, 2006. **70**(5): p. 102.
96. Lüth, H., G. Münch, and T. Arendt, *Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation*. Brain Res, 2002. **953**(1-2): p. 135-43.

97. Nathan, C. and Q. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.
98. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
99. Salvemini, D., T. Doyle, and S. Cuzzocrea, *Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 965-70.
100. Repetto, M. and S. Llesuy, *Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers*. Braz J Med Biol Res, 2002. **35**(5): p. 523-34.
101. Yu, B., *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. Physiol Rev, 1994. **74**(1): p. 139-62.
102. Sies, H. and M. Murphy, *Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage*. J Photochem Photobiol B, 1991. **8**(2): p. 211-8.
103. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
104. Landvik, S., A. Diplock, and L. Packer, *Efficacy of vitamin e in human health and disease*, in *Handbook of Antioxidants*, E. Cadenas and L. Packer, Editors. 2002, Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 75-97.
105. Krinsky, N., *Antioxidant functions of carotenoids*. Free Radic Biol Med, 1989. **7**(6): p. 617-35.
106. Boza, J.J., et al., *Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells*. Eur J Nutr, 2000. **39**(1): p. 38-46.
107. Babu, R., et al., *Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes*. J Pediatr Surg, 2001. **36**(2): p. 282-6.
108. Cremin, J.D., Jr. and S.E. Fleming, *Glycolysis is a source of pyruvate for transamination of glutamine amino nitrogen in jejunal epithelial cells*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. G575-88.
109. Arancibia, S., et al., *Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats*. Neurobiol Dis, 2008. **31**(3): p. 316-26.
110. Prem, J.T., et al., *The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model*. Am J Surg, 1999. **178**(2): p. 147-50.
111. Matilla, B., et al., *Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptides on liver antioxidant and detoxication systems in rats*. Nutrition, 2000. **16**(2): p. 125-8.
112. Elia, M. and P.G. Lunn, *The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man*. Nutrition, 1997. **13**(7-8): p. 743-7.
113. Mates, J.M., et al., *Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(5): p. 439-58.
114. Haussinger, D. and F. Schliess, *Glutamine metabolism and signaling in the liver*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 371-91.
115. Fillmann, H., 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. **236**(3): p. 217-26.
116. Ortiz de Urbina, J.J., et al., *[Effects of glutamine on antioxidants systems and hepatic detoxification in rats: influence of formulation]*. Nutr Hosp, 2004. **19**(2): p. 73-82.

117. Salvalaggio, P.R., et al., *Oral glutamine does not prevent bacterial translocation in rats subjected to intestinal obstruction and Escherichia coli challenge but reduces systemic bacteria spread*. Nutrition, 2002. **18**(4): p. 334-7.
118. Celebi, F., G. Ozturk, and M. Kizilkaya, *The effects of combined use of glutamine and growth hormone on the bacterial translocation associated with obstructive jaundice*. Saudi Med J, 2008. **29**(7): p. 989-93.
119. Heyland, D.K., et al., *REducing Deaths due to OXidative Stress (The REDOXS Study): Rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients*. Proc Nutr Soc, 2006. **65**(3): p. 250-63.
120. Nathens, A.B., et al., *Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients*. Ann Surg, 2002. **236**(6): p. 814-22.
121. Goldin, J.R. and M.M. Raymundo, *Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais*. 2^o ed, ed. HCPA. 1997, Porto Alegre.
122. Sikuler, E., D. Kravetz, and R.J. Groszmann, *Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model*. Am J Physiol, 1985. **248**(6 Pt 1): p. G618-25.
123. American Veterinary Medical Association, A., *AVMA releases updated euthanasia guidelines*. JAVMA-JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2007. **231**(6): p. 827-827.
124. American Veterinary Medical Association, A., *AVMA updates its euthanasia guidelines*. VETERINARY RECORD, 2007. **161**(15): p. 502-502.
125. HALPERN, B. and A. PACAUD, **TECHNIQUE DE PRELEVEMENT DECHANTILLONS DE SANG CHEZ LES PETITS ANIMAUX DE LABORATOIRE PAR PONCTION DU PLEXUS OPHTHALMIQUE*. COMPTES RENDUS DES SEANCES DE LA SOCIETE DE BIOLOGIE ET DE SES FILIALES, 1951. **145**(19-2): p. 1465-1466.
126. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
127. Buege, J.A. and S.D. Aust, *Microsomal lipid peroxidation*. Methods Enzymol, 1978. **52**: p. 302-10.
128. Gonzalez Flecha, B., S. Llesuy, and A. Boveris, *Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle*. Free Radic Biol Med, 1991. **10**(2): p. 93-100.
129. Misra, H. and I. Fridovich, *The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1972. **247**(10): p. 3170-5.
130. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J, 1973. **134**(3): p. 707-16.
131. Flohe, L., W.A. Gunzler, and H.H. Schock, *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme*. FEBS Lett, 1973. **32**(1): p. 132-4.
132. Granger, D., et al., *Measuring nitric oxide production in human clinical studies*. Methods Enzymol, 1999. **301**: p. 49-61.
133. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
134. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

135. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
136. Gaffey, M.J., et al., *Immunoreactivity for BER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas*. Am J Surg Pathol, 1992. **16**(6): p. 593-9.
137. Thuluvath, P.J. and H.Y. Yoo, *Portal Hypertensive gastropathy*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(12): p. 2973-8.
138. Cahill, P.A., E.M. Redmond, and J.V. Sitzmann, *Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension*. Pharmacol Ther, 2001. **89**(3): p. 273-93.
139. Bosch, J., J.G. Abraldes, and R. Groszmann, *Current management of portal hypertension*. J Hepatol, 2003. **38 Suppl 1**: p. S54-68.
140. Sherlock, S. and J. Dooley, *Diseases of the liver and Biliary system*. 9 ed, ed. B.S. Production. 2004, New York.
141. Casadevall, M., et al., *Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastric mucosal hyperemia of portal-hypertensive anesthetized rats*. Hepatology, 1993. **18**(3): p. 628-34.
142. Fernando, B., et al., *N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat*. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 689-94.
143. Marley, R., et al., *Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis*. Hepatology, 1999. **29**(5): p. 1358-63.
144. Ferlitsch, A., et al., *Vasoconstrictor hyporeactivity can be reversed by antioxidants in patients with advanced alcoholic cirrhosis of the liver and ascites*. Crit Care Med, 2005. **33**(9): p. 2028-33.
145. Seckin, Y., et al., *Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(5): p. 1154-8.
146. Miura, T., S. Muraoka, and Y. Fujimoto, *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. **41**(6): p. 759-65.
147. Cetinkaya, A., et al., *Levels of malondialdehyde and superoxide dismutase in subclinical hyperthyroidism*. Mediators Inflamm, 2005. **2005**(1): p. 57-9.
148. Israeli, E., et al., *Prophylactic administration of topical glutamine enhances the capability of the rat colon to resist inflammatory damage*. Dig Dis Sci, 2004. **49**(10): p. 1705-12.
149. Formica, J.V. and W. Regelson, *Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids*. Food Chem Toxicol, 1995. **33**(12): p. 1061-80.
150. Salvador, M. and J.A. Henriques, *Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*, ed. Ulbra. 2004, Canoas, Ulbra.
151. Kikkawa, S., M. Kadohara, and H. Kawasaki, *Superoxide dismutase and glutathione in the gastric mucosa of patients with chronic liver disease*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1992. **78**(3): p. 289-309.
152. Hodgson, E.K. and I. Fridovich, *The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation*. Biochemistry, 1975. **14**(24): p. 5299-303.
153. Santiard, D., et al., *Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(1): p. 121-7.

154. Abd El-Gawad, H.M. and A.E. Khalifa, *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. **43**(3): p. 257-63.
155. Pravda, J., *Radical induction theory of ulcerative colitis*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(16): p. 2371-84.
156. Ardite, E., et al., *Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis*. Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 735-44.
157. La Villa, G. and P. Gentilini, *Hemodynamic alterations in liver cirrhosis*. Mol Aspects Med, 2007.
158. Zipprich, A., *Hemodynamics in the isolated cirrhotic liver*. J Clin Gastroenterol, 2007. **41**(10 Suppl 3): p. S254-8.
159. Houdijk, A.P., et al., *Dietary glutamine supplementation reduces plasma nitrate levels in rats*. Clin Nutr, 1998. **17**(1): p. 11-4.
160. Kakoki, M., et al., *Amino acids as modulators of endothelium-derived nitric oxide*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(2): p. F297-304.
161. Langer, D.A. and V.H. Shah, *Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis*. J Hepatol, 2006. **44**(1): p. 209-16.
162. Llorens, S. and E. Nava, *Cardiovascular diseases and the nitric oxide pathway*. Curr Vasc Pharmacol, 2003. **1**(3): p. 335-46.
163. Huynh, N.N. and J. Chin-Dusting, *Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(1-2): p. 1-8.
164. El-Remessy, A.B., et al., *Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1995-2004.
165. Filippin, L., et al., *Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 2008. **152**(3): p. 415-22.
166. Eiserich, J.P., et al., *Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 3): p. 745-9.
167. Sessa, W.C., et al., *The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8607-11.
168. Moncada, S., *The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1993. **28**: p. 97-9.
169. Mittal, M.K., et al., *Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 1): p. G416-22.
170. Shah, V., et al., *Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat*. Gastroenterology, 1999. **117**(5): p. 1222-8.
171. Fulton, D., et al., *Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt-versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30349-57.
172. Erwin, P.A., et al., *Subcellular targeting and differential S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 151-7.

173. Laleman, W., et al., *A role for asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of portal hypertension in rats with biliary cirrhosis*. Hepatology, 2005. **42**(6): p. 1382-90.
174. Khatri, J.J., et al., *Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma*. Circulation, 2004. **109**(4): p. 520-5.
175. Gao, N., et al., *Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells*. Mol Cell Biochem, 2004. **255**(1-2): p. 33-45.
176. Ceriello, A., et al., *Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1076-82.
177. Turko, I.V. and F. Murad, *Protein nitration in cardiovascular diseases*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(4): p. 619-34.
178. Konopka, T.E., et al., *Nitric oxide synthase II gene disruption: implications for tumor growth and vascular endothelial growth factor production*. Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 3182-7.
179. Dimmeler, S., C. Hermann, and A.M. Zeiher, *Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis?* Eur Cytokine Netw, 1998. **9**(4): p. 697-8.
180. Morbidelli, L., et al., *Angiosuppressive and angiostimulatory effects exerted by synthetic partial sequences of endostatin*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(14): p. 5358-69.
181. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
182. Tsai, M.H., et al., *Mesenteric vasoconstriction triggers nitric oxide overproduction in the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats*. Gastroenterology, 2003. **125**(5): p. 1452-61.
183. Iwakiri, Y., et al., *Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2084-90.
184. Chen, Y.C., et al., *Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 1075-87.
185. Murray, B.M. and M.S. Paller, *Decreased pressor reactivity to angiotensin II in cirrhotic rats. Evidence for a post-receptor defect in angiotensin action*. Circ Res, 1985. **57**(3): p. 424-31.
186. Lee, S.S., et al., *Desensitization of myocardial beta-adrenergic receptors in cirrhotic rats*. Hepatology, 1990. **12**(3 Pt 1): p. 481-5.
187. Heinemann, A., et al., *Vasopressin reverses mesenteric hyperemia and vasoconstrictor hyporesponsiveness in anesthetized portal hypertensive rats*. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 646-54.
188. Song, P.P., et al., *[Effect of lidocaine on the impairment of learning and memory function and central cholinergic system after transient global cerebral ischemia in mice]*. Beijing Da Xue Xue Bao, 2006. **38**(2): p. 164-9.
189. Ramond, M.J., E. Comoy, and D. Lebec, *Alterations in isoprenaline sensitivity in patients with cirrhosis: evidence of abnormality of the sympathetic nervous activity*. Br J Clin Pharmacol, 1986. **21**(2): p. 191-6.
190. Henriksen, J.H., H. Ring-Larsen, and N.J. Christensen, *Sympathetic nervous activity in cirrhosis. A survey of plasma catecholamine studies*. J Hepatol, 1985. **1**(1): p. 55-65.

191. Coll, M., et al., *Down-regulation of genes related to the adrenergic system may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension.* J Hepatol, 2008. **49**(1): p. 43-51.