

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

FRANCIELLI LICKS

**AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) NA GASTROPATIA DA
HIPERTENSÃO PORTAL**

Porto Alegre

2013

FRANCIELLI LICKS

**AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) NA GASTROPATIA DA
HIPERTENSÃO PORTAL**

Orientadora: Profa. Dra. Norma Anair Possa Marroni

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre
2013

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

Dedico este trabalho

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo constantes que sempre me fortaleceram;

Ao meu irmão e irmã, pelo carinho e compreensão em momentos de ausência;

À minha orientadora, cujas mãos me guiaram por toda essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

O sucesso deste trabalho é fruto da união de muitas forças. Por isso, agradeço as muitas pessoas que me auxiliaram no desenvolvimento dessa dissertação, as quais presto singela homenagem neste momento.

Primeiramente agradeço aos meus pais, por terem consolidado em mim a importância e o valor do estudo. Agradeço também por todos os momentos em que me apoiaram, que torceram por mim e me amaram de maneira incondicional. Mãe e Pai, obrigada por serem as pessoas lindas que são, eu amo vocês.

Agradeço também aos meus irmãos Irineu e Dhiovanna, pela compreensão e carinho. Irineu, meu mano, que participou desde o início dessa caminhada, tenha certeza que grande parte do meu sucesso eu devo a você. Obrigada por ser muito mais que meu irmão e sim meu amigo, confidente e parceiro de todas as horas. E Didi, minha pequena, você faz a minha vida mais feliz! Obrigada pelos sorrisos, abraços e amor mais que sincero.

À professora Dr^a Norma Marroni, uma pessoa que muito admiro, que me acolheu desde a minha graduação, e me educou durante todos esses anos para que eu fosse hoje a pessoa e profissional que sou. Obrigada por tudo. Agradeço também ao Dr. Cláudio Marroni, pelo auxílio na execução deste projeto e inúmeras correções e orientações.

Aos todos os colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental / Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Graziela, Éder, Darlan, e todos os outros integrantes do grupo, pelo apoio na execução deste trabalho. Cada um de vocês teve participação imprescindível no desenvolvimento deste projeto, e a todos meu sincero muito obrigada. Em especial agradeço a Renata Hartmann, pela cumplicidade e parceria sempre presentes. Ao longo desse tempo você se tornou não só uma colega, mas também uma grande amiga. Também às colegas da ULBRA, sempre me ajudando e estimulando, Josiele, Elizângela e Tatiele, obrigada por tudo, por estarem presentes nos altos e baixos, sempre ao meu lado. À minha querida Silvia, também agradeço por tudo, você é uma

pessoa muito especial. Obrigada por todas as vezes que você me ajudou e apoiou, durante todo esse período. Agradeço também á Camila que, mesmo de longe, acompanhou todo o meu desenvolvimento, me incentivando e ajudando de inúmeras formas.

Agradeço aos professores do nosso grupo de pesquisa, em especial ao Dr. Henrique Fillmann, por ter me auxiliado sempre, durante todo esse período. Muito obrigada de coração pela disponibilidade e apoio. Também á Dr^a Marilene Porawski, Dr. Alexandre Simões Dias e Dr^a. Maria Isabel Morgan Martins pelo constante auxílio e incentivo.

Agradeço aos colegas e professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia, pelas oportunidades de aprendizagem a mim proporcionadas nesses últimos dois anos.

Por fim agradeço a Deus por ter colocado na minha caminhada, pessoas tão importantes e especiais. E também por não ter saído do meu lado, nem por um só segundo, durante toda a minha vida.

RESUMO

A Hipertensão Portal (HP) é uma síndrome clínica associada ao desenvolvimento de circulação hiperdinâmica e varizes gastroesofágicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antioxidante da N-Acetilcisteína (NAC) em ratos com hipertensão portal. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A HP foi induzida por meio do modelo experimental de ligadura parcial da veia porta (LPVP) e os animais divididos em quatro grupos experimentais (n=6): Sham-operated (SO), SO + NAC, LPVP e LPVP + NAC. A NAC (10 mg/kg ip.) foi administrada diariamente durante 7 dias, iniciados no 8º dia após a cirurgia. Foi mensurada a pressão portal na veia mesentérica, e o dano hepático foi avaliado através das enzimas AST, ALT e FA. Para avaliação do dano oxidativo no estômago, foi feita a avaliação da lipoperoxidação através da técnica das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD e GPx. Também foram avaliados os níveis de metabólitos do óxido nítrico (nitritos e nitratos), e, para avaliação dos aspectos histológicos, mensuramos os calibres dos vasos na submucosa gástrica, bem como analisamos lâminas coradas com hematoxilina-eosina. **RESULTADOS:** Os animais do grupo LPVP apresentaram um aumento significativo nos valores de pressão portal, TBARS e metabólitos do óxido nítrico quando comparados ao grupo SO. Esses valores foram acompanhados por uma diminuição das enzimas antioxidantes SOD e GPx. Na análise histológica, notaram-se vasos dilatados e presença de edema na mucosa gástrica dos animais do grupo LPVP. O tratamento com a NAC foi capaz de diminuir os valores da pressão portal, TBARS e metabólitos do óxido nítrico quando comparados ao grupo LPVP. Além disso, foi observado um aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). Na avaliação da histologia do estômago, a NAC atenuou o edema e vasodilatação nos animais do grupo LPVP +NAC. Não houve diferença estatística significativa entre os valores das enzimas hepáticas. **CONCLUSÕES:** Sugerimos que a administração da N-acetilcisteína em ratos com hipertensão portal é eficaz na

redução ao dano gástrico infligido pelo modelo experimental de ligadura parcial da veia porta.

Palavres-chave: Hipertensão portal, Estresse oxidativo, N-acetilcisteína

ABSTRACT

Portal Hypertension (PH) is a clinical syndrome associated with the development of a hyperdynamic circulation and gastroesophageal varices. The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of N-Acetylcysteine (NAC) on portal hypertensive rats. MATERIAL/METHODS: PH was induced by partial portal vein ligation (PPVL), and the animals were divided into four experimental groups (n = 6): Sham-operated (SO), SO + NAC, PPVL and PPVL + NAC. NAC (10 mg / kg ip.) was administered for 7 days daily, beginning on the 8th day after surgery. Portal pressure was measured in mesenteric vein and liver damage was assessed by the enzymes AST, ALT and FA. To assess oxidative damage in the stomach, the technique of substances that react to thiobarbituric acid (TBARS) was performed and the activities of antioxidant enzymes dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) was evaluated. The nitric oxide metabolites levels (nitrites and nitrates) were also evaluated and histological evaluation was made by measuring the vessels sizes in the gastric submucosa and blades stained with hematoxylin-eosin were analyzed. RESULTS: PPVL animals showed a significant increase in portal pressure, TBARS and nitric oxide metabolites values when compared to the SO group. These values were accompanied by a decrease of antioxidant enzymes SOD and GPx. In histological analysis, dilated vessels and edema in gastric mucosa of PPVL group were noted. Treatment with NAC was able to decrease portal pressure, TBARS and nitric oxide metabolites values when compared to PPVL. Furthermore, an increase in antioxidant enzymes SOD and GPx activity was observed. In the assessment of stomach histology, NAC attenuated the vasodilation and edema in PPVL + NAC group. There was no statistically significant difference between the values of liver enzymes. CONCLUSIONS: We suggest that N-acetylcysteine administration in rats with portal hypertension is effective in reducing gastric damage inflicted by the experimental model of partial portal vein ligation.

Keywords: Portal hypertension, Oxidative stress, N-Acetylcysteine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho que evidencia o sistema venoso portal.	17
Figura 2: Esquema que mostra as causas da hipertensão portal.....	19
Figura 3: Fotografia da região abdominal mostrando os colaterais portossistêmicos, apontados pela flecha.....	20
Figura 4: Desenho que evidencia as varizes gástricas (VG) e esofágicas (VE)20	
Figura 5: Endoscopia da mucosa gástrica demonstrando um quadro de gastropatia moderada (A) e grave (B).	22
Figura 6: Cascata de reações que mostra a formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres.	24
Figura 7: Reação que mostra a formação do NO.....	25
Figura 8: Esquema que mostra as isoformas da NO-sintase.	26
Figura 9: Fórmula química da N-acetilcisteína.	31
Figura 10: Modelo de ligadura parcial da veia porta.....	38
Figura 11: Incisão na região abdominal do rato onde se observa a veia porta, apontada pela flecha.	39
Figura 12: Região abdominal do rato com isolamento da veia porta, apontado pela flecha.	39
Figura 13: Região abdominal do rato mostrando a ligadura parcial da veia porta, apontada pela flecha.....	40
Figura 14: Procedimento de administração da N-acetilcisteína.....	40
Figura 15: Polígrafo para registro da pressão da marca Lettica (Rochester, MI, USA).....	42
Figura 16: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de pressão portal nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.	49
Figura 17: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis das enzimas hepáticas AST, ALT e FA nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.....	49

Figura 18: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de TBARS nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.....	50
Figura 19: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de SOD nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.....	51
Figura 20: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de GPx nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.....	52
Figura 21: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de NO nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.	52
Figura 22: Fotomicrografia de estômago de animais dos grupos.....	53
Figura 23: Valores médios obtidos na mensuração do calibre dos vasos nos grupos SO: Sham-operated, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
CAT	Catalase
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
cNOS	Óxido nítrico sintase dependente de cálcio
DNMA	Dimetilnitrosamina
e ⁻	Elétron
EROS	Espécies reativas de oxigênio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FA	Fosfatase alcalina
G	Glandular
GHP	Gastropatia da hipertensão portal
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona dissulfeto
GST	Glutaciona s-transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HP	Hipertensão portal
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
LPO	Lipoperoxidação
LPVP	Ligadura parcial de veia porta
LPVP+NAC	Ligadura parcial de veia porta tratado com N-acetilcisteína
µl	Microlitro
µm	Micromolar
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MM	Muscular da mucosa
mmHg	Milímetros de mercúrio
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Solução fisiológica

NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nm	Nanômetro
Nmol	Nanomol
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
'O ₂	Oxigênio singlet
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Radical ânion superóxido
OH [·]	Radical Hidroxil
ONOO	Peroxinitrito
PIH	Provas de integridade hepática
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
POD	Piruvato oxidase
PP	Pressão portal
Rpm	Rotação por minuto
SM	Submucosa
SO	Sham-operated - controle (simulação da cirurgia)
SO+NAC	Sham operated - controle tratado com N-acetilcisteína
SOD	Superóxido Dismutase
TAA	Tioacetamida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TIPS	Anastomose portossistêmica intra-hepática transjugular
TNF-α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TNBS	Ácido trinitro benzenosulfônico
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1 SISTEMA VENOSO PORTAL	17
1.2 HIPERTENSÃO PORTAL.....	18
1.3 GASTROPATIA DA HIPERTENSÃO PORTAL	21
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO.....	23
1.4.1 Espécies reativas de oxigênio e radicais livres	23
1.4.2 Óxido nítrico	25
1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES	28
1.5.1 Antioxidantes enzimáticos.....	28
1.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos.....	30
1.6 N-ACETILCISTEÍNA.....	31
1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERTENSÃO PORTAL	32
2 OBJETIVOS DO ESTUDO	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA	36
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
3.2.1 Animais	36
3.2.2 Considerações bioéticas	36
3.2.3 Grupos experimentais	37
3.2.4 Procedimentos experimentais	38
3.2.4.1 Desenvolvimento do modelo de hipertensão portal pela ligadura parcial de veia porta	38
3.2.4.2 Administração do veículo e da N-acetilcisteína	40
3.2.4.3 Aferição da pressão venosa portal, morte dos animais e obtenção das amostras de tecido e sangue	41
3.3 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	43
3.3.1 Preparação do homogeneizado	43
3.3.2 Dosagem de proteína.....	43
3.4 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	43
3.4.1 Determinação dos níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico.....	43
3.4.2 Atividade da enzima superóxido dismutase	44
3.4.3 Atividade da enzima glutatona peroxidase	45
3.5 MEDIDA DE NITRITOS E NITRATOS.....	46
3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS.....	47
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4 RESULTADOS	48
4.1 VERIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA PRESSÃO PORTAL	48
4.2 PROVAS DE INTEGRIDADE HEPÁTICA.....	49

4.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO	50
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE SUPERÓXIDO DISMUTASE	50
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ANTIOXIDANTE GLUTATIONA PEROXIDASE	51
4.6 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO NO.....	52
4.7 DETERMINAÇÃO DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA	53
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	75
ANEXO A - Artigo redigido com os resultados da presente dissertação.....	76

INTRODUÇÃO

A hipertensão portal (HP) é resultante do aumento patológico da pressão portal com conseqüente desenvolvimento de vasos colaterais que redistribuem o fluxo sanguíneo do sistema porta para a grande circulação ^[1].

A dilatação dos vasos, principalmente no estômago e esôfago, leva a um quadro de gastropatia da hipertensão portal (GHP), que se caracteriza pela vasodilatação na submucosa gástrica. Essas alterações hemodinâmicas desencadeiam sangramento digestivo em 80-90% dos pacientes ^[2], devido à progressiva dilatação dos vasos que se rompem e levam à hemorragia ^[1].

O modelo de ligadura parcial da veia porta (LPVP) é o mais utilizado para estudar a patofisiologia da hipertensão portal pré-hepática. Esse modelo foi desenvolvido por Sikuller em 1985 ^[3], e diversos estudos experimentais demonstraram que, em animais, a LPVP manifesta anormalidades gástricas equivalentes à GHP em humanos. Uma semana após o procedimento cirúrgico, os animais operados já estabelecem o quadro de GHP, sendo que aproximadamente 100% destes apresentam *shunting* portossistêmico e circulação colateral hiperdinâmica ^[4]. Nesse contexto, inúmeros trabalhos, inclusive desenvolvidos em nosso laboratório, utilizam esse modelo experimental para estudar a hipertensão portal ^[43,68].

O estresse oxidativo é apontado como fator desencadeante para a progressão de diferentes doenças. Na hipertensão portal, está relacionado à evolução da circulação colateral ^[5], cujo desenvolvimento é associado à superprodução de óxido nítrico (NO). Recentemente, níveis plasmáticos de NO foram encontrados em pacientes com gastropatia da hipertensão portal, estando, assim, este radical livre implicado na patogênese da GHP ^[6]. A síntese demasiada de NO induz à formação de peroxinitrito ([•]ONOO) através da reação com espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, aumentando, dessa forma, o dano oxidativo na mucosa gástrica ^[7].

O uso da terapia antioxidante pode minimizar as conseqüências do estresse oxidativo na hipertensão portal ^[8]. A N-acetilcisteína (NAC) é um

antioxidante confiável, acessível e bem tolerado, amplamente utilizado na clínica, possuindo um mecanismo bastante estudado. A NAC é um *scavenger* de radicais livres capaz de elevar os níveis de glutathione, importante antioxidante endógeno do nosso organismo. Ainda, o componente tiol da NAC pode ligar-se ao óxido nítrico formando nitrotiol, diminuindo, assim, a biodisponibilidade de NO ^[9].

Desta forma, o objetivo primordial deste estudo foi avaliar a ação antioxidante da N-Acetilcisteína por meio da avaliação do dano hepático, da lipoperoxidação na mucosa gástrica através dos níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), a mensuração dos metabólitos do óxido nítrico (nitritos e nitratos) e a análise histológica.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 SISTEMA VENOSO PORTAL

O sistema venoso portal é constituído por veias responsáveis pelo transporte do sangue da região intra-abdominal do tubo digestivo, baço, pâncreas e vesícula biliar em direção ao fígado ^[11]. O vaso que conduz o sangue proveniente dessas regiões é a veia porta, formada anatomicamente pela união da veia mesentérica superior e esplênica ^[13].

No hilo hepático, a veia porta divide-se em dois ramos: direito e esquerdo. O ramo direito promove o aporte sanguíneo para o lobo direito do fígado, e o ramo esquerdo supre de sangue os lobos esquerdo, caudado e quadrado. As veias esplênicas se unem com as gástricas curtas formando a esplênica principal, que recebe sangue da veia gastroepiplóica esquerda e de vasos que drenam o pâncreas. A mesentérica inferior drena o sangue do cólon esquerdo e reto, unindo-se posteriormente à veia esplênica. A veia gástrica esquerda une-se à veia porta, e a mesentérica superior é formada por vasos que drenam o lado direito do cólon, intestino delgado e cabeça do pâncreas ^[11].

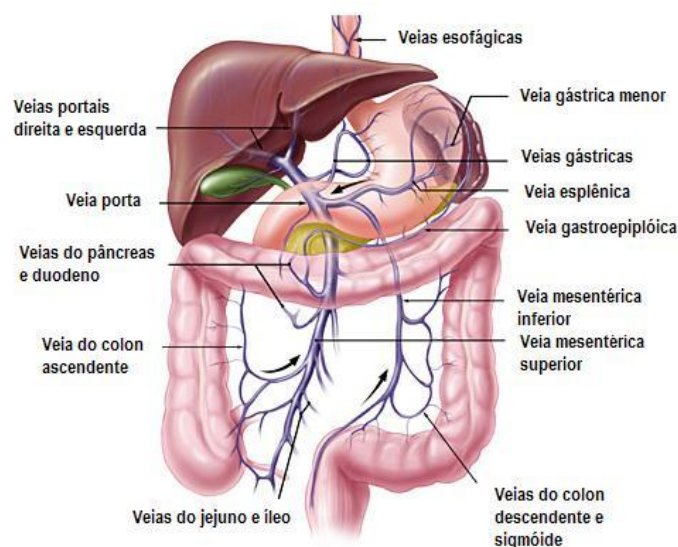


Figura 1: Desenho que evidencia o sistema venoso portal.
Fonte: adaptada ^[83].

A organização desse sistema permite que todo o sangue venoso, drenado do trato gastrointestinal, passe pelo território hepático antes de atingir a circulação sistêmica. O sangue portal é levado pelos ramos terminais da veia porta até os sinusóides e, desses, para as veias centrolobulares, que drenam para as veias hepáticas e essas, por sua vez, para a veia cava inferior, desembocando na aurícula direita e, após, na grande circulação ^[12].

O fluxo venoso no sistema porta é caracterizado por uma baixa resistência, alto fluxo e baixa pressão, sendo essa oscilante entre 5-10 mmHg em adultos, dependendo do método de mensuração empregado ^[11].

Qualquer alteração homeostática nesse sistema, desencadeada principalmente em virtude de uma obstrução ao fluxo sanguíneo, acarretará no aumento de pressão no sistema portal, levando a graves consequências e ao quadro denominado de hipertensão portal ^[1].

1.2 HIPERTENSÃO PORTAL

A Hipertensão Portal é uma síndrome hemodinâmica caracterizada pelo aumento do gradiente de pressão portal, definido pela diferença de pressão entre a veia porta e a veia cava inferior ^[10].

A hemodinâmica da circulação sanguínea é definida por meio de uma relação física que estabelece o conceito de fluxo (Q), a Lei de Ohm. Essa relação estabelece que o fluxo ao longo de um vaso é determinado por dois fatores:

- 1- O gradiente de pressão entre as extremidades deste vaso (ΔP).
- 2- A resistência vascular oponente ao fluxo (R).

Dessa forma, o gradiente de pressão portal pode ser matematicamente definido da seguinte maneira: $\Delta P = Q \times R$. A pressão portal pode aumentar se houver aumento do fluxo sanguíneo portal ou aumento da resistência vascular, ou ambos ^[11].

O aumento da resistência vascular é o mecanismo inicial na gênese da hipertensão portal. Essa elevação é desencadeada devido ao surgimento de um obstáculo anatômico que pode ocorrer em qualquer nível do sistema venoso portal ^[13].

De acordo com a localização desse obstáculo, as causas podem ser classificadas em pré-hepática (trombose da veia porta ou esplênica); intra-hepática (cirrose) e pós-hepática (síndrome de Budd-Chiari) ^[13].

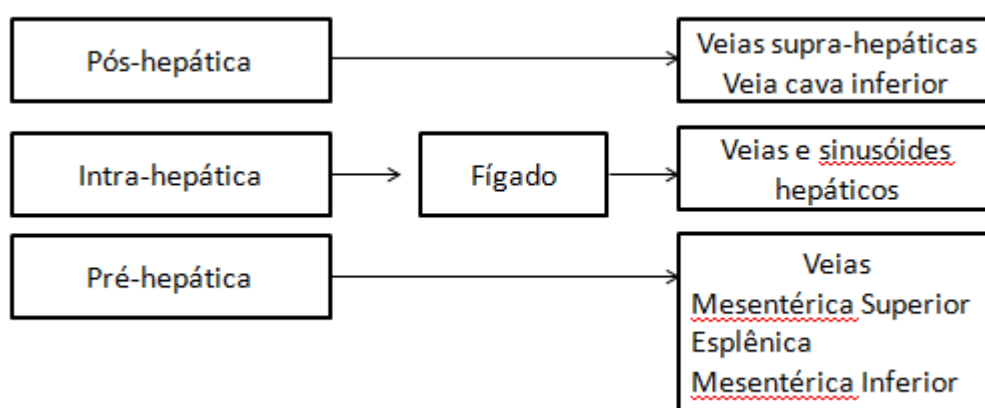


Figura 2: Esquema que mostra as causas da hipertensão portal.
Fonte: adaptada ^[11].

A causa mais frequente para o desenvolvimento da hipertensão portal é a cirrose, doença em que o aumento da resistência é principalmente causado pela distorção da arquitetura hepática, através da fibrose e nódulos regenerativos ^[13].

Em uma situação fisiológica, a pressão no sistema portal gira em torno de 5-10 mmHg. Quando é observado um aumento persistente desse valor, considera-se esta situação característica de um quadro de hipertensão portal ^[11].

O aumento progressivo da pressão no sistema porta leva à dilatação dos vasos, com conseqüente formação de colaterais portossistêmicos, que desviam o sangue proveniente do sistema portal diretamente para a circulação sistêmica, contornando o fígado ^[10]. Nesse contexto, ocorre angiogênese, bem

como dilatação de colaterais pré-existentes, no intuito de acomodar o volume sanguíneo esplâncnico ^[12].



Figura 3: Fotografia da região abdominal mostrando os colaterais portossistêmicos, apontados pela flecha.
Fonte: adaptada ^[18].

As complicações clínicas da HP estão relacionadas principalmente à formação desses vasos colaterais e a circulação hiperdinâmica. O surgimento de varizes pode ocorrer em qualquer segmento do tubo digestivo, sendo as mais importantes aquelas localizadas no estômago e esôfago, que se desenvolvem desde o fundo gástrico até o terço superior do esôfago ^[12].

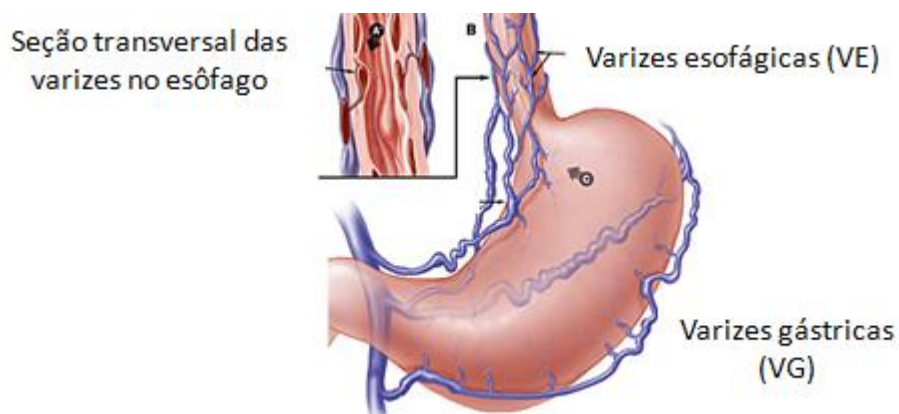


Figura 4: Desenho que evidencia as varizes gástricas (VG) e esofágicas (VE)
Fonte: adaptada ^[19].

Episódios hemorrágicos decorrentes da ruptura desses vasos representam uma das mais temidas consequências da doença, porém, não são as únicas de um quadro de HP, destacando-se a ascite, a encefalopatia hepática e a síndrome hepatorenal ^[12].

1.3 GASTROPATIA DA HIPERTENSÃO PORTAL

A Gastropatia da Hipertensão Portal (GHP) é frequentemente diagnosticada em pacientes com HP, independente de fatores como sexo, idade e grau de comprometimento hepático ^[12].

Uma grande variedade de termos, dentre eles gastrite erosiva, erosões gástricas agudas e ectasia vascular, foram utilizados para descrever o quadro de lesões gástricas frequente em 20 - 80% dos pacientes diagnosticados com hipertensão portal ^[16]. No entanto, atualmente, a terminologia característica utilizada é gastropatia da hipertensão portal (GHP), que define as alterações da mucosa gástrica evidenciadas na endoscopia de pacientes com hipertensão portal. Essas alterações são principalmente representadas pelo surgimento de varizes no estômago desses pacientes ^[14].

A GHP é tipicamente localizada no fundo gástrico e na parte superior do corpo do estômago, entretanto, pode afetar toda a área estomacal inclusive outras áreas do trato gastrintestinal ^[16]. A intensidade do quadro pode ser classificada em moderada ou grave. No caso de moderada, a GHP compreende um quadro de padrão mosaico ou couro-de-cobra, enquanto a grave é caracterizada ainda por manchas avermelhadas (“*red spots*”) que podem ou não apresentar sangramento espontâneo (Figura 5) ^[14].

As alterações que dão origem à GHP são dependentes da dilatação dos vasos da mucosa e submucosa do estômago, bem como o aumento do fluxo sanguíneo nestes locais. Esses fatores são consequências do desenvolvimento da circulação hiperdinâmica característica da hipertensão portal. Até agora, inúmeros fatores vêm sendo investigados na tentativa de elucidar a patogênese da GHP, incluindo fatores humorais e distúrbios locais na regulação do tônus

vascular. Dessa forma, a gastropatia da hipertensão portal é classificada como uma desordem vascular ^[14].

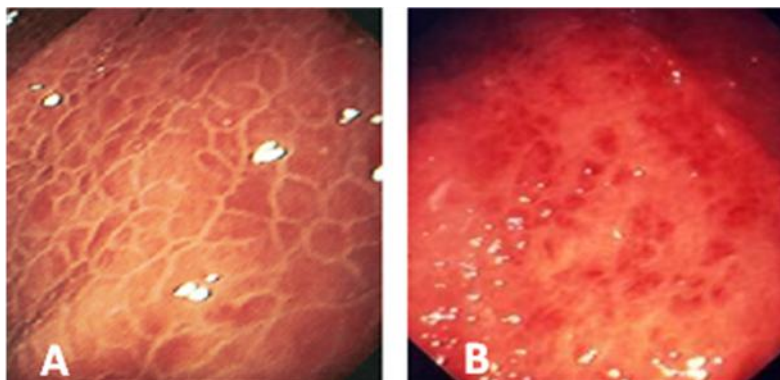


Figura 5: Endoscopia da mucosa gástrica demonstrando um quadro de gastropatia moderada (A) e grave (B).
Fonte: adaptada ^[20,82].

Aproximadamente um terço dos pacientes com varizes esofágicas desenvolvem sangramento agudo, sendo que cada episódio de hemorragia está associado a um risco de mortalidade de cerca de 30% ^[15]. Os sangramentos são desencadeados a partir de todos os eventos vasculares iniciados pelo aumento da pressão portal e progressiva dilatação dos vasos, fazendo com que ocorra ruptura e hemorragia ^[10].

A GHP é comumente observada em pacientes com hipertensão portal. No entanto, os mecanismos relacionados a tal doença não são facilmente compreendidos. O tratamento é geralmente focado na redução da pressão portal, medida cuja intenção é minimizar as consequências desencadeadas por este quadro ^[14].

O estresse oxidativo é associado e sugerido como um importante fator na progressão de diferentes doenças hepáticas, dentre elas a hipertensão portal. O potencial das espécies reativas de oxigênio (EROs) de se ligar a proteínas, quebrar DNA e promover dano celular através da reação com diferentes componentes celulares é o motivo pelo qual essas espécies são associadas a inúmeras desordens na clínica ^[8].

O papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica foi inicialmente proposto por Fernando *et al.*, 1998 ^[17]. A administração de N-acetilcisteína resultou em decréscimo da pressão portal, óxido nítrico, fator de necrose tumoral (TNF- α) e F₂-Isoprostanos, resultados esses atribuídos à diminuição do fluxo sanguíneo no sistema portal. No entanto, os mecanismos através dos quais a terapia antioxidante foi capaz de minimizar os danos acarretados pelo modelo experimental de ligadura parcial da veia porta (LPVP) não foram totalmente elucidados.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

1.4.1 Espécies reativas de oxigênio e radicais livres

O oxigênio (O₂) é um elemento essencial à vida aeróbica. No entanto, em determinadas situações, é também potencialmente tóxico para as células ^[21].

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

Esse processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia, pode gerar as espécies reativas de oxigênio (EROs) através de intermediários gerados durante o processo de redução parcial do oxigênio ^[22].

Nos organismos aeróbicos, o O₂ é reduzido à água (H₂O) no final da respiração mitocondrial. Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do O₂, gerando o radical ânion superóxido (O₂^{•-}). Ao se adicionar um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxil (OH[•]). Assim, a formação de espécies reativas de oxigênio deve-se ao fato de o O₂ se reduzir à água de

forma monovalente, permitindo a geração de metabólitos intermediários durante o processo.

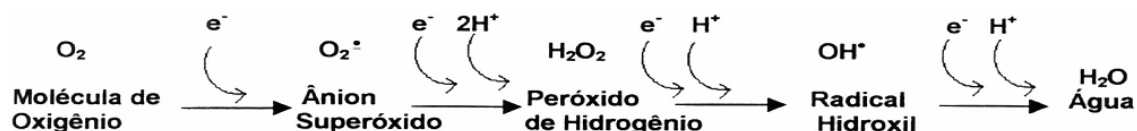


Figura 6: Cascata de reações que mostra a formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres.

Fonte: adaptada ^[26].

Os intermediários gerados durante a redução parcial do oxigênio são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o “oxigênio singlet” (1O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). Essas moléculas são capazes de existir independentemente, e são denominadas espécies reativas de oxigênio ^[23].

O termo radical livre é utilizado para definir uma espécie química, que pode ser um átomo, um metal de transição ou uma molécula que possua um elétron não pareado no seu último orbital. Esse elétron confere a essas moléculas uma alta reatividade, devido a sua tendência de adquirir um segundo elétron para esse orbital desestabilizado. A estabilização ocorre através da remoção de elétrons de moléculas vizinhas; dessa forma essas espécies possuem o poder de oxidar moléculas biológicas, como proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucleicos ^[24].

Podemos citar como radicais livres o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o óxido nítrico (NO), que podem ser formados durante o metabolismo normal de qualquer célula pela perda de elétrons de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por não-radical. Também podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada se cada um dos átomos ficar com um elétron, num processo conhecido como fissão homolítica ^[25].

O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação aos seus níveis fisiológicos, levando a um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes ^[24]. Esse desequilíbrio apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídios

de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Assim, está relacionado a várias doenças, como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, doenças do fígado, diabetes mellitus, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral [24].

Na hipertensão portal, o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica foi proposto, inicialmente, por Fernando *et al.*, 1998 que utilizaram o modelo experimental de ligadura parcial da veia porta [17].

Estudos anteriores demonstraram que o óxido nítrico parece exercer um papel importante na patogênese da hipertensão portal [29], bem como elevados níveis do fator de necrose tumoral (TNF- α) [28], ambos estando relacionados ao dano oxidativo.

1.4.2 Óxido nítrico

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

Essa molécula pode atuar como oxidante ou redutor, é rapidamente destruída pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitritos e nitratos [32], e também pode reagir facilmente com o radical superóxido ou metais como ferro, cobalto, manganês ou cobre [33].

A síntese do NO é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS); para tanto, ocorre a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e óxido nítrico [35].

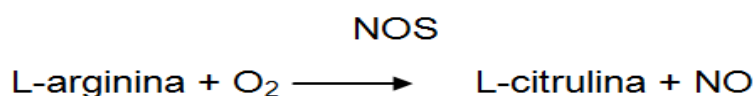


Figura 7: Reação que mostra a formação do NO.
Fonte: adaptada [36].

Muitas isoformas de NOS já foram identificadas em diferentes tecidos, e diversas delas já tiveram seus genes clonados. Através da análise sequencial de aminoácidos, chegou-se à conclusão de que essas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Dessa forma, são agrupadas em duas categorias: NOS constitutiva (c-NOS) e NOS induzível (i-NOS), diferindo em relação ao peso molecular, forma de ativação e capacidade de síntese de NO ^[35].

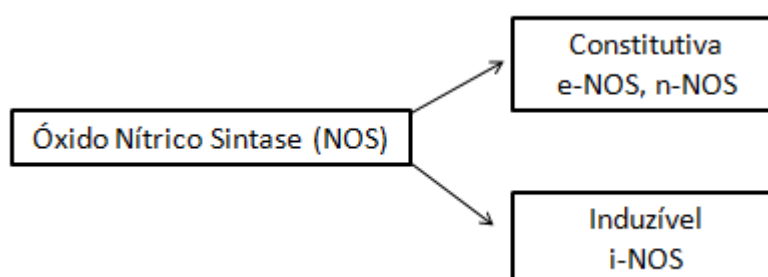


Figura 8: Esquema que mostra as isoformas da NO-sintase. Fonte: adaptada ^[31].

Na categoria da NOS constitutiva, encontramos a NOS neuronal (n-NOS), normalmente presente nos neurônios e a NOS endotelial (e-NOS), presente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas ^[31]. Ambas são expressas continuamente na ausência de agentes indutores, ou seja, apresentam uma concentração basal e são dependentes de íons cálcio (Ca^{++}) e calmodulina ^[36].

No entanto, na categoria da NOS induzível, ao contrário da primeira, a i-NOS não é detectada em condições basais, requerendo, para sua expressão e atividade, síntese protéica. Endotoxinas bacterianas, juntamente com citocinas como TNF- α , interleucinas (IL-1 β) ou imunoglobulinas (IG-g), induzem a sua síntese nas 2-4 primeiras horas após a exposição a um agente, e esta pode ficar ativa por até 20 horas posteriores a sua síntese ^[36].

Quanto à ação de cada uma das NOS, sabe-se que a eNOS favorece a diminuição da pressão sanguínea e auxilia na inibição da agregação

plaquetária; a nNOS regula a transmissão neuronal e responde por funções de um neurotransmissor; e as iNOS formam NO induzido por certas citotoxinas, estando intimamente relacionada aos processos de defesa do organismo [34].

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

Os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos das isoformas do óxido nítrico estão relacionados aos seus níveis de concentração. Quando atuam em baixas concentrações, comportam-se como mensageiro e fator de proteção celular (antioxidante), interagindo com metais de transição e outros radicais livres. Em concentrações altas, e formando trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) ou peroxinitrito (ONOO), o NO passa a agir como espécie ativa de nitrogênio, responsável por inúmeras ações citotóxicas em um quadro conhecido como estresse nitrosativo [22,34].

A hipertensão portal já foi previamente associada ao estresse oxidativo e à super-produção de óxido nítrico, ambos possuindo um importante papel nesse distúrbio hemodinâmico [37].

Kanwar *et al.*, 1996 demonstraram um aumento na atividade da NOS dependente de cálcio após estenose da veia porta [38]. Muitos fatores, incluindo o estresse de cisalhamento, vasopressina, angiotensina II e norepinefrina, podem elevar a forma constitutiva da NOS, e todos esses fatores estão aumentados na hipertensão portal [39]. Dessa forma, observamos na HP uma alta concentração de óxido nítrico, estando esse aumento intimamente relacionado com o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica e estresse oxidativo [40].

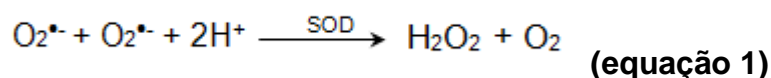
1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES

A fim de se proteger contra os danos acarretados pelo estresse oxidativo, necessitamos de um sistema capaz de prevenir a formação de radicais livres e neutralizar os danos oxidativos, o que é feito através dos antioxidantes, que podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações – comparadas àquelas de um substrato oxidável (macromoléculas como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA) – atrasa ou impede a oxidação daquele substrato ^[41]. Dentre esses sistemas de defesa, encontramos o enzimático, formado por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona s-transferase (GST), e/ou não enzimático, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), flavonóides e β -carotenos ^[24].

1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos compreendem agentes que cataliticamente removem os radicais livres e outras espécies ativas. Dentre essas enzimas, podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) ^[22].

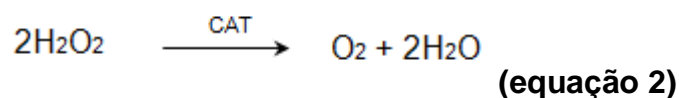
A SOD atua na dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 e O_2 , sendo que o primeiro é menos reativo, e pode ser degradado por outras enzimas (equação 1) ^[42].



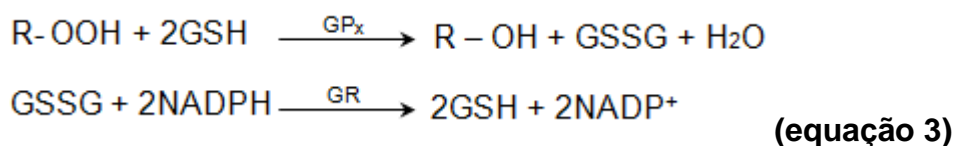
O H_2O_2 formado pela ação da enzima SOD, apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando radical hidroxila. Assim, a remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais

afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos ^[41].

A ação da CAT, que é bastante específica, pode ser observada na equação 2, na qual essa enzima catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ^[41].



Entre as peroxidases, destaca-se a enzima glutathiona peroxidase (GP_x), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que será, por sua vez, regenerada por ação da glutathiona redutase com consumo de fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). Neste processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, formando glutathiona dissulfeto (GSSG) ^[24] (equação 3).



Assim como as enzimas que atuam removendo os radicais livres, existem substâncias com propriedades antioxidantes, capazes de evitar reações oxidativas em cadeia, como a lipoperoxidação (LPO), conhecidas como defesas antioxidantes não-enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathiona, o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), os β -carotenos e os flavonóides. ^[43-46]

1.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Dentre as substâncias antioxidantes não enzimáticas, podemos comentar algumas que se destacam. A glutathiona participa de reações de enzimas antioxidantes tais como a glutathiona peroxidase e a transferase. Dessa forma, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de espécies reativas de oxigênio, através de uma via não enzimática. A glutathiona é um tripeptídeo de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina, cuja ação deve-se à presença de um grupamento sulfidril, que atua como doador de elétrons ^[47].

O ácido ascórbico (vitamina C) é um composto hidrossolúvel que atua como cossustrato na biossíntese de colágeno, catecolaminas e carnitina. Este composto atua como *scavenger* de $O_2^{\circ-}$ e OH° , ou seja, um antioxidante varredor de radicais livres ^[48].

O α -tocoferol (vitamina E) possui a capacidade de neutralizar radicais, absorvendo a sua energia de excitação. A vitamina E age principalmente com o oxigênio *singlet*, em concentrações baixas e com alta afinidade à luz ^[49].

Os flavonóides são fitoterápicos descritos como antioxidantes, presentes nas folhas e partes externas das plantas. Muitos desses compostos estão sendo estudados e vêm apresentando resultados bastante promissores. Nosso laboratório obteve dados importantes ao estudar, por exemplo, o flavonóide quercetina, em modelos experimentais de cirrose induzida por ligadura de ducto biliar ^[44] e tetracloreto de carbono (CCl_4) ^[45], bem como em modelo de diabetes induzida por streptozotocina ^[46].

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

1.6 N-ACETILCISTEÍNA

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico amplamente utilizado na clínica médica, contendo um grupo sulfidril formado pela seguinte fórmula química $C_5H_9NO_3S$ ^[50] (Figura 9).

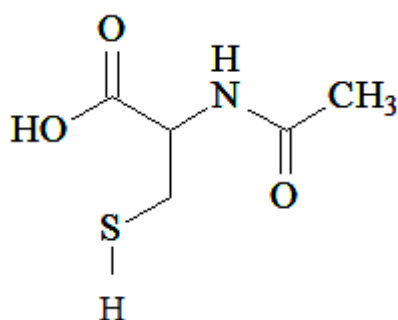


Figura 9: Fórmula química da N-acetilcisteína.
Fonte: adaptada ^[50].

Essa molécula é o derivado N-acetílico do aminoácido cisteína, parte da molécula tripeptídica da GSH, e é um dos principais contribuintes na redução de equivalentes na forma de grupos sulfidris ^[51]. A NAC é um importante antioxidante, que entra na célula, e, no citoplasma, é convertido a L-cisteína, precursor da GSH ^[52].

A ação da NAC na restauração dos níveis de GSH já é bem compreendida e considerada promissora como antioxidante, visto que a glutathione neutraliza espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através de vias diretas e indiretas ^[53]. A neutralização ocorre através da remoção de espécies reativas através da formação e separação de adutos, sendo essa catalisada pela glutathione peroxidase (GPx), em uma reação NADPH dependente. A glutathione oxidada resultante é, então, reduzida pela glutathione redutase para iniciar o ciclo novamente ^[53].

Inicialmente, a NAC foi aplicada no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção. Vem sendo utilizada na

clínica como antídoto no caso de overdose por paracetamol [55], nas doenças cardiovasculares [56], na isquemia hepática seguida por reperfusão [57], no câncer [58] e na psiquiatria [53].

Outras aplicações da NAC, apoiadas por evidências científicas, incluem a prevenção de doença obstrutiva pulmonar crônica, atenuação do vírus influenza, quando administrada antes da infecção, na fibrose pulmonar, na síndrome de ovários policísticos e como um adjunto na erradicação no *Helicobacter pylori* [59].

As aplicações clínicas da NAC provêm de sua habilidade de repor antioxidantes durante estresse, infecções, agressões tóxicas e condições inflamatórias. Dessa forma, o seu uso parece ser promitente em inúmeras doenças relacionadas a tais situações.

Na hepatologia, o possível papel da terapia antioxidante na modulação do tônus do leito vascular tem sido estudado por diferentes autores [5,17]. Na hipertensão portal, o uso da N-acetilcisteína parece contribuir de forma positiva para a atenuação dos danos acarretados por tal doença [17]. No entanto, estudos posteriores são necessários na tentativa de elucidar o mecanismo de ação da NAC na HP, bem como seu papel antioxidante nesta doença.

Tendo em vista tais considerações, propomo-nos a desenvolver o modelo experimental de hipertensão portal em ratos e utilizar a N-acetilcisteína como tratamento antioxidante, com o intuito de avaliar e esclarecer a possível proteção da mesma sobre a mucosa gástrica desses animais.

1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERTENSÃO PORTAL

Para que possamos estudar as alterações hemodinâmicas típicas da hipertensão portal, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nas anormalidades presentes nesta síndrome, é necessária a utilização de modelos animais, o que vêm permitindo o melhor entendimento da fisiopatologia desta doença.

Na literatura, encontramos descritos diferentes modelos experimentais para estudar a hipertensão portal, sendo que o critério de escolha na utilização de um modelo em particular dependerá dos objetivos específicos do estudo a ser promovido. Ratos e coelhos são as espécies mais utilizadas, porém, recentemente, a metodologia para estudo da hipertensão portal vem sendo implementada em camundongos, possibilitando o estudo em animais *knock out* e transgênicos [84-86]. Os modelos experimentais disponíveis, podem ser classificados como pós-hepáticos, intra-hepáticos e pré-hepáticos

Com relação ao modelo pós-hepático, o objetivo é reproduzir as características da síndrome de Budd-Chiari, em que são observados danos hepáticos consequência de uma obstrução venosa. A obstrução é promovida pela implantação da ameróide, dispositivo de aço inoxidável que permite uma lenta expansão em contato com o tecido molhado, nas veias hepáticas, induzindo uma progressiva oclusão do fluxo venoso hepático [87].

Os modelos experimentais intra-hepáticos podem ser diferenciados em pré-sinusoidais, sinusoidais e pós-sinusoidais. Como pré-sinusoidais, podemos citar o modelo de infecção experimental por *Schistosoma mansoni*, em que uma injeção com a cercariae do parasita é aplicada diretamente na parede abdominal [88,89]. Como exemplo de sinusoidal, existem diferentes modelos de cirrose descritos na literatura, como a ligadura de ducto biliar [90,78], cirrose induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) [91,45], tiocetamida (TAA) [92,93] e dimetilnitrosamina (DNMA) [94]. Em modelo pós-sinusoidal, a administração de monocrotalina por gavagem desencadeia oclusão venosa e consequente hiperbilirrubinemia, hepatomegalia e ascite [95].

O modelo pré-hepático mais amplamente utilizado é a ligadura parcial da veia porta (LPVP), sendo o modelo eleito para este presente trabalho. Neste modelo experimental, a veia porta é separada do tecido circulante após uma incisão abdominal mediana, e após uma ligadura neste vaso, promove uma estenose venosa. Convencionalmente, uma agulha 20G é utilizada (0,889 mm de diâmetro), no entanto, agulhas de maior ou menor calibre podem ser utilizadas, dependendo se o objetivo for uma maior ou menor estenose [3].

Uma semana após a ligadura, os animais desenvolvem completa síndrome portal hipertensiva, apresentando circulação hiperdinâmica e *shunting* porta-sistêmico, sendo esse detectável dois dias após a cirurgia. No 4º dia, já ocorre vasodilatação mesentérica e aumento do débito cardíaco ^[3,96] e no 7º dia, o fluxo sanguíneo portal é divergido totalmente em colaterais ^[3].

Diferentes estudos já demonstraram que, em ratos, a LPVP demonstra todas as anormalidades presentes na vasculatura gástrica quando comparadas à gastropatia portal hipertensiva em humanos. Assim, estudos voltados à tentativa de encontrar uma alternativa terapêutica para o sangramento das varizes gástricas vêm sendo desenvolvidos, utilizando esse modelo experimental ^[97,98].

Nosso grupo de pesquisa já promoveu estudos anteriores utilizando o modelo de ligadura parcial da veia porta ^[43,68], sendo obtidos resultados bastante favoráveis quando da utilização das drogas quercetina e glutamina. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é estudar a ação da N-acetilcisteína na gastropatia da hipertensão portal induzida por LPVP.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 OBJETIVO GERAL

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a pressão portal através da veia mesentérica dos animais dos diferentes grupos experimentais;
2. Avaliar as provas de função hepática por meio de medidas de concentração sérica das aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT), e da fosfatase alcalina (FA) no sangue dos animais dos diferentes grupos experimentais;
3. Avaliar a lipoperoxidação, utilizando os métodos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;
4. Avaliar as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;
5. Avaliar os metabólitos de óxido nítrico (nitritos e nitratos) no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;
6. Avaliar as alterações histopatológicas no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais, bem como o calibre dos vasos na submucosa gástrica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

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

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar (n=6), pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do Biotério da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Durante o experimento, os animais foram mantidos neste local, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha, em ciclos de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de 22 ± 2 °C. água e a ração da marca Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil), foram administradas *ad libitum*, diariamente . As caixas foram limpas de acordo com a rotina da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2.2 Considerações bioéticas

Todos os procedimentos realizados seguiram de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde contidas na Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais, de autoria do grupo de pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ^[30].

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo solicitado fomento junto ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA, com número de protocolo 11-0293.

Para detectar uma diferença na magnitude de 1,5 desvio padrão (magnitude de efeito grande) mantendo-se um $\alpha=0,05$ e $\beta=90\%$, foram calculados seis ratos por grupo, totalizando 24 ratos.

3.2.3 Grupos experimentais

O modelo utilizado para o desenvolvimento da hipertensão portal foi a ligadura parcial de veia porta (LPVP), e os animais foram divididos em quatro grupos com n de seis animais:

- I. Controle (SO - sham-operated) + Veículo (NaCl)- Grupo submetido à simulação da cirurgia, e administração de veículo por 7 dias;
- II. Controle (SO - sham-operated) + N-acetilcisteína (NAC) - Grupo submetido à simulação da cirurgia e tratamento com NAC por 7 dias;
- III. Hipertensão Portal (LPVP) + Veículo (NaCl) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e administração de veículo por 7 dias;
- IV. Hipertensão Portal (LPVP) + N-acetilcisteína (NAC) - Grupo submetido à cirurgia de ligadura parcial da veia porta e tratamento com NAC por 7 dias.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos, em gaiolas individuais devidamente identificadas, com água e ração *ad libitum*. Para cálculo de dose do anestésico, foram registrados seus pesos no início do experimento (momento da cirurgia) e no momento da morte,.

3.2.4 Procedimentos experimentais

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

Os animais foram anestesiados com cetamina 100mg/Kg e xilazina 50mg/Kg por via intraperitoneal. Após uma incisão mediana no abdome (na linha alba), as alças intestinais foram retiradas delicadamente por sobre uma gaze umidificada com soro fisiológico, e a veia porta foi isolada. Uma agulha de 20G foi colocada sobre a veia porta e ambas amarradas em fio de seda 3.0. Após, a agulha foi retirada delicadamente, sendo necessário certificar-se da ocorrência de trombose da veia porta durante sua manipulação [54].

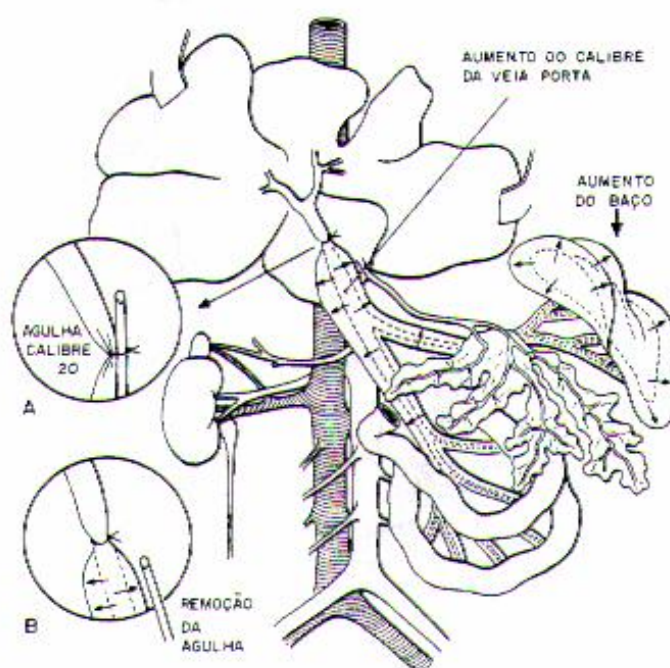


Figura 10: Modelo de ligadura parcial da veia porta.

Fonte: adaptada [54].

As alças intestinais foram colocadas no abdome e, com pontos contínuos, fechou-se o peritônio, infundindo-se anteriormente cerca de 10mL

de solução fisiológica na cavidade abdominal. A parede exterior foi fechada com pontos isolados. Uma solução antiséptica foi aplicada no local e os animais foram colocados em gaiolas individuais até o dia dos experimentos.

Os animais pertencentes do grupo controle (SO) sofreram o mesmo procedimento cirúrgico, não tendo, no entanto, a veia porta parcialmente ligada.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente supervisionados até o dia do experimento, quinze dias após a constrição parcial da veia porta ou da cirurgia fictícia.



Figura 11: Incisão na região abdominal do rato onde se observa a veia porta, apontada pela flecha.
Fonte: autor.



Figura 12: Região abdominal do rato com isolamento da veia porta, apontado pela flecha.
Fonte: autor.

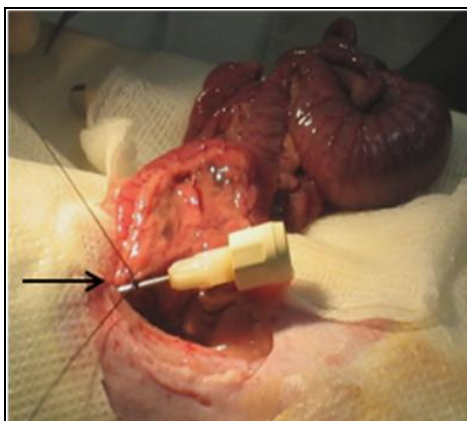


Figura 13: Região abdominal do rato mostrando a ligadura parcial da veia porta, apontada pela flecha
Fonte: autor.

3.2.4.2 Administração do veículo e da N-acetilcisteína

O tratamento diário com a NAC iniciou-se a partir do 8^o dia do procedimento cirúrgico por via intraperitoneal, na dose de 10 mg de N-acetilcisteína por Kg de peso do animal. Os animais controle receberam o veículo (solução fisiológica – NaCl 0,9%) no volume de 0,6 mL.

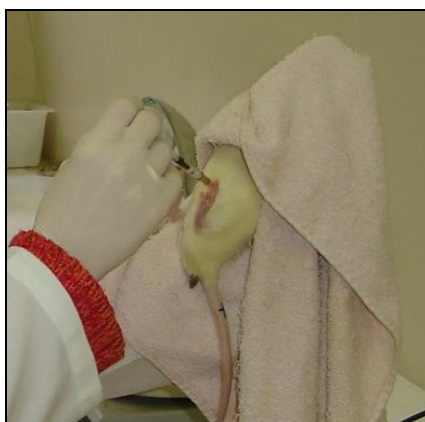


Figura 14: Procedimento de administração da N-acetilcisteína.
Fonte: autor.

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

Transcorridos quinze dias do desenvolvimento do modelo e sete dias de administração de NAC ou veículo, de acordo com os grupos, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilasina (10 mg/kg) por via intraperitoneal.

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

Na determinação da AST e da ALT no plasma, foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática do AST e ALT foi obtida pela medição cinética a 567 nm.

A AST catalisou a reação do α -cetogluturato e do ácido alanina sulfínico a piruvato e glutamato. A ALT catalisou a reação do α -cetogluturato e alanina a piruvato e glutamato. O piruvato se hidrolisou a acetilfosfato, após a ação do piruvato oxidase (POD), anidrase carbônica e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em presença de POD, o H_2O_2 oxidou a forma reduzida incolor do indicador à forma azul.

Para determinação da atividade da FA no plasma, foi empregado o método enzimático automatizado. Para isto, utilizou-se como substrato o para-nitrofenilfosfato mais água, que formou, para-nitrofenol, um composto intensamente amarelo, com um máximo de absorvância de 400 nm.

Posteriormente, realizou-se tricotomia da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, para que as alças intestinais fossem expostas. A aferição da pressão portal foi realizada através de um cateter inserido na veia mesentérica, conectado a um polígrafo Lettica (Rochester, MI, USA) que registrou a pressão e expressou o valor aferido em mmHg.

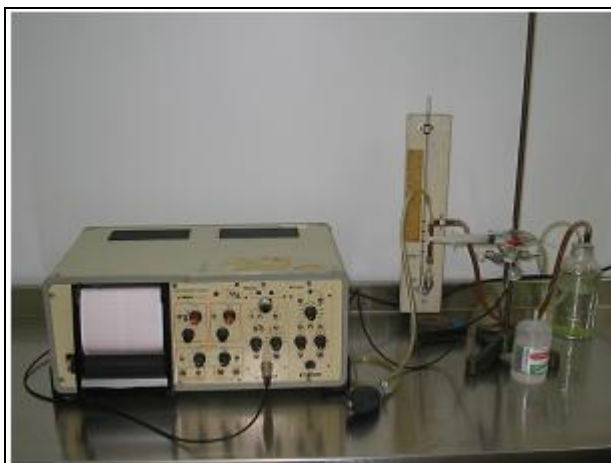


Figura 15: Polígrafo para registro da pressão da marca Lettice (Rochester, MI, USA).

Fonte: autor.

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

- 1º) Um pequeno fragmento do estômago foi retirado e emergido em Bouin por 12 horas e, após, em formol 10%, para posterior análise histológica;
- 2º) O restante do estômago foi pesado e congelado a -80°C para as análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes e avaliação de nitritos e nitratos. O baço foi apenas pesado e, após, desprezado.

Ao final do experimento, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito em *AVMA Guidelines from Euthanasia* ^[25].

Os corpos dos animais foram acondicionados em embalagens específicas para descarte e mantidos em freezer até sua incineração realizada pelo setor responsável da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.3 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.3.1 Preparação do homogeneizado

Os estômagos foram retirados, pesados e armazenados em freezer -80°C. Foram, posteriormente, homogeneizados durante 1 minuto em Ultra-Turrax (IKA-WERK), na presença de cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5 mL por g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonina (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10µL por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases, e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas, cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g) em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge), e o sobrenadante retirado e congelado em freezer -80°C para as dosagens posteriores ^[60].

3.3.2 Dosagem de proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de estômago foi determinada através do método de Bradford, onde foi utilizada uma albumina bovina (SIGMA) como padrão. As amostras foram mensuradas espectrofotometricamente 595 nm, e os valores expressos em mg/mL. Esses valores foram utilizados para calcular posteriormente o TBARS e os valores das enzimas antioxidantes ^[61].

3.4 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.4.1 Determinação dos níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico

Com o intuito de avaliar a lipoperoxidação nos grupos presentes neste estudo, utilizamos o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

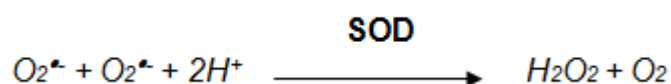
(TBA-RS). A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e a consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias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

Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação, formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitou-se cada tubo, que foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto foi retirado e a leitura em espectrofotômetro realizada (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína ^[62].

3.4.2 Atividade da enzima superóxido dismutase

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

A reação catalisada é a seguinte:



A técnica de medida da SOD baseou-se na inibição dessa reação. Para tanto, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adenocromo, produzindo $O_2^{\bullet-}$ que é o substrato da enzima. Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, fez-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), esta

correspondendo a 100% da reação. Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionaram-se diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/g de tecido (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina).

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

1. Colocou-se 950 μL de tampão junto com 50 μL de amostra e 17 μL de adrenalina, após o aparelho ser zerado.
2. Introduziu-se 975 μL de tampão junto com 25 μL de amostra e 17 μL de adrenalina, após o aparelho ser zerado.
3. Acrescentou-se 990 μL de tampão junto com 10 μL de amostra.

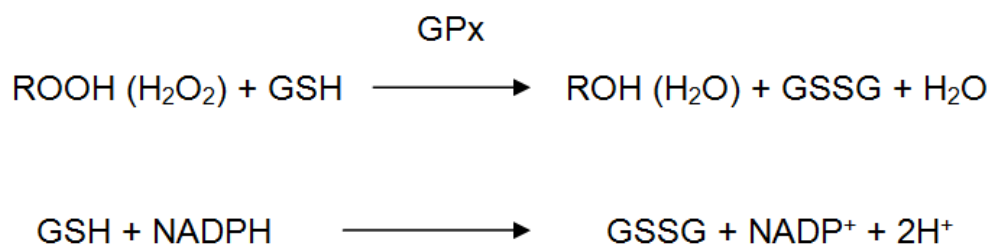
Com os 17 μL de adrenalina, procedeu-se da mesma forma que nos itens anteriores.

Todas as medidas anteriormente citadas correspondem ao valor de (b). Ao valor de (a) somente corresponde a leitura até ser zerado o aparelho ^[63].

3.4.3 Atividade da enzima glutathiona peroxidase

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

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



A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo-se a velocidade de oxidação de NADPH em uma mistura de reação. Em uma cubeta, foram colocados 500 μL de solução reguladora de fosfatos de potássio (100 mM, pH 7,0), 100 μL de H_2O bidestilada, 50 μL de Azida Sódica 20mM, com 50 μL de glutathiona reduzida (GSH) 40mM, 50 μL de glutathiona redutase (GR) e 50 μL NADPH. Essa mistura foi encubada durante 3 minutos, e, logo após, foram adicionados 100 μL de amostra diluída e 100 μL de H_2O_2 . As amostras foram lidas a 340 nm e a atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína ^[64].

3.5 MEDIDA DE NITRITOS E NITRATOS

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

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

Posteriormente, foram utilizados 750 μL dessa mistura e adicionados 750 μL do reativo de Griess, sendo incubada 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 ^[65].

3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS

O exame histopatológico foi realizado no laboratório de patologia do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por um patologista que desconhecia os grupos estabelecidos no delineamento experimental.

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

O calibre dos vasos foi medido utilizando o mesmo aparelho e software, no qual foram feitas três medidas da luz vascular e, após, calculada uma média para obtenção do calibre de cada vaso analisado, obtendo o valor em *pixels*.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados coletados, as médias e os erros padrões 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) de duas vias, seguida de teste Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações, sendo o nível de significância adotado de 5% ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

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

1. Avaliar a alteração da pressão portal nos grupos experimentais;
2. Avaliar a integridade hepática neste modelo experimental através dos níveis séricos das aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT), e da fosfatase alcalina (FA) nos grupos experimentais;
3. Avaliar os níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) nos estômagos dos animais dos diferentes grupos experimentais;
4. Avaliar a atividade enzimática antioxidante através da medida das concentrações da enzima Superóxido Dismutase (SOD) nos estômagos dos animais dos diferentes grupos experimentais;
5. Avaliar a atividade enzimática antioxidante através da medida das concentrações da enzima Glutaciona Peroxidase (GPx) nos estômagos dos animais dos diferentes grupos experimentais;
6. Avaliar os metabólitos do NO (Nitritos e Nitratos) nos estômagos dos animais dos diferentes grupos experimentais;
7. Determinar os aspectos histológicos pela técnica de hematoxilina e eosina nos estômagos dos animais dos diferentes grupos experimentais, bem como o calibre dos vasos.

4.1 VERIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA PRESSÃO PORTAL

Houve aumento estatisticamente significativo na pressão portal dos grupos LPVP em relação aos demais grupos experimentais. Observa-se diminuição significativa nos valores de pressão portal nos animais do grupo LPVP + NAC.

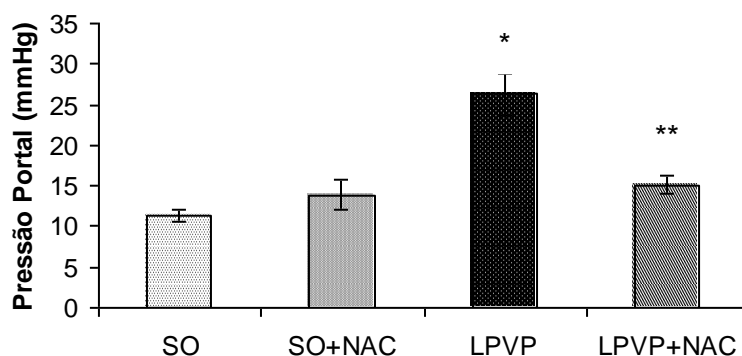


Figura 16: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de pressão portal nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.

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

*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ($P<0,001$);

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

4.2 PROVAS DE INTEGRIDADE HEPÁTICA

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

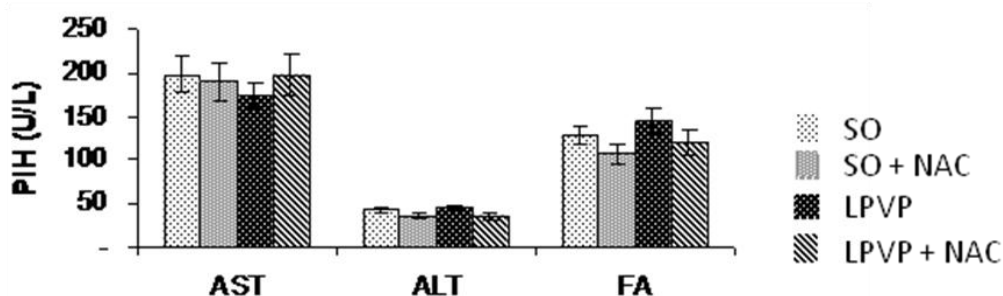


Figura 17: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis das enzimas hepáticas AST, ALT e FA nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC. Dados expressos como a média \pm erro padrão, $n=6$ animais cada grupo. Não houve diferença estatística.

4.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Os valores de lipoperoxidação no estômago demonstraram aumento significativo no grupo LPVP, sendo $P < 0,001$ em relação a todos os demais grupos (SO, SO + NAC e LPVP+NAC). Os animais tratados com N-acetilcisteína demonstraram uma diminuição significativa ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo LPVP.

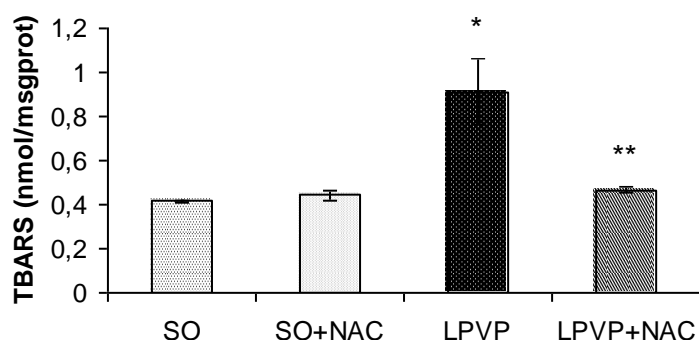


Figura 18: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de TBARS nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.

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

*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ($P < 0,001$);

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

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE SUPERÓXIDO DISMUTASE

Na Figura 19, são apresentados os resultados da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado de estômago dos animais dos diferentes grupos, mostrando uma diminuição significativa no grupo LPVP em relação aos demais ($P < 0,05$) e um aumento significativo da atividade dessa enzima no grupo LPVP +NAC ($P < 0,05$).

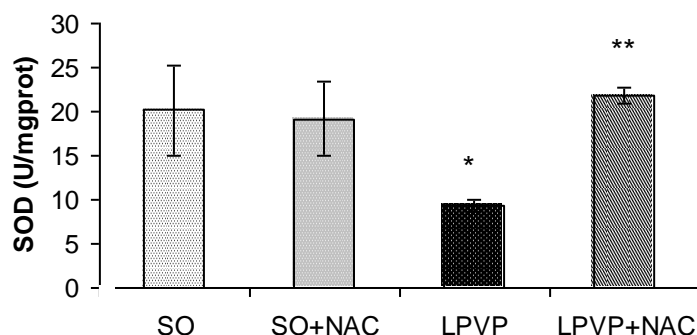


Figura 19: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de SOD nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.

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

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

** : diferença significativa do grupo LPVP+NAC em relação ao grupo LPVP ($P<0,05$).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ANTIOXIDANTE GLUTATIONA PEROXIDASE

Na atividade da GPx, foi observado um comportamento similar à enzima SOD, em que observamos uma diminuição significativa da atividade dessa enzima nos animais do grupo LPVP em relação aos demais ($P<0,05$) e um aumento significativo desses valores no grupo LPVP+NAC quando comparado ao grupo LPVP ($P<0,05$).

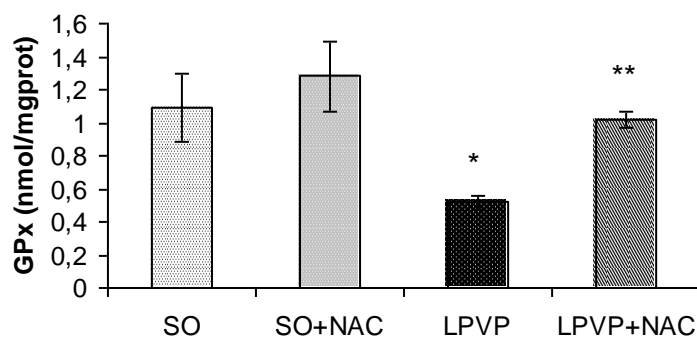


Figura 20: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de GPx nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.

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

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

** : diferença significativa do grupo LPVP+NAC em relação ao grupo LPVP (P<0,05).

4.6 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO NO

Na Figura 21, observamos os valores referentes aos nitritos e nitratos no homogeneizado de estômago de ratos dos nossos grupos experimentais. Observa-se aumento significativo dos nitratos totais nos grupos LPVP em relação aos grupos SO, SO+NAC e LPVP+NAC, sendo P <0,01. Os animais do grupo LPVP +NAC apresentaram uma redução significativa desses valores (P<0,05).

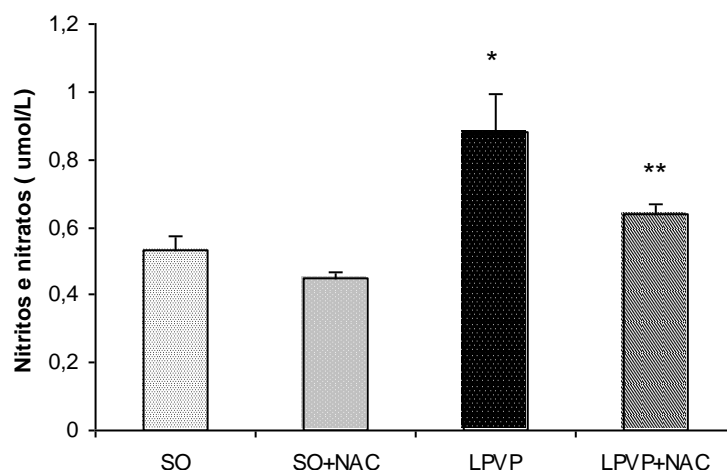


Figura 21: Efeito da administração da N-acetilcisteína (NAC) sobre os níveis de NO nos grupos SO: Sham-operated, SO +NAC, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.

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

*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos (P<0,01);

** : diferença significativa do grupo LPVP+NAC em relação ao grupo LPVP (P<0,05).

4.7 DETERMINAÇÃO DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA

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

Na Figura 22A, a fotomicrografia do estômago do grupo controle (SO) mostra a mucosa gástrica no padrão normal. Já na Figura 22B, observa-se a fotomicrografia do estômago do grupo com ligadura parcial de veia porta (LPVP), mostrando alterações na mucosa gástrica, como a presença de edema e vasodilatação na submucosa dos animais desse grupo. Na Figura 22C, apresenta-se a fotomicrografia do estômago do grupo LPVP tratado com N-acetilcisteína (LPVP+NAC), na qual se observa a redução do calibre dos vasos na mucosa gástrica desses animais. Devido á semelhança da histologia entre os grupos SO e SO +NAC, optamos por não incluir a fotografia do grupo SO + NAC neste presente trabalho.

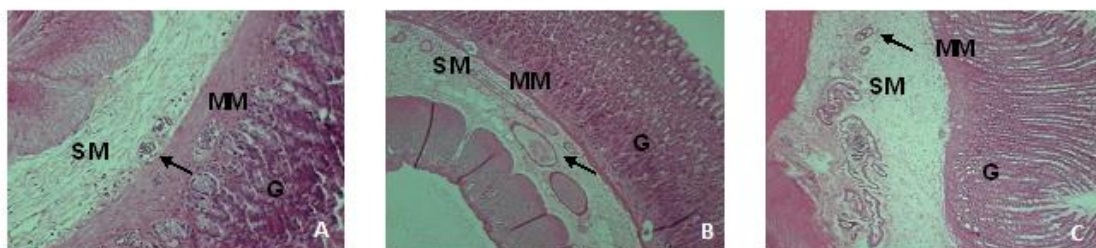


Figura 22: Fotomicrografia de estômago de animais dos grupos. A: controle (SO), B: LPVP e C: LPVP + NAC, com coloração de hematoxilina-eosina em aumento (100x). Observa-se área glandular (G), muscular da mucosa (MM) e submucosa (SM).

Na Figura 23, apresenta-se o gráfico dos valores do calibre dos vasos sanguíneos presentes na mucosa gástrica dos animais do grupo LPVP, onde se observa um aumento significativo do calibre dos vasos ($P < 0,001$) e os

animais do grupo LPVP +NAC apresentam uma redução do calibre dos vasos da mucosa gástrica ($P<0,001$). Não mensuramos o calibre dos vasos dos animais do grupo SO + NAC, devido á semelhança da histologia entre este grupo e o grupo SO.

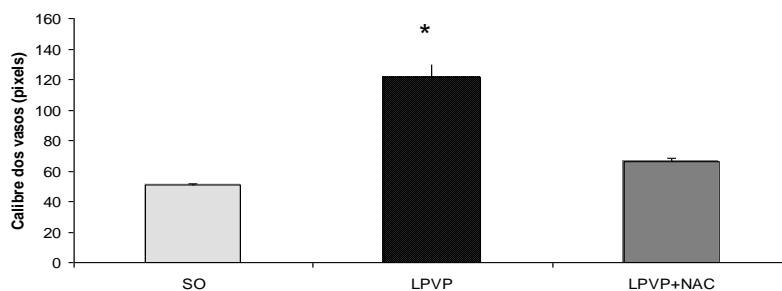


Figura 23: Valores médios obtidos na mensuração do calibre dos vasos nos grupos SO: Sham-operated, LPVP: Ligadura parcial da veia porta e LPVP + NAC.

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

*: diferença significativa do grupo LPVP em relação aos demais grupos ($P<0,001$).

5 DISCUSSÃO

A hipertensão portal é uma síndrome associada ao desenvolvimento da circulação hiperdinâmica, que se caracteriza por vasodilatação e aumento do débito cardíaco e/ou fluxo sanguíneo. Essa síndrome é a principal causa de mortalidade entre os pacientes cirróticos, embora nem sempre a hipertensão portal seja associada à cirrose hepática, podendo ser consequência de outras etiologias ^[67].

O desenvolvimento dos colaterais portossistêmicos é uma resposta vascular ao aumento da pressão no sistema portal, característico da HP. Dentre esses, as varizes gastro-esofágicas são as mais proeminentes, sendo essa uma tentativa de desviar o sangue represado no sistema porta para a circulação sistêmica, descomprimindo o território esplâncnico ^[68]. A vasodilatação que ocorre no estômago desencadeia o quadro de gastropatia da hipertensão portal.

A progressiva dilatação vascular no estômago de pacientes acometidos pela GHP leva a sangramento e consequentemente hemorragia gastrointestinal, acompanhados por outras manifestações clínicas como a anemia ferropênica crônica ^[16]. A taxa de mortalidade de 30% associada a cada episódio hemorrágico é preocupante, e dessa forma a busca por um tratamento eficaz se faz necessária, na tentativa de diminuir essa alarmante porcentagem.

Nas últimas décadas, avanços significantes em opções de tratamento para o desenvolvimento de varizes gastroesofágicas e hemorragia gastrointestinal foram feitos. No entanto, nenhum tratamento específico demonstrou eficácia na prevenção do sangramento dessas varizes.

A prevenção do primeiro sangramento depende do tamanho e características das varizes. As recomendações clínicas para pacientes com varizes pequenas e com alto risco de hemorragia é o uso de beta-bloqueadores. Em caso de varizes médias/grandes, o tratamento é feito também com beta-bloqueadores ou é realizada ligadura esofágica. Ainda,

tratamentos padrões para pacientes com varizes consistem em drogas vasoativas e profilaxia com antibióticos. A anastomose portossistêmica intra-hepática transjugular (TIPS) é reservada para aqueles que não responderam a esses tratamentos ou para pacientes que estão propensos a sangrar ("TIPS prematuros") [69].

Nesse contexto, a utilização de outras substâncias químicas capazes de impedir o desenvolvimento de tais complicações poderia ser uma alternativa vantajosa e um possível caminho para a diminuição dessa alta taxa de mortalidade.

Para isso, é necessário o uso de modelos experimentais em que figurem as alterações decorrentes na hipertensão portal em humanos para que possamos estudar e entender o mecanismo fisiopatológico dessa doença e buscar, assim, uma terapia alternativa para a minimização desses danos.

No caso da HP, o uso de modelos animais vem contribuindo para o melhor entendimento dessa doença, bem como a busca por esses tratamentos alternativos. Muitos são os modelos experimentais utilizados para estudar as complicações da hipertensão portal intra, pré e pós-hepática [4], sendo a ligadura parcial da veia porta (LPVP) um modelo pré-hepático.

Em um modelo pré-hepático, como o utilizado neste trabalho, observamos dilatação dos vasos esplâncnicos e desenvolvimento de expressiva circulação colateral, que determina o surgimento de varizes gastroesofágicas, caracterizando a síndrome portal hipertensiva [67].

A ligadura parcial da veia porta é um modelo experimental clássico e muito utilizado, já que foi bem estabelecido em 1985 por Sikuler [3], e simula a hipertensão portal pré-hepática e suas consequências de forma eficaz. Em 7 dias, a HP encontra-se totalmente estabelecida, apresentando as alterações vasculares porém sem dano hepatocelular [4].

No presente trabalho, utilizamos este modelo experimental, e avaliamos a pressão portal, a integridade hepática, o estresse oxidativo, metabólitos do óxido nítrico e alterações histológicas em ratos tratados com o antioxidante N-acetilcisteína.

No oitavo dia após a cirurgia LPVP, uma vez que o quadro da circulação hiperdinâmica já estava estabelecido ^[1,10], iniciamos o tratamento com a NAC, para observarmos se este antioxidante seria capaz de minimizar os danos gástricos infligidos pelo surgimento da circulação colateral no estômago.

Aferimos os valores de pressão portal (PP) (Figura 17) no 15º dia após a cirurgia, e observamos que houve um aumento em animais do grupo LPVP quando comparado aos demais. Esse resultado já era esperado, uma vez que o modelo experimental utilizado neste trabalho é caracterizado pelo aumento da pressão no sistema porta. Esse dado demonstrou a eficiência do modelo, bem como a eficácia da N-acetilcisteína em reduzir os valores de PP nos animais que foram tratados com esse antioxidante, sendo esse valor significativo em relação aos animais porta-hipertensos.

Esses resultados foram semelhantes em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que utilizaram os antioxidantes quercetina e glutamina ^[43, 68].

A NAC foi utilizada como tratamento em modelo de hipertensão portal em estudo anterior de Fernando *et al.*, 1998 ^[17], no qual foi demonstrado que a administração de N-acetilcisteína reduziu a circulação hiperdinâmica nos animais que sofreram a ligadura parcial da veia porta. Esse resultado é decorrente do efeito da NAC, principalmente, sobre a pressão portal, pressão arterial média e débito cardíaco.

Como resultados das análises das aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT) e da fosfatase alcalina (FA), não observamos diferença estatística entre os grupos amostrados (Figura 18). Quando ocorre um dano hepático, as enzimas podem extravasar para o plasma, tornando-se um excelente marcador de lesão no fígado ^[70]. As aminotransferases (AST e ALT), quando alteradas, apontam hepatite aguda (viral ou tóxica), crônica, doenças obstrutivas de via biliar, entre outras. Alterações de valores da enzima FA frequentemente indicam, doença hepatobiliar ^[12]. Os dados encontrados no nosso estudo refletem o fato de que neste modelo experimental não há alteração da integridade hepática, em virtude de se tratar de um modelo pré-hepático ^[54], no qual o dano hepatocelular é inexistente.

Com o intuito de avaliar a lipoperoxidação neste modelo experimental bem como o efeito da N-acetilcisteína sobre esse parâmetro, utilizamos a técnica de mensuração dos níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O estresse oxidativo está associado à hipertensão portal ^[43,71] e o quadro de gastropatia diretamente relacionado à superprodução de EROS e altos níveis de lipoperoxidação ^[72]. Observamos, neste trabalho, um aumento significativo dos níveis de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos animais do grupo LPVP, comparados aos demais. Quando a N-acetilcisteína foi administrada no grupo doente, observamos que os valores se mostraram mais baixos, apontando uma redução da lipoperoxidação nos animais que receberam a NAC (Figura 19).

O fato de que a ligadura parcial da veia porta leva a dano oxidativo foi inicialmente proposto por Fernando *et al.*, 1998, afirmando que a geração de espécies reativas de oxigênio pode estar intimamente relacionada com as alterações hemodinâmicas observadas na hipertensão portal ^[17]. Kinjo *et al.*, 2008 também observaram altos níveis de lipoperoxidação e nitrotirosina neste modelo experimental ^[72].

A peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados ^[22]. Isso ocorre através de um processo de reações em cadeia na membrana plasmática celular podendo levar à inativação de proteínas de transporte ou enzimas de membrana, comprometendo, dessa forma, a homeostase da célula ^[21].

Ainda, em doenças hepáticas como a hepatite, cirrose e hepatocarcinoma, observaram-se níveis elevados de LPO no estômago, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo nas lesões da mucosa gástrica nessas hepatopatias ^[79]. Resultados similares foram encontrados em nosso trabalho ao avaliarmos o nível de lipoperoxidação no estômago de animais submetidos ao modelo de LPVP.

A N-acetilcisteína possui a habilidade de interagir com os agentes oxidantes, agindo como *scavenger* de radicais livres. Ainda, a NAC contribui para a restauração da glutathiona, importante antioxidante não-enzimático [74].

Assim, a redução da lipoperoxidação neste trabalho, através do uso da NAC, é justificada pelas suas propriedades antioxidantes. Resultados similares foram encontrados em 1998, quando a lipoperoxidação foi avaliada com a mensuração de F₂-Isoprostanos [17]. No entanto, os mecanismos através dos quais a NAC reduziu o estresse oxidativo não foram elucidados.

Quando se avaliou as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathiona peroxidase, observamos uma redução significativa em ambas nos animais do grupo LPVP quando comparadas aos demais. A NAC foi capaz de restaurar a atividade dessas enzimas, estando os valores do grupo LPVP + NAC significativamente aumentados em relação ao grupo LPVP. O sistema de defesa antioxidante, tanto enzimático como não-enzimático, é encarregado de manter baixas as concentrações de EROS. Para tanto, esse sistema age prevenindo a formação dessas espécies, promovendo a sua captura, ou reparando o dano causado por tais moléculas.

Em mamíferos, as enzimas SOD são descritas como três isoformas: a citosólica, a mitocondrial e a extracelular, que são metaloenzimas abundantes em células aeróbias e enzimas antioxidantes extremamente importantes na manutenção do equilíbrio oxidativo. Cabe a essas enzimas a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathiona peroxidase. Podemos dizer que esse sistema compreende a primeira linha de defesa antioxidante do nosso organismo no combate às espécies reativas de oxigênio [63].

A GPx é uma peroxidase específica que faz parte de um grupo de enzimas que utilizam uma variedade de redutores celulares para inativar peróxidos. Além de agirem sob o peróxido de hidrogênio, neutralizam também peróxidos orgânicos como os alquil-hidro-peróxidos [64]. Essas enzimas também são de significativa importância, pois a GPx, em associação com outras

enzimas, pode prevenir a interação do $O_2^{\circ-}$, H_2O_2 e íons metálicos que levariam à formação do radical OH° [75].

SOD e GPx, ambas, demonstraram uma diminuição significativa no grupo LPVP em relação aos demais. Quando os animais foram tratados com NAC, observamos uma restauração dos níveis de atividade dessas enzimas (Figuras 20 e 21).

A redução dos valores das enzimas SOD e GPx, bem como o aumento da lipoperoxidação, corrobora com estudo anterior que avaliou o dano oxidativo causado por lesões na mucosa gástrica [6]. Em nosso grupo, em outros modelos experimentais associados ao estresse oxidativo, observamos o mesmo comportamento dessas enzimas, que se mostraram diminuídas nos grupos dos animais doentes [82,83].

O decréscimo da SOD está em conformidade com pesquisas anteriores [68,43,71], sendo que a diminuição da atividade dessa enzima pode levar a um aumento da lipoperoxidação. A redução dos valores dessa enzima parece estar relacionada à sua ação sobre os ânions superóxido, aumentados na hipertensão portal. A SOD estaria sendo utilizada na dismutação das EROS para posterior formação de H_2O_2 . Ainda, a combinação do $O_2^{\circ-}$ com o NO também pode levar a um dano oxidativo bastante elevado em virtude da consequente produção de $ONOO^-$ [76].

A NAC mostrou-se eficaz em restaurar os níveis de atividade dessa enzima (Figura 20). Estudos anteriores demonstraram que o tratamento antioxidante foi capaz de minimizar o decréscimo na atividade da SOD, através do uso de quercetina e glutamina neste mesmo modelo experimental. Isso demonstra, conseqüentemente, uma redução do estresse oxidativo e uma melhora no dano gástrico infligido pela ligadura parcial da veia porta [43,68].

A atividade da GPx avaliada no grupo LPVP também se mostrou diminuída, sendo o tratamento com a NAC eficaz em aumentar esses níveis nos animais do grupo LPVP + NAC (Figura 21).

Essa enzima já foi previamente implicada como um possível mediador de redução de dano na mucosa gástrica em virtude do aumento dos níveis de cisteína [74]. A N-acetilcisteína age como uma precursora da GSH, facilitando a

sua biossíntese ^[77], o que explica o aumento dos valores da GPx nos animais que receberam a NAC.

A atividade antioxidante da N-acetilcisteína também já foi demonstrada , em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, que utilizou modelo experimental de cirrose biliar secundária ^[78]. Em tal trabalho, a NAC foi capaz de reduzir a lipoperoxidação e aumentar a atividade da enzima SOD no pulmão de ratos submetidos à ligadura de ducto biliar comum.

Avaliamos também nesse presente trabalho os níveis de metabólitos do óxido nítrico, nitritos e nitratos. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo de NO nos animais do grupo LPVP em relação aos demais e uma redução significativa desses valores nos animais do grupo LPVP +NAC (Figura 22).

O óxido nítrico parece estar intimamente relacionado com o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica na hipertensão portal. A obstrução ao fluxo sanguíneo, tanto pré, intra ou pós-hepática, leva ao represamento do sangue no sistema portal, ocasionando o aumento de pressão no território esplâncnico. Nessa região, ocorre estresse de cisalhamento e conseqüente liberação de agentes vasodilatadores, dentre eles o NO. Uma expressão e atividade aumentada da eNOS, fatores circulantes vasoativos (endotelina, angiotensina II, vasopressina, norepinefrina) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) também contribuem para o desenvolvimento da circulação colateral nesta doença ^[3].

Sendo assim, ao avaliarmos os metabólitos do NO em homogeneizado de estômago, observamos valores significativamente aumentados no grupo LPVP em relação aos demais. Esse aumento pode ser explicado pela progressiva dilatação dos vasos devido ao aumento da pressão portal, que tem o objetivo de desviar o sangue da área obstruída para a circulação sistêmica. Esse fenômeno contribui para o aumento de estresse oxidativo, uma vez que o NO pode reagir com o ânion superóxido e formar o radical peroxinitrito, espécie reativa extremamente danosa ao nosso organismo ^[81]. Ainda, pode reagir com nitrosotíóis, dióxido de nitrogênio (NO₂) e outras espécies nitrosativas, contribuindo, assim, para o estresse ^[76].

Nossos resultados demonstraram uma redução do NO nos animais tratados com a N-acetilcisteína, colaborando para o decréscimo da circulação hiperdinâmica, bem como redução do estresse oxidativo nesse modelo experimental.

Moreira *et al.*, 2004 e Marques *et al.*, 2011 apontaram que o tratamento antioxidante com a quercetina e a glutamina foi capaz de reduzir o NO, contribuindo para a manutenção da integridade da mucosa gástrica [68,43].

A NAC, por sua vez, reduziu a superprodução de óxido nítrico em modelo experimental de cirrose [78]. Em nosso estudo, observamos o mesmo comportamento dessa droga em modelo experimental de hipertensão portal.

A hipótese para a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico com o uso da N-acetilcisteína se baseia em sua ação inibitória sob a produção de NO [78]. A combinação do componente tiol da NAC com o NO produz um composto chamado nitritiol, que pode preservar e acumular óxido nítrico na sua forma biologicamente ativa. Quando isso ocorre, sugere-se que esta molécula está agindo como um antioxidante, uma vez que reduz a formação de peroxinitrito através da inibição da produção de NO [9].

Com o intuito de elucidarmos os efeitos da N-acetilcisteína na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo experimental de LPVP, promovemos a avaliação histológica do estômago dos grupos amostrados nesse trabalho através de lâminas coradas com HE. Observamos que os animais com hipertensão portal apresentaram presença de edema e vasodilatação na submucosa (Figura 24). Esses resultados foram opostos aos animais do grupo controle, nos quais observamos uma preservação da integridade gástrica (Figura 23). Quando os animais do grupo LPVP foram tratados com a NAC, observamos uma atenuação desse quadro, com significativa redução da vasodilatação (Figura 25).

Estudos anteriores também demonstraram uma atenuação do quadro de circulação hiperdinâmica nesse modelo experimental, bem como a diminuição do dano à mucosa gástrica, ambos os parâmetros avaliados através da histologia. Esse resultado foi obtido através do uso da terapia antioxidante [43, 68].

Por último, avaliamos o calibre dos vasos presentes na submucosa gástrica dos animais do nosso experimento. Constatamos, com esses resultados, que os animais do grupo tratado com a NAC apresentaram uma redução significativa do calibre vascular, quando comparados aos animais do grupo LPVP, os quais demonstraram um aumento significativo desses valores (Figura 26).

Observando o quadro geral, constatamos que a minimização dos danos na mucosa gástrica, avaliados na histologia, veio acompanhada de uma melhora nos parâmetros de estresse oxidativo (avaliados através das enzimas antioxidantes SOD e GPX e lipoperoxidação por TBARS), e de uma redução dos metabólitos do óxido nítrico.

Dessa forma, diante dos resultados do presente trabalho, sugerimos que a N-acetilcisteína foi eficaz em reduzir dos danos decorrentes na mucosa gástrica de ratos pela LPVP. Assim, essa droga pode ser sugerida como uma alternativa terapêutica na atenuação dessa doença.

6 CONCLUSÕES

1) Através dos resultados obtidos nos valores da pressão portal, concluímos que o grupo LPVP demonstrou um aumento significativo da pressão no sistema portal, sendo a N-acetilcisteína capaz de reduzir os valores nesse modelo experimental.

2) Na avaliação dos testes de integridade hepática, através de medidas de concentração sérica de aminotransaminases (AST e ALT) e fosfatase alcalina (FA), não observamos nenhuma diferença estatística entre os grupos. Concluímos, dessa forma, que nem o modelo LPVP nem a NAC infligiram dano no fígado dos animais utilizados para este trabalho.

3) Ao avaliarmos a lipoperoxidação nos grupos pertencentes a este estudo, através da técnica de TBARS, observamos que houve um aumento no grupo LPVP em relação aos demais, sendo a NAC eficaz na redução desse dano na mucosa gástrica. Este dado foi obtido na análise do nível de lipoperoxidação no grupo LPVP + NAC, que se mostrou reduzido em relação ao grupo LPVP.

4) A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) apresentou uma diminuição significativa nos animais do grupo LPVP em relação aos demais. O grupo LPVP+NAC mostrou atividade restaurada dessa enzima antioxidante.

5) A enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx) mostrou uma redução nos animais do grupo LPVP e após tratamento com a NAC, esses valores mostraram-se significativamente aumentados.

6) Ao avaliarmos os metabólitos do NO, nitritos e nitratos, observamos um aumento significativo desses valores nos animais LPVP. O tratamento com a NAC foi capaz de reduzir a biodisponibilidade do NO, contribuindo, provavelmente, para a redução da gastropatia da hipertensão portal.

7) Na avaliação histopatológica do estômago de ratos com LPVP, observou-se o desenvolvimento de edema e vasodilatação no grupo LPVP. Ainda, os animais pertencentes a esse grupo demonstraram um aumento do calibre dos vasos na submucosa, confirmando a dilatação exacerbada dos vasos nesse modelo experimental. O tratamento com a NAC contribuiu para a redução da vasodilatação observada pelo calibre dos vasos no grupo LPVP +NAC.

A partir desses achados, podemos concluir que a N-acetilcisteína protege a mucosa gástrica dos ratos com gastropatia da hipertensão portal provocada pela LPVP, possivelmente devido às suas propriedades antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol.* 2008;48 Suppl 1:S68-92
2. Majid S, Azam Z, Shah HA, Salih M, Hamid S, Abid S, Jafri W. Factors determining the clinical outcome of acute variceal bleed in cirrhotic patients. *Indian J Gastroenterol.* 2009 May-Jun;28(3):93-5.
3. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol.* 1985 Jun;248(6 Pt 1):G618-25.
4. Abraldes JG, Pasarín M, García-Pagán JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2006 Nov 7;12(41):6577-84.
5. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, Davies S, Moore K. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1999 May;29(5):1358-63.
6. Seckin Y, Harputluoglu MM, Batcioglu K, Karıncaoglu M, Yildirim B, Oner RI, Uyumlu B, Aydogdu N, Hilmioglu F. Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2007 May;52(5):1154-8.
7. Ohta M, Tanoue K, Tarnawski AS, Pai R, Itani RM, Sander FC, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Overexpressed nitric oxide synthase in portal-hypertensive stomach of rat: a key to increased susceptibility to damage? *Gastroenterology.* 1997 Jun;112(6):1920-30.
8. Rodríguez-Vilarrupla A, Bosch J, García-Pagán JC. Potencial role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol.* 2007 Feb;46(2):193-7.
9. Failli P, Palmieri L, D'Alfonso C, Giovannelli L, Generini S, Rosso AD, Pignone A, Stanflin N, Orsi S, Zilletti L, Matucci-Cerinic M. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric Oxide.* 2002 Dec;7(4):277-82.

10. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol.* 2008;48 Suppl 1:S68-92.
11. Martinelli, ALC. Hipertensão portal. *Medicina*, Ribeirão Preto, 37: 253-261, jul./dez. 2004.
12. Mattos, AA; Dantas-Corrêa, EB. Tratado de Hepatologia. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
13. Miñano, C; Garcia-Tsao, G. Portal Hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 2010, 39(3): 681–695.
14. Gin-Ho Lo. Mechanism of portal hypertensive gastropathy: An unresolved issue. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Sep;24(9):1482-3.
15. Min YW, Bae SY, Gwak GY, Paik YH, Choi MS, Lee JH, Paik SW, Yoo BC, Koh KC. A clinical predictor of varices and portal hypertensive gastropathy in patients with chronic liver disease. *Clin Mol Hepatol.* 2012 Jun;18(2):178-84.
16. Ripoll C, Garcia-Tsao G. Management of Gastropathy and Gastric Vascular Ectasia in Portal Hypertension. *Clin Liver Dis.* 2010 May;14(2):281-95.
17. Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K. N-Acetylcysteine Prevents Development of the Hyperdynamic Circulation in the Portal Hypertensive Rat. *Hepatology.* 1998 Sep;28(3):689-94.
18. Abramede Associação Brasileira de Medicina de Emergência. [webpage] <http://www.abramede.com.br/1319/caso-clinico-3/>.
19. Johns Hopkins Medicine – Gastroenterology & Hepatology [webpage] http://www.hopkinsgi.org/GDL_Disease.aspx
20. Gastrohep [webpage] <http://www.gastrohep.com/images/image.asp?id=572>
21. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem* 1973, 134:707-16
22. Halliwell B, Gutteridge J. Free Radical and Biology and Medicine. *New York: Oxford* 2007, 3 ed.

23. Barp J, Araújo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Belló-Klein A, Singal P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Sep;35(9):1075-81.
24. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007, 35:1147-50
25. Association AVMA. AVMA Guidelines on Euthanasia – Formerly Report of the AVNA. AVNA Papel on Euthanasia 2007
26. Meneghini RA. Toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje* 1987, 28 ed vol 5
27. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Dec;279(6):L1005-28.
28. Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology.* 1995 Mar;108(3):761-7.
29. Cahill PA, Redmond EM, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *J Hepatol.* 1996 Sep;25(3):370-8.
30. Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. *HCPA* 1997.
31. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Nitric oxide revision. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol.39 no.4 Rio de Janeiro 2003.
32. Nakamura M, Arakawa N, Yoshida H, Naganuma Y, Nagano M, Hiramori K. Nitric oxide plays an insignificant role in direct vasodilator effects of calcium channel blockers in healthy humans. *Heart Vessels.* 2002 Mar;16(3):105-10.
33. Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993 Nov;100(5):567-75.
34. Liaudet L, Soriano FG, Szabó C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28(4 Suppl):N37-52.
35. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15;268(17):12231-4.

36. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir Bras* 2002, 17(6).
37. Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci*. 2003,10:170–8.
38. Kanwar S, Kubes P, Tepperman BL, Lee SS. Nitric oxide synthase activity in portal-hypertensive and cirrhotic rats. *J Hepatol*. 1996 Jul;25(1):85-9.
39. Iwakiri Y. The molecules: mechanisms of arterial vasodilatation observed in the splanchnic and systemic circulation in portal hypertension. *J Clin Gastroenterol*. 2007 Nov-Dec;41 Suppl 3:S288-94.
40. Ahmed F. Ahmed, Nabila N. El-Maraghy, Rasha H. Abdel Ghaney, Shimaa M. Elshazly. Therapeutic Effect of Captopril, Pentoxifylline, and *Cordyceps Sinensis* in Pre-Hepatic Portal Hypertensive Rats. *Saudi J Gastroenterol*. 2012 May-Jun; 18(3): 182–187.
41. Repetto M, Llesuy S. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 2002, 35, n. 5, p. 523-34
42. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979 Jul;59(3):527-605.
43. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, González-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol*. 2004 Nov 15;68(10):1939-46.
44. Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, González-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*. 2000 Nov;33(5):742-50.
45. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2003 Apr;48(4):824-9.
46. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nutr*. 2005 Oct;135(10):2299-304.

47. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006, 141: 312-22
48. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994,344:721-4
49. Krinsky NI. Carotenoids as chemopreventive agents. *Prev Med* 1989,18:592-602
50. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother.* 1988;42(8):513-9.
51. Nagareddy PR, Xia Z, MacLeod KM, McNeill JH. N-acetylcysteine Prevents Nitrosative Stress-Associated Depression of Blood Pressure and Heart Rate in Streptozotocin Diabetic Rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 Apr;47(4):513-20.
52. Faintuch J, Aguilar PB, Nadalin W. Relevance of N-acetylcysteine in clinical practice: fact, myth or consequence? *Nutrition.* 1999 Feb;15(2):177-9.
53. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.* 2011 March; 36(2): 78–86
54. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol.* 1985 Jun;248(6 Pt 1):G618-25.
55. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology.* 2010 Jan;51(1):246-54. doi: 10.1002/hep.23267.
56. Gu WJ, Wu ZJ, Wang PF, Aung LH, Yin RX. N-acetylcysteine supplementation for the prevention of atrial fibrillation after cardiac surgery: a meta-analysis of eight randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc Disord.* 2012 Feb 24;12:10. doi: 10.1186/1471-2261-12-10.
57. Jegatheeswaran S, Siriwardena AK. Experimental and clinical evidence for modification of hepatic ischaemia–reperfusion injury by N-acetylcysteine during major liver surgery. *HPB (Oxford).* 2011 Feb;13(2):71-8.

58. De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and câncer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 2001, 999-1013
59. Millea PJ. N-Acetylcysteine: Multiple Clinical Applications. *Am Fam Physician*. 2009 Aug 1;80(3):265-9.
60. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*. 1985 Jun 30;71(3):241-9.
61. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
62. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.
63. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5.
64. Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*. 1973 May 15;32(1):132-4.
65. Miura T, Muraoka S, Fujimoto Y. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin. *Food Chem Toxicol*. 2003 Jun;41(6):759-65.
67. Colle I, Geerts AM, Van Steenkiste C, Van Vlierberghe H. Hemodynamic Changes in Splanchnic Blood Vessels in Portal Hypertension. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Jun;291(6):699-713.
68. Marques C, Mauriz JL, Simonetto D, Marroni CA, Tuñon MJ, González-Gallego J, Marroni NP. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. *Ann Hepatol*. 2011 Oct-Dec;10(4):531-9.
69. Khurram Bari, Guadalupe Garcia-Tsao. Treatment of portal hypertension *World J Gastroenterol* 2012 March 21; 18(11): 1166-1175
70. Alberti KGMM, Price CPP. Biochemical assessment of liver function. In: Wright R, Millward-Sadler GH, Alberti KGMM. *Liver and Biliary Disease*.

- Pathophysiology, Diagnosis, Management. 2^a ed., London: Balliere Tindall, 1985, pp. 455-60
71. Villegas I, Martín MJ, La Casa C, Motilva V, De La Lastra CA. Effects of oxicam inhibitors of cicloxygenase on oxidative stress generation in rat gastric mucosa. A comparative study. *Free Radic Res.* 2002 Jul;36(7):769-77.
 72. Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J Clin Biochem Nutr.* 2012 January; 50(1): 35–39.
 73. Kinjo N, Kawanaka H, Akahoshi T, Yamaguchi S, Yoshida D, Anegawa G, Konishi K, Tomikawa M, Tanoue K, Tarnawski A, Hashizume M, Maehara Y. Significance of ERK nitration in portal hypertensive gastropathy and its therapeutic implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 Nov;295(5):G1016-24.
 74. Ovrebo KK, Sorbye H, Svardal A, Grong K, Svanes K. Glutathione and N-Acetylcysteine Reduce Gastric Mucosal Blood Flow in Rats. *Dig Dis Sci.* 1997 Aug;42(8):1765-74.
 75. Maxwell, SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.* 1995 Mar;49(3):345-61.
 76. Huie RE, Padmaja S. The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18(4):195-9.
 77. Pereira-Filho G., Ferreira, C, Schwengber A, Marroni C, Zetler, C, Marroni, NP. Role of N-Acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrothic rats. *Arq. Gastroenterol.* vol.45 no.2 São Paulo Apr./June 2008.
 78. Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, Picada JN, Marroni NP. N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative Stress Parameters in Cirrhotic Rats with Hepatopulmonary Syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008 Apr;102(4):370-6.
 79. Kikkawa S, Kadohara M, Kawasaki H. Superoxide dismutase and glutathione in the gastric mucosa of patients with chronic liver disease. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1992 Dec;78(3):289-309.
 80. HitoshiMaruyama and Osamu Yokosuka. Pathophysiology of Portal Hypertension and Esophageal Varices. *Intern J of Hepatology* Volume 2012, Article ID 895787, 7 pages

81. Rodriguez-Vilarrupla A, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol.* 2007 Feb;46(2):193-7. Epub 2006 Dec 1.
82. Atlas of Gastroenterological Endoscopy [webpage] <http://www.endoskopischer-atlas.de/undefined>
83. Medicina Geriátrica [webpage] <http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/08/16/>
84. Sarin SK, Sabba C, Groszmann RJ. Splanchnic and systemic hemodynamics in mice using a radioactive microsphere technique. *Am J Physiol.* 1990 Mar;258(3 Pt 1):G365-9.
85. Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portalsystemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology.* 2004 Mar;126(3):886-94.
86. Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Nov;283(5):G1074-81.
87. Sweat ER, Musicant ME, Annetts DL, Goodhead B, Orloff MJ. Production of hepatic outflow block and ascites with an ameroid constrictor. *Surg Forum* 1966; 17: 376-378
88. Sarin SK, Groszmann RJ, Mosca PG, Rojkind M, Stadecker MJ, Bhatnagar R, Reuben A, Dayal Y. Propranolol ameliorates the development of portal-systemic shunting in a chronic murine schistosomiasis model of portal hypertension. *J Clin Invest.* 1991 March; 87(3): 1032–1036.
89. Sarin SK, Mosca P, Sabba C, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in a chronic murine schistosomiasis model of portal hypertension. *Hepatology.* 1991 Mar;13(3):581-4.
90. Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol.* 1986 Aug;251(2 Pt 1):G176-80.
91. Graupera M, García-Pagán JC, Títos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, Rodés J. 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic ascular

- resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology*. 2002 Feb;122(2):387-93.
92. Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol*. 2002 Apr;36(4):488-93.
93. de David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, González-Gallego J, Tuñón MJ, Marroni NP. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol*. 2011 Oct;39(6):949-57.
94. Veal N, Oberti F, Moal F, Vuillemin E, Fort J, Kaassis M, Pilette C, Cales P. Spleno-renal shunt blood flow is an accurate index of collateral circulation in different models of portal hypertension and after pharmacological changes in rats. *J Hepatol*. 2000 Mar;32(3):434-40.
95. DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, Hu L, McCuskey MK, Epstein RB, Kanel GC. Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology*. 1999 Jun;29(6):1779-91.
96. Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portalhypertensive rats. *Hepatology*. 1992 Feb;15(2):323-8.
97. Panés J, Casadevall M, Piqué JM, Bosch J, Whittle BJ, Terés J. Effects of acute normovolemic anemia on gastric mucosal blood flow in rats: role of nitric oxide. *Gastroenterology*. 1992 Aug;103(2):407-13.
98. Panés J, Casadevall M, Fernández M, Piqué JM, Bosch J, Casamitjana R, Cirera I, Bombí JA, Terés J, Rodés J. Gastric microcirculatory changes of portal-hypertensive rats can be attenuated by long-term estrogen-progestagen treatment. *Hepatology*. 1994 Nov;20(5):1261-70.

ANEXOS

ANEXO A - Artigo redigido com os resultados da presente dissertação

Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy

Authors

Francielli Licks

Federal University of Rio Grande do Sul

Paulo Gama, 110

90040-060

Brazil - Porto Alegre/RS

francielli.licks@gmail.com - Corresponding author

Camila Marques

Federal University of Rio Grande do Sul

Paulo Gama, 110

90040-060

Brazil - Porto Alegre/RS

camilam14@gmail.com

Cláudio Zettler

Lutheran University of Brazil

Farroupilha, 8001

92425-900

Brazil - Canoas/RS

zettler@terra.com.br

Cláudio Augusto Marroni

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre

Sarmiento Leite, 245

90050-170

Brazil - Porto Alegre/RS

proreitorias@ufcspa.edu.br

Maria Isabel Morgan Martins

Lutheran University of Brazil

Farroupilha, 8001

92425-900

Brazil - Canoas/RS

morganmartins@terra.com.br

Norma Possa Marroni

Clinical Hospital of Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2.350

90035-903

Brazil - Porto Alegre/RS

nmarroni@terra.com.br

ABSTRACT

BACKGROUND: Portal Hypertension (PH) is a clinical syndrome associated with the development of a hyperdynamic circulation and gastroesophageal varices. The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of N-Acetylcysteine on portal hypertensive rats. **METHODS:** PH was induced by partial portal vein ligation (PPVL). The oxidative damage in the stomach was measured by lipoperoxidation through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and antioxidant enzyme activity; we also evaluated nitrates

and nitrites level and histology stained by hematoxylin-eosin. We performed evaluation of portal pressure and measurement of vessels diameter. Liver damage was evaluated by measuring hepatic enzymes. The animals were divided in four experimental groups (n=6): Sham-operated (SO), SO + NAC, Partial portal vein ligation (PPVL) and PPVL + NAC. N-acetylcysteine (10 mg/kg ip) was administered daily for 7 days and started 8 days after surgery. RESULTS: All data are presented as means \pm standard error. There was no difference between the values of hepatic enzymes. The portal hypertensive group showed an increase in portal pressure, vessels diameter, levels of TBARS and nitrates and nitrites when compared to SO group. These values were accompanied by a decrease in superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) antioxidant enzyme activity. Histology showed dilated vessels in the gastric mucosa in the PPVL group. Treatment with NAC was able to decrease portal pressure values, vessels diameter, TBARS and also nitrates and nitrites levels when compared to PPVL group. Furthermore, PPVL+NAC group presented an increase in SOD and GPx activity. In histological evaluation, N-acetylcysteine attenuated damage in gastric mucosa. CONCLUSIONS: The data allow us to conclude that oxidative stress is associated with portal hypertension and that antioxidant NAC is able to minimize damages of PPVL in rats.

Key Words: Antioxidant, N-Acetylcysteine, Portal hypertensive gastropathy

BACKGROUND

Portal hypertension (PH) is a clinical syndrome which is hemodynamically defined as a pathological increase in portal pressure, with consequent formation of porto-systemic collaterals that deviate blood flow from the portal system directly to systemic circulation [1].

In clinical PH, the emergence of this collateral circulation leads to dilatation of vessels especially in the stomach and esophagus, leading to portal hypertensive gastropathy (PHG), which is characterized by vasodilation in the gastric submucosa. These hemodynamic disturbances lead to bleeding in 80-90% of cases^[2] due to the progressive dilatation of vessels that break and lead to hemorrhage^[1].

Partial Portal Vein Ligation (PPVL) is the most used experimental model to study the pathophysiology of prehepatic portal-hypertension gastropathy. It has been developed by Sikuller^[8] and several experimental studies demonstrated that PPVL manifests gastric abnormalities equivalent to PHG in humans^[7]. One week after PPVL the operated animals already develop PHG and approximately 100% of these animals present portosystemic *shunting* and hyperdynamic circulation, in other words, collateral vessels^[7].

Oxidative stress has been appointed as trigger factor to the progression of several diseases. In PH, it is related to the development of the hyperdynamic circulation^[47] and to the overproduction of nitric oxide (NO). Recently, increased NO serum levels were found in patients with portal hypertensive gastropathy, being implicated in the pathogenesis of this disease^[48]. The enhanced synthesis of NO induces peroxynitrite formation by reaction to other reactive species of oxygen, therefore increasing oxidative damage to the gastric mucosa^[39].

The use of antioxidant therapy may minimize the effects of oxidative stress in portal hypertension^[3]. N-Acetylcysteine (NAC) is a reliable, inexpensive and well-tolerated antioxidant, with a well-known mechanism. Treatment with NAC was found to improve the levels of glutathione, the major endogenous antioxidant of humans. NAC can also decrease the bioavailability of nitric oxide by binding its thiol component with it and forming nitrothiol^[46].

The primary aim of this study was to evaluate the antioxidant action of NAC by assessing liver integrity, stomach lipoperoxidation through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the activity of antioxidant

enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase, as well as perform the measurement of nitrites and nitrates and histological analysis in stomach of rats submitted to the experimental model of PPVL.

METHODS

Ethics

The experimental procedures complied with the rules established by the Research Ethics Committee of the Lutheran University of Brazil, Canoas, RS, Brazil.

Animals

Twenty-four male Wistar rats weighing 250g were used. They were obtained from State Foundation of Production and Research in Health (FEPPS), Porto Alegre, RS. They were kept at the vivarium of the Lutheran University of Brazil in plastic boxes measuring 47x34x18cm lined with wood chips, under a 12-hours dark/light cycle (light from 7 a.m. to 7 p.m.) at a temperature of $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$. The rats were fed 16 g per animal/day on rat chow (Purina-Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil) and had water *ad libitum*.

Groups and Treatment Protocols

The animals were divided in four experimental groups (n=6): Sham-operated (SO), SO + NAC, Partial portal vein ligation (PPVL), and PPVL + NAC. N-Acetylcysteine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; CAS registry number 616-91-1) was dissolved in 0.6 ml of 0.9% NaCl and injected in a dose of 10 mg/kg intraperitoneally of animal weight [41]. The animals of the PPVL and SO groups received the same volume of vehicle, without NAC, for the same period as the ones in PPVL+NAC and SO+NAC groups. It was administered daily starting on day 8 after surgery and extended for 7 days.

Portal Hypertension Induction

The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (100mg/kg ip) and xylazine hydrochloride (50 mg/kg ip). After a medium incision in the abdomen, bowels were gently withdrawn on a humidified gauze with saline and the portal vein was isolated. A 20g needle was placed on the portal vein and both were tied up using a 3.0 silk yarn, the needle being gently withdrawn after ligation. Afterwards, we tested for the absence of portal vein thrombosis by manipulating the spot. [8].

The sham-operated group was submitted to the same procedure, although their portal veins did not undergo partial portal vein ligation.

Euthanasia

On day 15 after the surgery the animals were anaesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg) and xylazine hydrochloride (50 mg/kg ip). Through a heparinized capillary, a blood sample was taken from the retro-orbital plexus in order to assess liver integrity by aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotranferase (ALT), and alkaline phosphatase (FA) [9]. The abdomen was shaved, followed by laparotomy, and the stomach was removed for histological analysis to evaluate the tested segment; the rest was frozen - 80°C for later biochemical analysis. The animals were killed by exsanguination under deep anaesthesia [10,11].

Measurement of Portal Pressure

Portal pressure was measured in mmHg on a Poligraph 2006 (*Lettica* Scientific Instruments, Barcelona, Spain) by cannulation of the mesenteric vein with a catheter.

Stomach Homogenates

The stomachs were cut with scissors and weighed. Five millilitres of phosphate buffer (140 mM KCL, 20 mM phosphate, pH 7.4) per tissue gram was

added, and the tissue was homogenized in an Ultra Turrax (IKA-WERK) for 40 seconds at 4°C. Next, it was centrifuged for 10 minutes at 4.000 rpm (2150.4 x g) (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge). The supernatant was pipetted into Eppendorf flasks, and the precipitate was discarded. The samples were stored again at -80°C for posterior analyses.

Protein

We used the Bradford method to quantify protein, with bovine albumin as the standard (SIGMA®). The samples were measured spectrophotometrically at 595 nm, and values expressed in mg/mL were used to calculate values of TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) and antioxidant enzymes [12].

Stomach Liperoxidation

The amount of aldehydes generated by lipid peroxidation is measured by the TBARS method, which measures the amount of substances reacting with thiobarbituric acid. The samples were incubated at 100°C for 30 minutes after addition of 500 µL of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid and centrifuged at 3000 rpm (1612.8 x g) for 10 minutes at 4°C. Absorbance was determined spectrophotometrically at 535 nm and values were expressed in nmol/mgprot [13].

Nitrates and nitrites levels

The levels of nitrates and nitrites were measured by the reaction of the samples with Griess reagent. Aliquots of 50 µL were incubated with enzyme cofactors and nitrate reductase for 30 minutes at room temperature for the conversion of nitrate to nitrite. The nitrite formed was then analysed by reaction with the Griess reagent, forming a coloured compound that was measured by spectrophotometer at a wavelength of 540 nm [41].

Antioxidants Enzyme Analyses

The analysis of superoxide dismutase (SOD) in stomach is based on the inhibition of the reaction of the superoxide radical with adrenaline, values expressed in U/mgprot^[14]. Glutathione peroxidase (GPx) activity is based on the consumption of NADPH in the reduction of oxidized glutathione and values were expressed in nmol/mgprot^[15].

Histological Analyses

For histological evaluation, stomach fragments slides were stained with hematoxylin and eosin and subsequently assessed by a single pathologist in blind fashion. The vessels caliber was measured in pixels.

Statistical analysis

All data are presented as means \pm SE. Statistical significance was calculated using Graphpad InStat, version 3.0 for Windows. Variance analysis (ANOVA) and Student-Newman-Keuls were used for multiple analysis, and the level of significance was 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

Transaminase activities

No significant differences were found for any of the tested parameters across the four groups sampled (Table 1).

Portal Pressure Measurement

There was a statistically significant increase in portal pressure values in the PPVL group as compared to SO ($P < 0.001$), and in the NAC-treated group these values were significantly decreased ($P < 0.001$) (Figure 1).

Stomach Lipoperoxidation Analysis

TBARS values in the stomach were found to be significantly increased in the PPVL as compared to the SO group ($P<0.001$). In the treated PPVL group those values were significantly decreased, getting close to those of the sham-group ($P<0.001$) (Figure 2).

Nitrates and nitrites levels

NO values in the stomach were found to be significantly increased in the PPVL as compared to the SO group ($P<0.01$). In the NAC-treated PPVL group those values were significantly decreased ($P<0.05$) (Figure 3).

Antioxidant enzyme activity analysis

SOD activity was significantly decreased in PPVL animals as compared to SO ($P<0.05$), and NAC treatment caused a significant increase in SOD values as compared to the PPVL group ($P<0.05$) (Figure 4).

GPx activity showed the same behavior as SOD, with a significant decrease in the PPVL group as compared to SO ($P<0.05$). NAC was able to reverse this effect, as there was a significantly increase in GPx values in NAC-treated animals as compared to the values obtained for the PPVL group ($P<0.05$) (Figure 5).

Histological Analysis

Hematoxylin-eosin staining evidenced modifications in the normal architecture of the stomach, with edema and vasodilation in the PPVL group, and an attenuation of most changes in NAC-treated animals. (Figure 6A, B, C). PPVL animals presented an increase of vessels diameter ($P<0,001$), and NAC-treated animals demonstrated a decrease of those values ($P<0,001$), minimizing the damage and vasodilation in this experimental model (Figure 7).

DISCUSSION

Portal Hypertension (PH) is associated with the development of a hyperdynamic circulation, which is characterized by vasodilation and the increase of cardiac output and/or blood flow [17]. The development of portal-systemic collaterals is a vascular response to the increased portal pressure. Gastroesophageal varices are the most prominent collaterals, which develop in order to divert blood flow from the portal system and direct it to the systemic circulation [37]. The vasodilation occurring in the stomach leads to portal hypertensive gastropathy.

Oxidative stress leads to an imbalance in the redox status of the cell, either by excessive generation of reactive oxygen species (ROS) or a decrease in antioxidant enzymes [49]. The overproduction of ROS has been implicated in PH and PHG [21,24].

Nitric oxide is a central mediator of the vasoreactive and angiogenic abnormalities observed in portal hypertension. There are three known isoforms: eNOS (endothelial), iNOS (inducible), and nNOS (neuronal) [30]. The increased resistance promotes *shear stress* within the mesenteric circulation promoting high activity of eNOS by triggering transcription, phosphorylation by Akt, binding to Hsp90 and augment of calcium-calmodulin binding [43,44,26,31]. However, studies have been postulating the hypothesis of vascular endothelial growth factor (VEGF) being the primary stimulus for eNOS activation, and subsequently trigger factor for the development of hyperdynamic collateral circulation [32].

iNOS is also implicated in PH, NO being an effector of the immune system [33]. Many investigators have concluded that enhanced NO synthesis contributes to the hyperdynamic circulation of PH [31,34]. NO can combine with superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) to form peroxynitrite anion ($ONOO^-$), nitrosothiols, nitrogen dioxide (NO_2) and other nitrosant species. The excessive generation of nitric oxide (NO) by these endothelial disorders promotes reaction to ROS, increasing, therefore, the oxidative damage [5].

Many are the experimental models used to study the complications of intra, pre- and post-hepatic PH, and PPVL is among the pre-hepatic ones [7]. In a prehepatic model, like the one used in this work, there is splenomegaly, splenic vessels dilation, and development of expressive collateral circulation that determines the emergence of gastro-esophageal varices, characterizing the portal hypertensive syndrome [18].

The fact that PPVL leads to oxidative damage was previously described by Fernando *et al.*, who stated that ROS generation may be intimately related to the hemodynamic alterations seen in portal hypertension [4].

N-Acetylcysteine (NAC) is currently used clinically to reverse overdose by acetaminophen and also as a mucolytic agent in respiratory illnesses, to attenuate the influenza virus when started before infection, and in the treatment of pulmonary fibrosis. This is due to its ability to support endogen antioxidants and modulate nitric oxide (NO) production during stressing situations, infections, toxic aggressions, and inflammatory conditions [6]. In disorders where NO plays an important role, those properties are extremely important. The decrease of NO by NAC could minimize the oxidative stress in these disorders.

NAC presents potent ability to interact with oxidant agents acting as scavenger of free radicals, and improves the antioxidant mechanism contributing to restore glutathione [31].

Recently, NAC was used in an experimental model of hepatic encephalopathy, a consequence of cirrhosis, with very promising results[21]. However, studies evaluating the effect of NAC on antioxidant enzymes and histological parameters using the experimental model of PPVL are not found.

In the evaluation of liver enzymes, we did not observe any statistical difference between the sampled groups (Table 1). This confirms previous studies showing that PPVL does not effect any hepatocellular damage [26], although causing a transient reduction in the metabolic activity of the liver[35].

This experimental model does not inflict cirrhosis, since according to Bosch et al, it is a experimental model of pre-hepatic portal hypertension [45, 19,20].

We observed a significant increase in portal pressure in the PPVL as compared to the SO group. This demonstrates the effectiveness of this experimental model and confirms a previous study performed in our laboratory [22]. NAC was able to reduce portal pressure in the PPVL+NAC group (Figure 1). Experimental models of injury induced by indomethacin demonstrated vascular changes [23], and NAC seems to be able to modulate the production of nitric oxide [6,26].

The overproduction of NO has a cytotoxic potential, enhancing mucosal injury[36]. A previous study detected enhanced NO production in this experimental model [37], which can be related to the induction on eNOS, nNOS and iNOS mRNA expression, as previously described in portal hypertensive gastric mucosa[38,39]. Previous studies by our group reported that the antioxidant treatment with glutamine and quercetin were able to reduce NO production, ameliorating the gastric mucosa integrity [37,21]. Similar results were found in this study, in which N-Acetylcysteine was able to decrease significantly the values on PPVL+NAC group.

ROS overproduction has been described as implicated in PH [24, 21]. We observed increased lipoperoxidation, as evaluated by TBARS, in PPVL animals, and NAC administration was associated with significant decreases in those values (Figure 2). Lipoperoxidation was evaluated previously in this model through F₂-Isoprostanes measurement, and NAC treatment was able to improve this condition, just as it did in the present study [24].

The increased lipoperoxidation was accompanied by a significant decrease in SOD and GPx activities, and NAC reverted this picture, increasing them (Figures 3 and 4).

SOD decrease is in line with previous studies [37, 21,24], and this reduction may enhance lipid peroxidation. Along these lines, SOD decrease appears to be related to its "scavenger" action on superoxide anions [27], overproduced on PH.

In previous studies, antioxidant treatment was able to minimize this SOD decrease, as the administration of quercetin and glutamine were able to normalize SOD activity and reduce the oxidative stress ameliorating the gastric damage induced by PH in PPVL rats [37,21].

Glutathione has been implied as possible mediator in the gastric mucosal defense against injury^[25]. NAC acts as precursor of GSH, facilitating its biosynthesis [28], explaining GPx increase in treated animals. This drug is defined as a precursor for the synthesis of this antioxidant enzyme^[31], and a previous study concluded that NAC reduces gastric mucosal blood flow, this effect being related to increased cysteine levels in the mucosa^[25].

In the histological analysis, we observed modifications in the architecture of the gastric mucosa of PPVL rats, which showed edema and vasodilation. NAC was able to attenuate most of the histological abnormalities (Figure 6 A,B,C) by decreasing vasodilation in this experimental model (Figure 7).

Different authors have demonstrated that PPVL rats show abnormalities of the gastric microvasculature similar to those observed in humans with PH^[7]. Our group described previously that antioxidant treatment in experimental model of PPVL is able to ameliorate the gastric mucosa [37,21].

The decrease in GPx and SOD activities in the gastric mucosa, accompanied by increased lipoperoxidation demonstrates the presence of oxidative damage in animals submitted to this experimental model of PPVL, with hemodynamic alterations such as increased portal pressure and vasodilation/edema in the gastric mucosa. The decrease in lipoperoxidation values associated with the increase in SOD and GPx activities evidence the effectiveness of N-Acetylcysteine in portal hypertension, possibly because of its antioxidant capacity.

In portal hypertensive gastropathy, it is important to define a suitable medication, able to minimize the oxidative damage and findings in the gastric mucosa. These are the main triggering events that lead to bleeding and anemia in clinical PHG, being them the major complications occurring in these patients.

The use of an antioxidant therapy, capable of decreasing these complications is much valuable, in this study we observed N-Acetylcysteine acting in favor of minimizing all damage induced by PPVL in rats. Therefore, NAC can be beneficial in the treatment of portal hypertensive gastropathy.

CONCLUSION

In sum, NAC was able to minimize the damage to the gastric mucosa of animals submitted to the experimental model of PPVL. This antioxidant was able to ameliorate rats with portal hypertension, by decreasing portal pressure and minimizing oxidative damage evaluated through TBARS, antioxidant enzymes SOD and GPx. N-Acetylcysteine also decreased the overproduction of nitric oxide in PPVL rats and also the vessels caliber, therefore minimizing the vascular dilation in this experimental model.

COMPETING INTERESTS

The author(s) declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

FL, CMarques, CZ, CMarroni, MIMM and NPM contributed equally to this work; NPM designed research; CZ carried out the histology; FL and CM performed the research; CMarroni and MIMM helped to draft the manuscript; FL wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the financial support of Clinical Hospital in which this project was submitted under number 11-0293, and Lutheran University of Brazil. We also thank the staff at Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology and Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants for their excellent scientific support.

REFERENCES

1. Bosh J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes, J. **The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options.** *Journal of Hepatology* 2008, **48**:S68–S92.
2. Majid S, Azam Z, Hasnains AS, Mohammad S, Hamis S, Abid S, Jafri W. **Factors determining the clinical outcome of acute variceal bleed in cirrhotic patients.** *Indian J. Gastroenterology* 2009, **28**(3):93-95.
3. Rodríguez-Vilarrupla A, Bosch J, Garcia-Paga JC. **Potencial role of antioxidants in the treatment of portal hypertension.** *Journal of Hepatology* 2007, **46**:193-197..
4. Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K. **N-Acetylcysteine Prevents Development of the Hyperdynamic Circulation in the Portal Hypertensive Rat.** *Journal Hepatology* 1998, **28**:689-694
5. Huie RE, Padmaja S. **The reaction of no with superoxide.** *Free Radic Res Commun* 1993, **18**:195–199.
6. Millea PJ. **N-Acetylcysteine: Multiple Clinical Applications.** *American Family Physician* 2009, **80**(3):265-269.
7. Abraldes JG, Pasarín M, Garcia-Pagan JC et al. **Animal models of portal hypertension.** *World J. Gastroenterology* 2006, **12**(41):6577-6584.
8. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. **Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model.** *American Journal Physiology* 1985, **248**(6):G618-25.

9. Halpern BN , Pacaud A. **Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus.** *C R Seances Soc Biol Fil.* 1951, **145**(19-20) p.14656.
10. [Anon]. **AVMA updates its euthanasia guidelines.** *Veterinary Record* 2007, **161**(15): p. 502-502.
11. [Anon]. **AVMA releases updated euthanasia guidelines.** *Javma-journal of the american veterinary medical association* 2007, **231**(6): p. 827-827.
12. Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry* 1976, **72**:248-54.
13. Buege JA, Aust SD. **Microsomal Lipid Peroxidation.** *Methods Enzymol* 1978, **52**:302-10.
14. Mirsa 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**(10): p. 3170-5.
15. Flohe L, Gunzler WA. **Assays of glutathione peroxidase.** *Methods Enzymol* 1984, **105**:114-21.
- 16 Groszmann RJ. **Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences.** *Hepatology* 1994,**20**:1359–63.
17. Colle I, Geerts AM, Van-Steenkiste C, Vlierbergue Hans-Van. **Hemodynamic Changes in Splanchnic Blood Veseels in Portal Hypertension.** *The anatomical Record* 2008, **291**:699-713

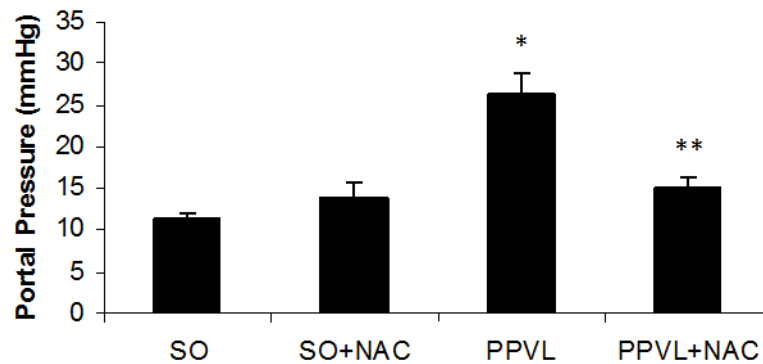
18. Bruck R, Shirin H, Aeed H, Matas Z, Hochman A, Pines M. **Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers.** *Hepatology* 2001, **35**:457-64.
19. Bosch, J. et al. **Heme oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation, and increases VEGF expression in portal hypertensive rats.** *J Hepatology* 2005, **44**(6):1033-9.
20. Bosch, J. **Anatomical differences in responsiveness to vasoconstrictors in the mesenteric veins from normal and portal hypertensive rats.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996, **354**(4):474-80.
21. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado P, Zetler C, Marroni NP. **Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats.** *Biochem Pharmacology* 2004, **68**:1939-46.
22. Dudenhofer AA, Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Gupta T, Groszmann RJ. **Bioactivation of nitroglycerin and vasomotor response to nitric oxide are impaired in cirrhotic rat livers.** *Hepatology* 2002, **36**:381-385.
23. Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, Tomii T, Kaneko T, Linuma S. **Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats.** *Gut* 1993, **34**:732-7.
24. Villegas I, Martin 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.
25. Kjell K, Haldfdan S, Svardal A, Grong K, Svanes K. **Glutathione and N-Acetylcysteine Reduce Gastric Mucosal Blood Flow in Rats.** *Digestive Diseases and Sciences* 1997, **42**:1765-1774.
26. Boo YC, Jo H. **Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, **285**:C499-C508.

27. Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. **Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine.** *J Hepatol* 1997, **27**:363-70.
28. Pereira-Filho G., Ferreira, C, Schwengber A, Marroni C, Zetler, C, Marroni, NP. **Role of N-Acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats.** *Arg Gastroenterol* 2008, **45**-2.
29. Pechanova O, Kunes J, Dobesova Z., Vrankova S, Zicha J. **Contribution of neuronal nitric oxide (no) synthase to n-acetylcysteine-induced increase of no synthase activity in the brain of normotensive and hypertensive rats.** *Journal of physiology and pharmacology* 2009, **60**: 21-25.
30. Shan V, Lyford G, Gores G, Farrigia G. **Nitric oxide in gastrointestinal health and disease.** *Gastroenterology* 2004, **126**:903-913.
31. Langer D, Shan V. **Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis.** *Journal of Hepatology* 2006, **44**:209-216.
32. Fernandes 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.
33. XuJ, Cao H, Liu H, Wu ZY. **Role of nitric oxide synthase and cicloxygenase in hyperdynamic splanchnic circulation of portal hypertension.** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008, **7**: no5.
34. Wiest R, Groszmann RJ. **The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough.** *Hepatology* 2002, **35**:478-491
35. 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.

36. 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**:73-78
37. Marques C, Mauriz JL, Simonetto D, Marroni CA, Tuñon MJ, Marroni NP, González- Gallego J. **Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy.** *Surgery*, in press.
38. El-Newithi HM, Kanji VK, Mihas AA. **Activity of gastric mucosal nitric oxide synthase in portal hypertensive gastropathy.** *Am J gastroenterol* 1996, **91**:535-38
39. 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.
40. 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.
41. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. **Measuring nitric oxide production in human clinical studies.** *Methods Enzymol* 1999, **301**:49-61.
42. Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer M, Picada JN, Marroni NP. **N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative Stress Parameters in Cirrhotic Rats with Hepatopulmonary Syndrome.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2008, **102**: 370-376.
43. Iwakiri Y, Abralde JG, Loureiro-Silva M, Haq O, Groszmann RJ. **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Up-regulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Up-Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in the intestinal microcirculatory bed leading to the hyperdynamic circulatory syndrome in mild portal hypertension.** *Gastroenterology* 2005, **128**:A-681.

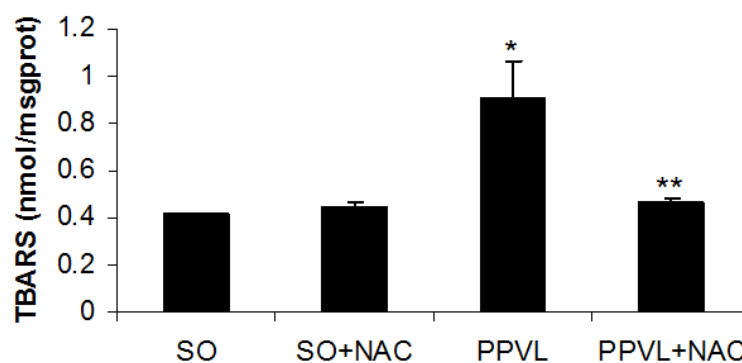
44. Fleming I, Busse R. **Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.** *Am J Physiol Regul Integr* 2003, **284**:R1-R12.
45. Bosch, J. et al. **Gastric mucosal resistance to acute injury in experimental portal hypertension.** *Br J Pharmacol* 2001, **132(1)**:309-17.
46. Failli P, Palmieri L, D'Alfonso C et al. **Effect of N-acetyl-Lcysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis.** *Nitric Oxide* 2002, **7**:277-82.
47. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodler D. **Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis.** *Hepatology* 1999, **29**: 1358-63.
48. Seckin Y, Harputluoglu MM, Batcioglu K, Karıncaoglu M, Yildirim B, Oner RI. **Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis.** *Dig Dis Sci* 2007, **52**: 1154-8.
49. Novo E, Parola M. **Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis.** *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2008, **1**:5.

Figure 1



Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on portal pressure. Sham-operated group (SO); Sham-operated treated with NAC group (SO+NAC); Partial portal vein ligation group (PPVL); Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). *P < 0.001 against sham-operated, ** P < 0.001 against PPVL.(n=6)

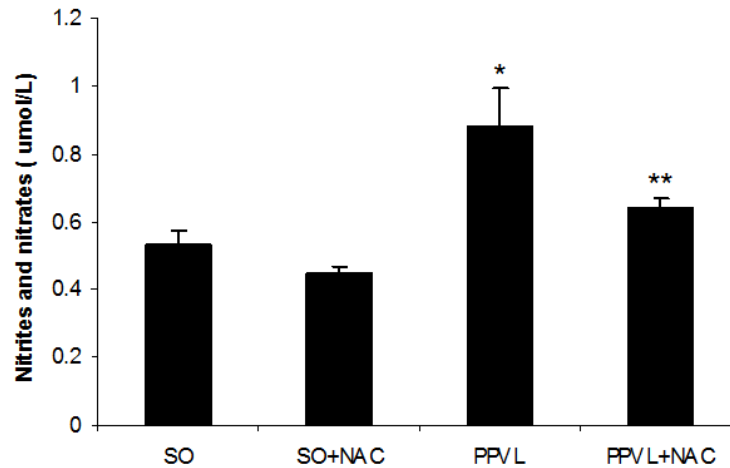
Figure 2



Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on gastric mucosa TBARS. Sham-operated group (SO); Sham-operated treated with NAC group (SO+NAC); Partial portal vein ligation

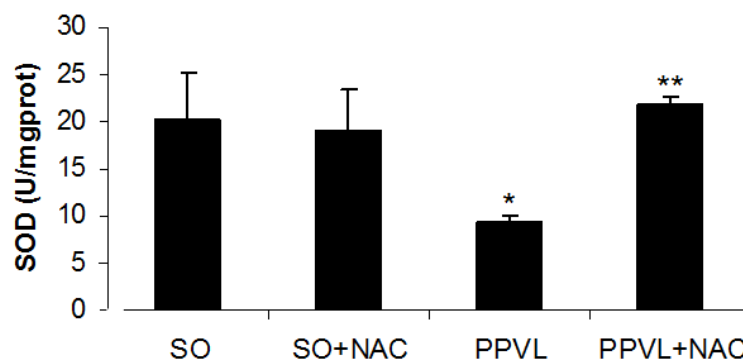
group (PPVL); Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). *P < 0.001 against sham-operated, ** P< 0.001 against PPVL. (n=6)

Figure 3



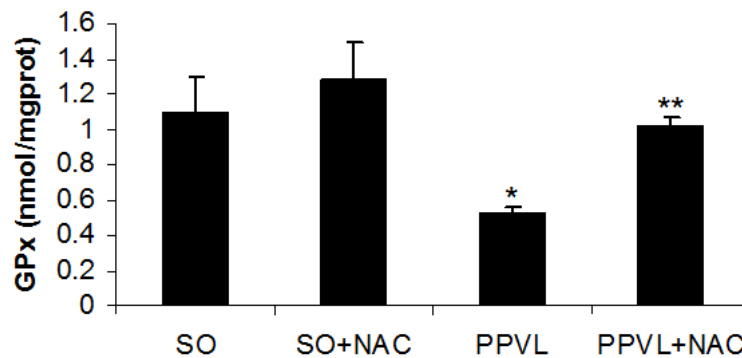
Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on nitrates and nitrites level. Sham-operated group (SO); Sham-operated treated with NAC group (SO+NAC); Partial portal vein ligation group (PPVL); Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). *P < 0.01 against sham-operated, ** P< 0.05 against PPVL. (n=6)

Figure 4



Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on gastric mucosa SOD enzyme. Sham-operated group (SO); Sham-operated treated with NAC group (SO+NAC); Partial portal vein ligation group (PPVL); Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). *P < 0.05 against sham-operated, ** P < 0.05 against PPVL. (n=6)

Figure 5



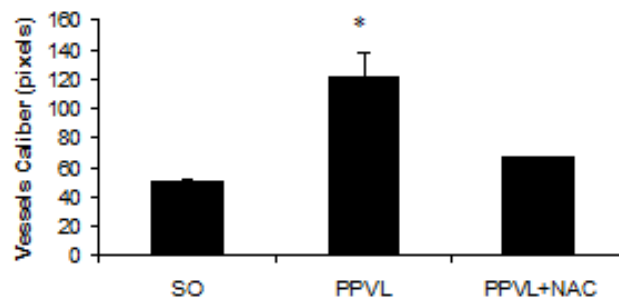
Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on gastric mucosa GPx enzyme. Sham-operated group (SO); Sham-operated treated with NAC group (SO+NAC); Partial portal vein ligation group (PPVL); Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). *P < 0.05 against sham-operated, ** P < 0.05 against PPVL. (n=6)

Figure 6



Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on gastric mucosa histology. A: SO; B: PPVL; C: PPVL+NAC. Magnification of 40X. SM: submucosae, MM: muscular mucosa, G: glandular tissue. Hematoxylin-eosin histology evidenced modifications of the normal architecture, with vasodilation in the gastric PPVL group, pointed by the arrows. NAC was able to ameliorate tissue integrity by minimizing vasodilation.

Figure 7



Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on vessels caliber. Sham-operated group (SO); Partial portal vein ligation group (PPVL); Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). *P < 0.001 against sham-operated, ** P< 0.001 against PPVL.

Table 1 Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on serum AST, ALT and FA activities. Aspartate Aminotransferase (AST); Alanine Aminotransferase (ALT); Alkaline Phosphatase (FA); Sham-operated group(SO); Sham-operated treated with NAC group (SO+NAC); Partial portal vein ligation group (PPVL), Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). There was no statistic difference between the sampled groups.

	AST(U/L)	ALT(U/L)	FA(U/L)
SO	197.67	42.83	128.17
SO+NAC	189.17	35.17	107.33
LPVP	173.83	46.40	144.00
LPVP+NAC	196.83	35.20	120.00