

---

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA CIRÚRGICA  
TESE DE DEFESA DE DOUTORADO**

**GILMARA PANDOLFO ZABOT**

**O PAPEL DA GLUTAMINA NAS ALTERAÇÕES INTESTINAIS DA HIPERTENSÃO  
PORTAL EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE  
LIGADURA PARCIAL DA VEIA PORTA**

**Porto Alegre  
2017**

---

---

**GILMARA PANDOLFO ZABOT**

**O PAPEL DA GLUTAMINA NAS ALTERAÇÕES INTESTINAIS DA HIPERTENSÃO  
PORTAL EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE  
LIGADURA PARCIAL DA VEIA PORTA**

Tese de defesa de doutorado apresentada como requisito para obtenção do Grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientador:**

**Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal**

**Porto Alegre**

**2017**

---

---

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO

### Ficha Catalográfica

Z12 p Zabet, Gilmara Pandolfo

O papel da glutamina nas alterações intestinais da hipertensão portal em ratos submetidos ao modelo experimental de ligadura parcial da veia porta : A Glutamina Previne o Estresse Oxidativo em um Modelo de Hipertensão Portal / Gilmara Pandolfo Zabet . – 2017.

105 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal.

I. Hipertensão Portal. 2. Glutamina. 3. Lipoperoxidação. 4. Glutathione Peroxidase. 5. Isomorfias da Óxido Nítrico Sintase. I. Carvalhal, Gustavo Franco. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

**GILMARA PANDOLFO ZABOT**

**O PAPEL DA GLUTAMINA NAS ALTERAÇÕES INTESTINAIS DA HIPERTENSÃO  
PORTAL EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE  
LIGADURA PARCIAL DA VEIA PORTA**

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Alexandre Vontobel Padoin

---

**Prof. Dr.**

Dr. Henrique Sarubbi Fillmann

---

**Prof. Dr.**

Dr. Hamilton Petry de Souza

---

**Prof. Dr.**

Dra. Sabrina Fernandes

---

**Prof. Dra.**

Dr. Lúcio Sarrubi Fillmann (Suplente)

---

**Prof. Dr.**

---

*Aos meus pais, que nunca mediram esforços para me ofertar um ensino e educação da melhor qualidade. Sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.*

*A vocês devo tudo o que sou e que conquistei.*

*Obrigada por ensinar-me a lutar e persistir sempre. Esta conquista, mais do que minha, é de vocês.*

*Ao meu marido que sempre me apoiou e me incentivou a seguir em frente, principalmente nos momentos mais difíceis.*

*Obrigada por participar das minhas escolhas, das minhas conquistas e por fazer parte da minha vida.*

*Aos meus filhos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, sabendo que o caminho escolhido era importante para minha carreira profissional. Desculpas pelas ausências frequentes.*

*Obrigada pelo carinho e afeto nos momentos de dificuldade.*

*Amo vocês.*

*Ao Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal, que aceitou ser o meu orientador, tanto no mestrado como no doutorado. Obrigada pelo estímulo, apoio e confiança constantes e, principalmente pela ajuda no momento crucial da minha tese.*

*Ao Prof. Dr. Henrique Sarubbi Fillmann, que, desde o início, me apoiou na minha decisão de realizar o mestrado e o doutorado. Foi o mentor do meu objeto de estudo, além de ser meu amigo, professor e, acima de tudo, meu mestre. Tens toda a minha admiração. És uma pessoa que admiro muito e um amigo para todas as horas.*

*Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, que aceitou participar deste projeto, trabalhando com marcadores que ainda não tinham sido testados para este fim. Foi decisivo no momento de maior turbulência, onde achávamos que poderia estar tudo perdido. Obrigada por tudo.*

*Sobretudo, o meu agradecimento a DEUS.*

## AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela infraestrutura. Obrigada por ter, ao longo do curso, disponibilizado uma bolsa de estudos.

Ao **Corpo Docente** do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Seus ensinamentos foram um acréscimo inestimável à minha formação.

Ao meu colega **Sergio Albuquerque Frederes**, que, mais do que um sócio, é um amigo, um mestre e o responsável inicial pela minha escolha, pois foi quem me incentivou a realizar o mestrado e o doutorado.

Aos funcionários do Biotério, que sempre estiveram disponíveis e prestativos a ajudar no que era preciso.

Ao **Tiago Giulianni**, técnico em histologia, por todo apoio nos procedimentos histológicos. Fostes muito importante neste trabalho.

Ao Rodrigo Bonfanti Erthal, técnico em informática, que teve atuação decisiva nas áreas em que não dominava.

Ao Prof. Dr. Alexandre Vontobel Padoin que disponibilizou uma bolsa de estudos ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Lúcio Sarubbi Filmmann que permitiu que eu fizesse o meu estágio de docência em seu serviço.

A todos os meus **amigos** que, de alguma forma, alguns talvez até mesmo sem saber, colaboraram para mais esta conquista na minha vida e compreenderam as minhas ausências.

Aos meus **colegas da COLOPROCTO**, que acompanharam principalmente a etapa final deste trabalho, sempre me apoiando e estimulando.

Aos **colegas do curso de Mestrado e Doutorado** que cruzaram por mim nesta jornada e tornaram-se cúmplices e amigos nestes três anos de estudos.

Muito obrigada!

## RESUMO

**Objetivos:** O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a ação da glutamina em ratos com hipertensão portal (HP), submetidos ao modelo experimental de ligadura parcial da veia porta (LPVP). Os objetivos secundários foram: determinar a lipoperoxidação no intestino através da técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); avaliar a atividade de uma enzima antioxidante (glutathione peroxidase) no intestino; avaliar as alterações histopatológicas, consequentes à HP, no intestino; quantificar a expressão das enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), pela técnica de imunistoquímica.

**Material e Métodos:** Ratos machos da raça Wistar foram mantidos em caixas plásticas, em ciclo de 12 horas claro/escuro, com água e ração administradas *ad libitum*. Foram utilizados Vinte e quatro ratos divididos, de forma randomizada, em quatro grupos experimentais: (1) grupo controle (Controle) – (Grupo submetido à simulação da cirurgia, e administração de veículo: cloreto de sódio - NaCl); (2) grupo controle + glutamina (Glutamina) – os ratos foram submetidos à simulação da cirurgia e administração da glutamina; (3) Hipertensão portal (LPVP) – os ratos foram submetidos à LPVP e administração de veículo: NaCl; e (4) hipertensão portal + glutamina (LPVP + G) - os ratos foram submetidos à LPVP e administração de glutamina. As consequências da hipertensão portal, no intestino, foram determinadas por meio da avaliação dos segmentos de intestino delgado para o estresse oxidativo, através da lipoperoxidação, da atividade da enzima glutathione peroxidase, da expressão das enzimas eNOS e iNOS, além da análise das alterações histopatológicas após a LPVP.

**Resultados:** A lipoperoxidação da membrana foi mais expressiva no grupo de animais submetidos à LPVP ( $P < 0,01$ ). Entretanto, o grupo que recebeu a glutamina, mostrou níveis de lipoperoxidação, de forma similar aos grupos controles ( $P > 0,05$ ). O grupo submetido à LPVP apresentou mais alterações da mucosa, quando comparado ao grupo que recebeu a glutamina durante os 7 dias seguintes à LPVP e também aos grupos controles, porém, estes achados não obtiveram significância estatística ( $P > 0,05$ ). A atividade da enzima glutathione peroxidase estava diminuída no intestino de animais submetidos à LPVP, quando comparada a encontrada nos grupos controles sem a LPVP ( $P < 0,01$ ). Já o grupo que recebeu a glutamina, mostrou uma redução menor, comparada ao grupo de LPVP sem o

aminoácido. Este resultado também apresentou significância estatística ( $P < 0,05$ ). Este grupo foi semelhante aos grupos controles ( $P > 0,05$ ). A média da área, dosada através do método de imunistoquímica, da expressão da enzima eNOS para os grupos controles, foi similar. O grupo submetido à LPVP mostrou a maior área de concentração. O grupo LPVP + G foi o que teve a segunda maior área, porém com valores menores do que os encontrados no grupo do evento LPVP ( $P < 0,01$ ). Para a enzima iNOS, os grupos controles, com e sem a glutamina, mostraram áreas similares. O grupo da LPVP apresentou a maior área de expressão da enzima, seguido pelo grupo LPVP + G porém, esta área foi significativamente menor do que a do grupo submetido à LPVP sem a glutamina ( $P < 0,01$ ).

**Conclusões:** Estes resultados demonstram que, o tratamento com glutamina, previne a lesão da mucosa do intestino, após LPVP, em ratos.

**Palavras-chave:** Hipertensão portal. Glutamina. Lipoperoxidação. Glutathione peroxidase. Isoformas da óxido nítrico sintase.

## ABSTRACT

**Aims:** The aim of the present study was to evaluate possible preventative effects of glutamine in an animal model of PH induced by partial portal vein ligation (PPVL).

**Materials and methods:** Twenty four male Wistar rats were divided into four experimental groups: (1) control group (Control) – rats underwent exploratory laparotomy; (2) control + glutamine group (Control + G) – rats were subjected to laparotomy and treated intraperitoneally with glutamine; (3) portal hypertension group (PPVL) – rats were subjected to PPVL; and (4) PPVL+ glutamine group (PPVL + G) – rats were treated intraperitoneally with glutamine during seven days. Local injuries were determined by evaluating intestinal segments for oxidative stress using lipid peroxidation, the activity of glutathione peroxidase (GPx), eNOS and iNOS after PPVL.

**Results:** Lipid peroxidation of the membrane was increased in the animals subjected to PH ( $P < 0.01$ ). However, the group that received glutamine for seven days after the PPVL procedure showed levels of lipid peroxidation similar to the control groups ( $P > 0.05$ ). The activity of the antioxidant enzyme GTx was decreased in the gut of animals subjected to PH when compared with the control group of animals not subjected to PH ( $P < 0.01$ ). However, the group that received glutamine for seven days after the PPVL showed similar GTx activity to both control groups not subjected to PH ( $P > 0.05$ ). The mean area of eNOS staining for each of the control groups was similar. The PH group showed the largest area of staining for eNOS. The PPVL + G group had the second highest amount of staining, but the mean value was much lower than that of the PH group ( $P < 0.01$ ). For iNOS, control (SO) and control + G (SO + G) groups showed similar areas of staining. The PH group contained the largest area of iNOS staining, followed by the PPVL + G group; however, this area was significantly smaller than that of the group that underwent PH without glutamine ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions:** These results demonstrate that pretreatment with glutamine prevents mucosal injury and improves gut recovery after portal hypertension injury in rats.

**Keywords:** Portal Hypertension. Glutamine. Lipid peroxidation. Glutathione peroxidase. eNOS. iNOS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1: Sistema venoso portal.....	23
Figura 2: Causas da hipertensão portal.....	25
Figura 3: Dilatação vascular presente na HP.....	25
Figura 4: Formação de EROS e radicais livres.....	27
Figura 5: Reação que mostra a formação do NO.....	29
Figura 6: Esquema que mostra as isoformas da NO-sintase.....	30
Figura 7: Fórmula química da glutamina.....	34
Figura 8: Modelo de ligadura parcial da veia porta.....	42

## LISTA DE EQUAÇÕES

1. Equação da SOD .....	32
2. Equação da CAT .....	32
3. Equação da GSSG .....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lipoperoxidação (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)..	68
Tabela 2: Glutathione peroxidase .....	69
Tabela 3: Expressão imunoistoquímica da eNOS.....	70
Tabela 4: Expressão imunoistoquímica da iNOS.....	71
Tabela 5: Imagens digitais da expressão imunoistoquímica da eNOS. ....	72
Tabela 6: Imagens digitais da expressão imunoistoquímica da iNOS.....	73

## LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifostato
BOOP	Butil hidroperóxido
CAT	Catalase
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CEUA	Comitê de ética em pesquisa com animais
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX	Ciclooxigenase
DAO	Diamina oxidase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAO	Espécies ativas de oxigênio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROS	Éspecies reativas de oxigênio
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
FNT- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
GHP	Gastropatia da hipertensão portal
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona dissulfeto
GST	Glutaciona s-transferase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HO-1	Heme oxigenase 1
HP	Hipertensão portal
HSC	Células hepáticas humanas estreladas
HSL	Hospital São Lucas
IgA	Imunoglobulina A

IgG	Imunoglobulina G
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
LDBC	Ligadura do ducto biliar comum
LPO	Lipoperoxidação
LPVP	Ligadura parcial da veia porta
LSECs	Células endoteliais dos sinusóides hepáticos
MPO	Mieloperoxidase
MDA	Malandialdeído
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato desidrogenase
NaCl	Cloreto de sódio
NAS	Principles for Research Involving Animals
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrogênio
NPT	Nutrição parenteral total
ONOO	Peroxinitrito
OH	Hidroxila
OP	Fenilacetato
PBS	Solução tampão
PMSF	Fluoreto difenil metil sulfonina
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ROS	Radicais livres de oxigênio
SO	Grupo controle
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TIFF	True Image Format File
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XO	Xantina oxidase
XDH	Xantina desidrogenase

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
&	e
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
$\kappa$	kappa
$\mu$	micro
=	igual
<	menor
>	maior
$\Delta P$	gradiente de pressão
$^{\circ}C$	graus celsius
$Ca^{++}$	íon cálcio
cm	centímetro
$e^{-}$	elétron
E.P.	erro padrão
G	giga
GHz	giga hartz
g/Kg	grama/quilograma
h	hora
$H^{+}$	hidrogênio
$H_2O$	água
$H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
KCl	cloreto de potássio
$mm^2$	milímetro ao quadrado
$\mu m$	micrômetro
MB	megabites
mg	miligramas
mg/kg	miligramas/quilogramas
ml	mililitros
ml/min	mililitros/min

$\mu\text{m}$	micrômetro
$\mu\text{L}$	microlitros
$\text{mg/mL}$	miligramas/mililitros
$\text{mM}$	milimol
moles/mg	mois/miligramas
$\text{nm}$	nanômetro
$\text{nmol}$	nanomolar
$\text{n.}^\circ$	número
$\text{N}_2\text{O}_3$	trióxido de dinitrogênio
$\text{nmoles/mg}$	número de mois/miligrama
$\text{O}^2$	oxigênio
$\text{O}_2^\circ$	radical ânion superóxido
$\text{OH}^\circ$	radical hidroxila
$\text{pH}$	potencial do hidrogênio
$\text{Q}$	fluxo sanguíneo portal
$\text{R}$	resistência vascular
$\text{rpm}$	rotações por minuto
$\text{U}$	unidade
$\text{U/ml}$	unidade/mililitros
$\text{USOD/mg}$	unidade de SOD/miligrama
$\text{X}$	vezes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 CIRCULAÇÃO VENOSA PORTAL.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2 HIPERTENSÃO PORTAL.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 ALTERAÇÕES INTESTINAIS.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITRATIVO.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.2 ÓXIDO NÍTRICO.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....</b>	<b>32</b>
<b>1.5.2 ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>1.6 GLUTAMINA.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6.1 GLUTAMINA E ESTRESSE OXIDATIVO.....</b>	<b>35</b>
<b>1.6.1 GLUTAMINA E INTESTINO.....</b>	<b>36</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>3 HIPÓTESES.....</b>	<b>39</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 OBJETIVOS PRIMÁRIOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....</b>	<b>40</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 ANIMAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.1 DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE HIPERTENSÃO PORTAL PELA LIGADURA PARCIAL DA VEIA PORTA .....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.2 GLUTAMINA.....</b>	<b>43</b>
<b>5.4.3 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>43</b>
<b>5.5 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>44</b>
<b>5.5.1 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO.....</b>	<b>44</b>

5.5.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	44
5.6 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	44
5.6.1 DETERMINAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) .....	44
5.6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE.....	45
5.7 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS eNOS e iNOS.	46
5.7.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS CITOPLASMÁTICOS.....	46
5.7.2 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS.....	47
5.8 AVALIAÇÃO HISTOPLATOLÓGICA DOS TECIDOS.....	48
5.9 TAMANHO DA AMOSTRA.....	48
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
6 ÉTICA.....	50
7 RESULTADOS.....	51
7.1 ESTRESSE OXIDATIVO – LIPOPEROXIDAÇÃO – TBARS.....	51
7.2 ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GTx) .....	51
7.3 ATIVIDADE DA ENZIMA eNOS.....	52
7.4 ATIVIDADE DA ENZIMA iNOS.....	53
7.5 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	54
8 DISCUSSÃO.....	55
9 CONCLUSÕES.....	59
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
11 TABELAS.....	68
ANEXOS.....	74
ANEXO 1.....	75
ANEXO 2.....	76
ANEXO 3.....	77
ANEXO 4.....	78

## 1 INTRODUÇÃO

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

Esse aumento gradativo da pressão no sistema porta acarreta o desenvolvimento de vasos colaterais, no intuito de redistribuir o fluxo sanguíneo do sistema porta para a grande circulação<sup>2,3</sup>.

A dilatação dos vasos, principalmente no estômago e esôfago, leva a um quadro de gastropatia da hipertensão portal (GHP), caracterizado pela vasodilatação na submucosa gástrica<sup>3</sup>.

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

O intestino é um órgão de defesa imunológica, além de suas funções imprescindíveis no processo de digestão e absorção de nutrientes. A fisiologia intestinal, ainda, vincula um importante eixo com o sistema portal hepático, uma vez que todo o sangue proveniente desse local é conduzido ao fígado através da veia porta<sup>2</sup>.

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

O sangramento digestivo está presente em 80-90% dos pacientes com HP<sup>3</sup>, devido à progressiva dilatação dos vasos, que se rompem e levam à hemorragia<sup>2</sup>.

Esse alto índice de sangramento aponta a necessidade de estudarmos a fisiopatologia da HP, na tentativa de minimizarmos as consequências decorrentes dessa alteração hemodinâmica. O modelo de ligadura parcial da veia porta (LPVP) é o mais utilizado para estudar a hipertensão portal pré-hepática. Esse modelo foi desenvolvido por Sikuler em 1985, e diversos

estudos experimentais demonstraram que, em animais, a LPVP manifesta anormalidades equivalentes à HP em humanos<sup>4</sup>.

O estresse oxidativo é apontado como fator desencadeante para a progressão de diferentes doenças, inclusive na síndrome hemodinâmica da HP. Nesta entidade, está relacionado à evolução da circulação colateral<sup>5</sup>.

Dessa forma o uso da terapia antioxidante parece ser uma tentativa promissora para minimizar o quadro da HP<sup>6</sup>.

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma, com uma importante função em atenuar os processos inflamatórios intestinais, e atuar sobre os radicais livres de oxigênio<sup>7</sup>.

Esse antioxidante já foi utilizado previamente em trabalhos experimentais, com o modelo de hipertensão portal descrito por Sikuler<sup>4</sup>. Após a administração da glutamina, foram obtidos resultados satisfatórios na redução da circulação colateral hiperdinâmica, principalmente no estômago<sup>8</sup>.

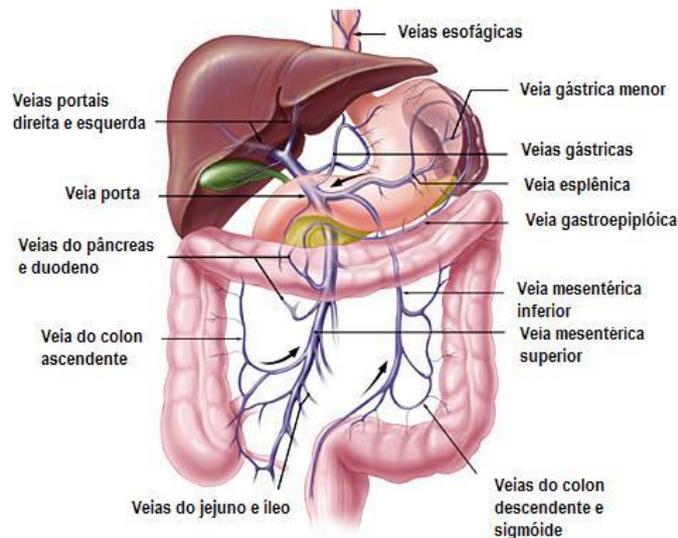
A reatividade endotelial desempenha um importante papel na fisiopatologia da HP. Recentemente, mudanças estruturais como o remodelamento vascular e a angiogênese foram identificadas nesse processo, sendo a primeira uma resposta adaptativa ao estresse de cisalhamento, ou seja, às forças aplicadas em sentidos opostos, mas na mesma direção e a segunda, promovida através da proliferação de células musculares lisas e endoteliais<sup>9</sup>.

No entanto, não existem estudos, na literatura, abordando o uso da glutamina como um fator de proteção relacionado às consequências da HP no intestino.

## **1.1 CIRCULAÇÃO VENOSA PORTAL**

A circulação venosa portal engloba todas as veias que transportam sangue da região intra-abdominal do tubo digestivo, baço, pâncreas e vesícula biliar em direção ao fígado<sup>1</sup>. O sangue venoso proveniente destas regiões, chega ao fígado através da veia porta formada anatomicamente pela união da veia mesentérica superior e esplênica<sup>10</sup>.

A organização desse sistema permite que todo o sangue venoso, com drenagem 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 centro-lobulares, que drenam para as veias hepáticas e essas, por sua vez, para a veia cava inferior, desembocando na aurícula direita e, após, na grande circulação<sup>2</sup>.



**Figura 1:** Sistema venoso portal.

**Fonte:** adaptada<sup>11</sup>.

O sangue direcionado ao fígado representa cerca de 25% do débito cardíaco (cerca de 1.200 ml/min), sendo esse alto volume sanguíneo necessário para que o fígado realize suas funções de principal órgão regulador da homeostase metabólica e filtro de toxinas e de microrganismos provenientes da absorção intestinal<sup>2</sup>.

O fluxo venoso no sistema porta é caracterizado por uma baixa resistência, alto fluxo e baixa pressão. Qualquer alteração homeostática nesse sistema, desencadeada principalmente em virtude de uma obstrução ao fluxo sanguíneo, acarretará no aumento de pressão no sistema portal levando a graves consequências e ao quadro denominado de hipertensão portal<sup>2</sup>. Esse quadro é caracterizado por um aumento da resistência vascular e/ou fluxo sanguíneo no sistema portal, que acarreta em um aumento da pressão e consequente desenvolvimento de colaterais porto-sistêmicos, que

desviam o sangue desse sistema obstruído diretamente para a circulação sistêmica, contornando o fígado<sup>9</sup>.

## 1.2 HIPERTENSÃO PORTAL

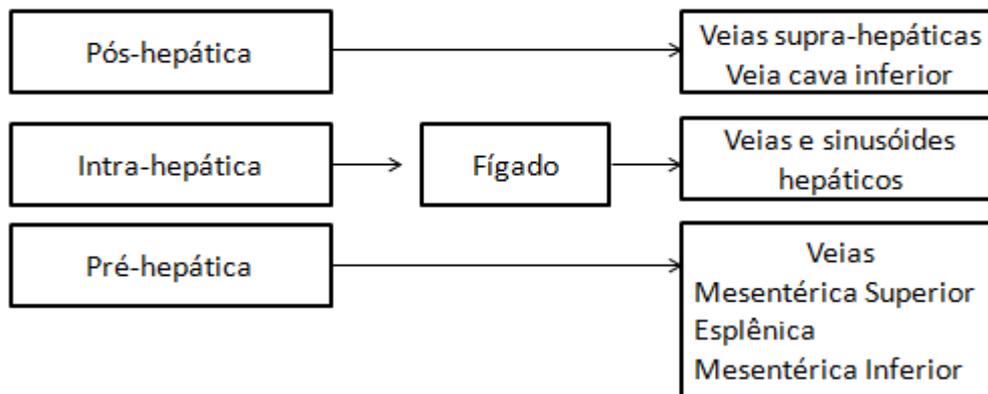
A HP é uma síndrome hemodinâmica caracterizada pelo aumento do gradiente de pressão portal, que é definido pela diferença de pressão entre a veia porta e a veia cava inferior<sup>2</sup>.

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

Dentre esses parâmetros, o aumento da resistência vascular é considerado o mecanismo inicial na gênese da hipertensão portal. Tal distúrbio é desencadeado devido ao surgimento de um obstáculo anatômico, que pode ocorrer em qualquer nível do sistema venoso portal<sup>10</sup>.

A síndrome da HP é apontada como a principal causa de mortalidade entre pacientes cirróticos. Nesse caso, o aumento da resistência é decorrente da fibrose tecidual e da regeneração nodular, que alteram a arquitetura hepática<sup>12</sup>.

No entanto, a HP não é apenas uma consequência da cirrose, podendo ter diferentes etiologias. De acordo com a localização do obstáculo anatômico, as causas da HP podem ser classificadas em pré-hepática (trombose da veia porta ou esplênica); intra-hepática (cirrose) e pós-hepática (síndrome de Budd-Chiari)<sup>13</sup>.



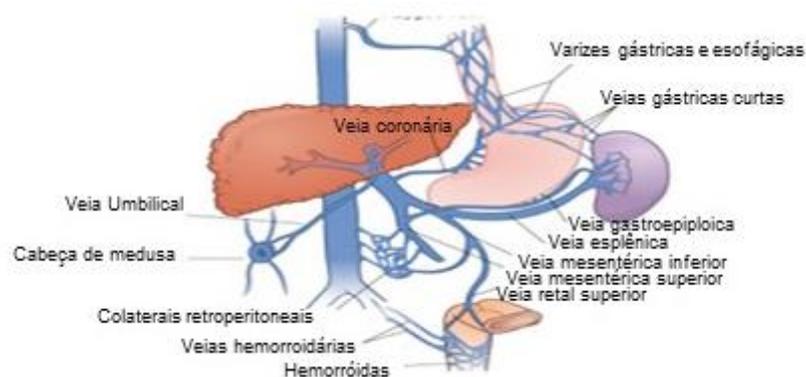
**Figura 2:** Causas da hipertensão portal.

**Fonte:** adaptada<sup>1</sup>.

O aumento progressivo da pressão no sistema porta leva à dilatação dos vasos, com conseqüente formação de colaterais porto-sistêmicos, que desviam o sangue proveniente do sistema portal diretamente para a circulação sistêmica, contornando o fígado<sup>2</sup>. O surgimento dessas varizes pode ocorrer em qualquer segmento do tubo digestivo.

### 1.3 ALTERAÇÕES INTESTINAIS

Dentre os locais suscetíveis à dilatação vascular conseqüente à HP, o estômago, esôfago, a parede abdominal anterior, veia renal esquerda e submucosa do reto são considerados os mais frequentes<sup>2</sup>.



**Figura 3:** Dilatação vascular presente na HP.

**Fonte:** adaptada<sup>14</sup>.

Quando nos referimos aos danos os quais o intestino é acometido na HP, podemos correlacionar estes ao aumento progressivo da pressão no sistema portal, bem como à hipóxia intestinal decorrente desse desarranjo hemodinâmico<sup>2</sup>.

A circulação êntero-hepática traduz uma possibilidade de translocação bacteriana. Da mesma forma que os nutrientes e o aporte sanguíneo intestinal percorrem esse trajeto, a possibilidade de que bactérias presentes na microbiota intestinal sejam direcionadas ao fígado não pode ser desconsiderada<sup>9</sup>.

Em uma situação não fisiológica, a homeostasia desse sistema pode ser perturbada. No caso da HP, o quadro de infecção ou sepse está diretamente associado com o aumento da permeabilidade intestinal. O desenvolvimento do quadro de circulação hiperdinâmica pode acarretar mudanças estruturais na parede intestinal, bem como o surgimento de infecções bacterianas espontâneas e sepse<sup>2</sup>.

A HP, isolada ou consequência de doença hepática, leva a severas alterações também na perfusão intestinal. O aumento da resistência vascular esplâncnica e do fluxo venoso leva a uma congestão no sistema portal, acarretando uma hipoperfusão intermitente intestinal. O dano oxidativo na integridade da mucosa intestinal em virtude do aumento da conversão da enzima xantina desidrogenase (XD) em xantina oxidase (XO) é frequente, contribuindo para o quadro de estresse oxidativo característico da HP<sup>9,15,16</sup>.

Da mesma forma, o aumento da produção de óxido nítrico (NO) nesta circulação hiperdinâmica, devido ao estresse de cisalhamento é diretamente correlacionado com o estresse nitrativo<sup>17</sup>.

## **1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITRATIVO**

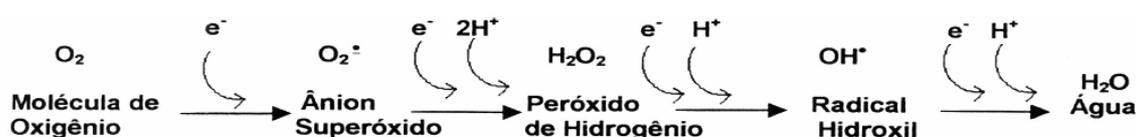
### **1.4.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES**

O oxigênio ( $O_2$ ) é um elemento essencial à vida aeróbica. No entanto, em determinadas situações, é também potencialmente tóxico para as células<sup>18,19</sup>.

A molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um bi-radical 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<sup>20</sup>.

Nos organismos aeróbicos, o  $O_2$  é reduzido à água ( $H_2O$ ) no final da respiração mitocondrial. Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do  $O_2$ , gerando o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Ao se adicionar um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Assim, a formação de EROs deve-se ao fato de o  $O_2$  se reduzir à água de forma monovalente, permitindo a geração de metabólitos intermediários durante o processo<sup>19</sup>.



**Figura 4:** Formação de EROs e radicais livres.

**Fonte:** adaptada<sup>21</sup>.

Os intermediários gerados durante a redução parcial do oxigênio são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o “oxigênio singlet” ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Essas moléculas são capazes de existir independentemente, e são denominadas EROs<sup>22</sup>.

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<sup>23</sup>.

Podemos citar como radicais livres o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) 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<sup>23</sup>.

O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento das EROs em relação aos seus níveis fisiológicos, levando a um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Esse desequilíbrio apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Assim, está relacionado a várias doenças, como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, doenças do fígado, diabetes mellitus, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral<sup>15,16,20</sup>.

Na HP, o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica foi proposto, inicialmente, por Fernando *et al.*, em 1998, utilizando o modelo experimental de ligadura parcial da veia porta descrito por Sikuler. Sendo a HP uma doença relacionada ao estresse oxidativo, a possibilidade de dano ao DNA, neste modelo experimental, é plausível<sup>24</sup>.

Estudos anteriores demonstraram que o óxido nítrico parece exercer um papel importante na patogênese da HP<sup>17,25</sup>, bem como elevados níveis do

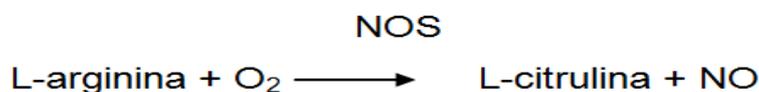
fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), ambos estando relacionados ao dano oxidativo<sup>26</sup>.

### 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<sup>27</sup>.

Essa molécula pode atuar como oxidante ou redutor, é rapidamente destruída pelo oxigênio, sendo que sua oxidação produz nitritos e nitratos, e também pode reagir facilmente com o radical superóxido ou metais como ferro, cobalto, manganês ou cobre<sup>27</sup>.

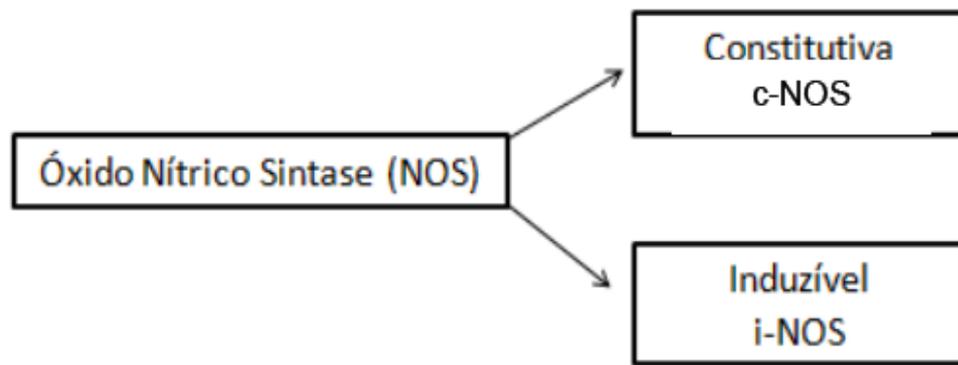
A síntese do NO é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS); para tanto, ocorre a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e óxido nítrico<sup>28</sup>.



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

Fonte: adaptada<sup>29</sup>.

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 (cNOS) e NOS induzível (iNOS), diferindo em relação ao peso molecular, forma de ativação e capacidade de síntese de NO<sup>29</sup>.



**Figura 6:** Esquema que mostra as isoformas da NO-sintase.  
Fonte: adaptada<sup>30</sup>.

Na categoria da NOS constitutiva, encontramos a NOS neuronal (nNOS), normalmente presente nos neurônios e a NOS endotelial (eNOS), presente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas. Ambas são expressas continuamente na ausência de agentes indutores, ou seja, apresentam uma concentração basal e são dependentes de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e calmodulina, proteína que se liga ao cálcio<sup>31</sup>.

No entanto, na categoria da NOS induzível, ao contrário da primeira, a iNOS não é detectada em condições basais, requerendo, para sua expressão e atividade, síntese proteica. Endotoxinas bacterianas, juntamente com citocinas como  $\text{TNF-}\alpha$ , interleucinas ( $\text{IL-1}\beta$ ) ou imunoglobulinas (IG-g), induzem a sua síntese nas 2-4 primeiras horas após a exposição a um agente, e esta pode ficar ativa por até 20 horas posteriores a sua síntese<sup>28</sup>.

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<sup>32,33</sup>.

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<sup>33,34</sup>.

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<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ou peroxinitrito (ONOO), o NO passa a agir como espécie ativa de nitrogênio, responsável por inúmeras ações citotóxicas em um quadro conhecido como estresse nitrosativo<sup>32</sup>.

A HP já foi previamente associada ao estresse oxidativo e à super-produção de NO, ambos possuindo um importante papel nesse distúrbio hemodinâmico<sup>33,35</sup>.

Kanwar *et al.*, 1996 demonstraram um aumento na atividade da NOS dependente de cálcio após estenose da veia porta<sup>34</sup>. 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 HP<sup>34</sup>.

Dessa forma, observamos na HP uma alta concentração de NO, estando esse aumento intimamente relacionado com o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica e estresse oxidativo<sup>35</sup>.

## **1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES**

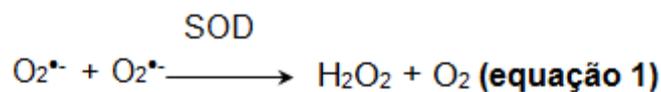
Para a obtenção de proteção contra os danos acarretados pelo estresse oxidativo, é necessário que exista um sistema capaz de prevenir a formação de radicais livres e neutralizar os danos oxidativos, o que é feito através dos antioxidantes, que podem ser definidos como qualquer substância que, quando 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<sup>36</sup>. Dentre esses sistemas de defesa, encontramos o enzimático, formado por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase

(GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione s-transferase (GST), e/ou não enzimático, como o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), flavonóides e  $\beta$ -carotenos<sup>6,37</sup>.

### 1.5.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

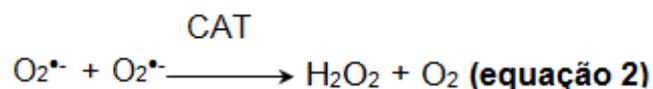
Os antioxidantes enzimáticos compreendem agentes que cataliticamente removem os radicais livres e outras espécies ativas. Dentre essas enzimas, podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx)<sup>38</sup>.

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)<sup>39</sup>.



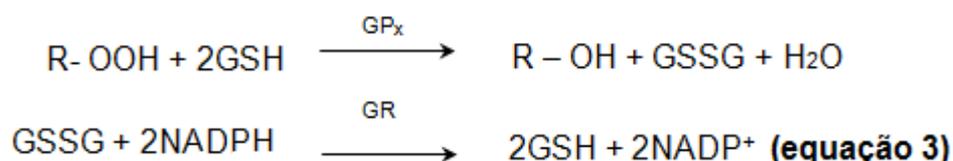
O  $H_2O_2$  formado pela ação da enzima SOD, apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando radical hidroxila. Assim, a remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos<sup>39</sup>.

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<sup>36</sup>.



Entre as peroxidases, destaca-se a enzima glutathione peroxidase (GPx), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos através da oxidação da glutathione reduzida (GSH), que será, por sua vez, regenerada por ação da glutathione 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)<sup>22</sup> (equação 3).



Assim como as enzimas que atuam removendo os radicais livres, existem substâncias com propriedades antioxidantes, capazes de evitar reações oxidativas em cadeia, como a lipoperoxidação (LPO), conhecidas como defesas antioxidantes não-enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutathiona, o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), os  $\beta$ -carotenos e os flavonóides<sup>40,41,42,43,44</sup>.

### 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  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina, cuja ação deve-se à presença de um grupamento sulfidrilas, que atua como doador de elétrons<sup>23</sup>.

O ácido ascórbico (vitamina C) é um composto hidrossolúvel que atua como co-substrato na biossíntese de colágeno, catecolaminas e carnitina. Este composto atua como removedor de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{OH}^{\cdot-}$ , ou seja, um antioxidante varredor de radicais livres<sup>23</sup>.

O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) possui a capacidade de neutralizar radicais, absorvendo a sua energia de excitação. A vitamina E age principalmente com a molécula de oxigênio, em concentrações baixas e com alta afinidade à luz<sup>43</sup>.

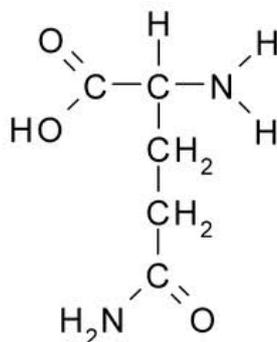
Os flavonóides são fitoterápicos descritos como antioxidantes, presentes nas folhas e partes externas das plantas. Muitos desses

compostos estão sendo estudados e vêm apresentando resultados bastante promissores. Estudos com o flavonóide quercetina, mostraram bons resultados em modelos experimentais de cirrose induzida por ligadura de ducto biliar<sup>43</sup> e tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>)<sup>40</sup>, bem como em modelo de diabetes induzida por streptozotocina<sup>44</sup>.

O uso de substâncias antioxidantes, como as citadas acima, 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<sup>45</sup>.

## 1.6 GLUTAMINA

Inúmeras substâncias, como por exemplo, a glutamina, vêm sendo utilizadas no tratamento e/ou na prevenção de colites experimentais. Os experimentos visam à avaliação de novas drogas sobre o processo inflamatório ou associação de drogas para obtenção de melhores resultados<sup>46</sup>. Para a prevenção, utilizam-se substâncias para inibir ou minimizar o processo inflamatório frente a agentes agressores. Uma das substâncias utilizadas é a glutamina. A glutamina é um aminoácido polar sem carga não essencial ou ocasionalmente essencial, hidrofílico encontrado na superfície das proteínas onde interage com a água<sup>47</sup>.



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

**Fonte:** adaptada<sup>48</sup>.

Esta substância foi inicialmente utilizada de forma profilática em pacientes a serem submetidos à radioterapia, onde se observou uma diminuição da incidência e da gravidade da enterite actínica<sup>49</sup>. Observou-se também que a glutamina apresenta um papel fundamental na defesa imunológica da barreira mucosa do intestino através da sua participação na formação de imunoglobulinas, especialmente IgA<sup>15,47</sup>. Foi demonstrado que a glutamina diminui os efeitos inflamatórios da enterocolite induzida por metotrexato e que diminui a translocação bacteriana em animais com sepse abdominal<sup>50</sup>. Este aminoácido age sobre a atividade dos macrófagos interferindo na fagocitose em sítios inflamatórios. Além de efeitos protetores diretos como os citados acima, a glutamina tem uma importante função em processos inflamatórios intestinais atuando sobre os radicais livres de oxigênio. Welbourne & Miers (1998) demonstraram que a glutamina, na presença de inflamação, aumenta o fluxo de glutamina no fígado e no trato gastrointestinal<sup>51,52</sup>.

### **1.6.1 GLUTAMINA E ESTRESSE OXIDATIVO**

A glutamina é um aminoácido multifuncional usado para a síntese hepática de uréia, amoniogênese renal, gliconeogênese e como o principal combustível respiratório para muitas células. Concentrações baixas de glutamina são encontradas durante estresse catabólico e estão associadas à suscetibilidade à infecções. A glutamina não é somente uma importante fonte de energia para a mitocôndria, mas é também a precursora do neurotransmissor cerebral glutamato. Este, por sua vez, é utilizado na síntese do antioxidante glutathione. A glutamina é, portanto, vital na regulação do equilíbrio oxidativo intracelular<sup>8</sup>.

A glutamina é mais extensamente investigada na sua relação com o estresse oxidativo no exercício físico. Rogero (2003) demonstrou que no exercício físico exaustivo ocorre uma diminuição importante da glutamina plasmática<sup>53</sup>. Esta diminuição é acompanhada de um aumento significativo da atividade inflamatória e dos níveis de estresse oxidativo medido através

da taxa de lipoperoxidação. Observou-se uma relação linear entre a diminuição da glutamina plasmática e o aumento da leucocitose em indivíduos submetidos a exercícios intensos e exaustivos. As medidas de lipoperoxidação pela técnica de quimiluminescência no músculo de animais submetidos a exercícios físicos diários mostraram valores superiores aos de grupos tratados previamente com glutamina. A glutamina é requerida para síntese de glutathione, visto que é metabolizada no ciclo  $\gamma$ -glutamil para produção de glutathione. A glutathione é produzida a partir de glutamato, glicina e cisteína<sup>8</sup>. A glutathione está presente nas células tanto na forma oxidada quanto na forma reduzida. A adição de glutamina em células *in vitro* pode conduzir a um aumento na concentração de glutathione total.

A glutamina tem sido utilizada como suplemento nutricional em pacientes gravemente debilitados com o intuito de diminuir o efeito deletério do estresse oxidativo no seu prognóstico<sup>54</sup>. Já foi bem demonstrado que a prevenção do estresse oxidativo em pacientes graves, politraumatizados ou submetidos a grandes cirurgias é benéfico como adjuvante na terapia específica de cada paciente<sup>54</sup>. A terapia antioxidante melhora o prognóstico e diminui o índice global de complicações em pacientes graves<sup>55</sup>.

Observações clínicas demonstram que pacientes que recebiam suplementação dietética de glutamina toleravam melhor as colites secundárias à radioterapia para neoplasias de próstata e colo do útero<sup>49</sup>. A mesma substância foi então utilizada em pacientes portadores de Doença de Crohn (enterocolite granulomatosa) e retocolite ulcerativa. Nestes pacientes, observou-se uma melhora do quadro clínico com diminuição da diarreia, aumento na taxa de cicatrização de fístulas e diminuição no uso de medicações<sup>56</sup>.

Uma vez que ficou demonstrada a importância das espécies ativas de oxigênio na gênese da colite, passou-se a procurar a relação entre o estresse oxidativo e o suposto efeito clínico benéfico da glutamina nas colites<sup>56</sup>.

## 1.6.2 GLUTAMINA E INTESTINO

A glutamina é um aminoácido multifuncional e também a mais importante fonte de energia para as células que se dividem rapidamente, como os enterócitos, colonócitos, células imunológicas, como linfócitos T e B, além dos macrófagos<sup>57</sup>. Também é o precursor da síntese de nucleotídeos, além da glutatona, importante antioxidante do sistema de defesa. Ela preserva os níveis deste antioxidante em situações de isquemia e reperfusão, além de diminuir os índices de translocação bacteriana<sup>58</sup>.

Entretanto, ainda não se sabe se a glutamina atua como fator de proteção contra o estresse oxidativo no intestino.

## 2 JUSTIFICATIVA

A HP é uma síndrome clínica que também está relacionada ao estresse oxidativo<sup>24</sup>, dessa forma, o uso de agentes antioxidantes no tratamento desta doença parece promissor. Tal tratamento teria o objetivo de minimizar as consequências acarretadas pelo gradativo aumento de pressão no sistema porta, favorecendo a qualidade de vida dos pacientes portadores desta doença e diminuindo a alta taxa de mortalidade atualmente registrada.

Este estudo foi elaborado com o intuito de contribuir com a elucidação dos mecanismos de ação da ocorrência de alterações intestinais consequentes à HP, levando a um quadro de estresse oxidativo, demonstrado através da lipoperoxidação da membrana, pelo consumo de enzimas antioxidantes, além da presença de isoformas do óxido nítrico, em ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de LPVP. E talvez, poder contribuir com o benefício do uso de um fator de proteção, para este evento.

Até o presente momento, não foram encontrados artigos, na literatura, que descrevam o papel da glutamina no estresse oxidativo do intestino em animais submetidos ao modelo experimental de LPVP, caracterizando o ineditismo do projeto.

Neste viés, é relevante esclarecer que o ineditismo do projeto justificou a oportunidade, a necessidade e a urgência de desenvolver um estudo como este, enfatizando, igualmente, sua importância científica.

### **3 HIPÓTESES**

Existem alterações intestinais na síndrome da HP pré-hepática. A glutamina é um fator de proteção no estresse oxidativo do intestino em animais submetidos ao modelo experimental de LPVP, em virtude de suas características antioxidantes.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVOS PRIMÁRIOS**

Avaliar a ação da glutamina, como agente antioxidante, em ratos Wistar com HP, submetidos a modelo experimental de LPVP.

### **4.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

1. Determinar a lipoperoxidação no intestino através da técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico);
2. Avaliar a atividade de uma enzima antioxidante (glutathione peroxidase) no intestino;
3. Avaliar as alterações histopatológicas no intestino;
4. Quantificar a expressão das enzimas eNOS e iNOS, no intestino, por imunohistoquímica.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA**

Trata-se de um estudo experimental controlado, randomizado, em animais. Para isso, foi realizada a indução da hipertensão portal, por LPVP.

Os resultados foram comparados aos dos animais controle não submetidos à LPVP e também aos animais que receberam uma substância potencialmente protetora (glutamina).

### **5.2 ANIMAIS**

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar, com peso entre 250 e 350 gramas, provenientes da Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde (FEPPS-RS). Os animais foram mantidos neste local, durante o experimento, em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C. A água e a ração são administradas *ad libitum*.

Os protocolos desta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA) da PUCRS registro 5985/14.

### **5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de seis, escolhidos através de sorteio.

- Grupo 1: Controle (Grupo submetido à simulação da cirurgia, e administração de veículo: NaCl)
- Grupo 2: Glutamina (Grupo submetido à simulação da cirurgia, e administração da glutamina)

- Grupo 3: Hipertensão portal (Grupo submetido à LPVP e administração de veículo: NaCl)

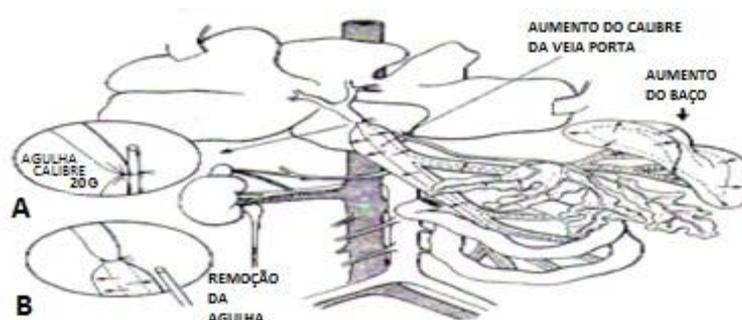
- Grupo 4: Hipertensão portal + glutamina (Grupo submetido à LPVP e administração de glutamina)

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

## 5.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.4.1 DESENVOLVIMENTO DO MODELO DE HIPERTENSÃO PORTAL PELA LIGADURA PARCIAL DA 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 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, foi necessário certificar-se da ocorrência de trombose da veia porta durante sua manipulação, através da palpação da mesma<sup>4</sup>.



**Figura 8:** Modelo de ligadura parcial da veia porta.  
**Fonte:** adaptada<sup>4</sup>.

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

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

Após a cirurgia de ligadura parcial da veia porta, os animais receberam o tratamento com a glutamina, ou solução fisiológica, dependendo o grupo.

#### **5.4.2 Glutamina**

A glutamina foi administrada, no 8º dia após a cirurgia, por via intraperitoneal, na dose 0,75 g/kg, durante 7 dias<sup>23</sup>. Os animais controle receberam o veículo (solução fisiológica – NaCl 0,9%) no volume de 0,6 ml, pelo mesmo período.

#### **5.4.3 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Após os procedimentos de aferição, foi retirado um segmento do intestino delgado.

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

2º) O restante foi pesado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as posteriores análises.

Ao final do experimento, no 15º dia após a cirurgia, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito em *Principles for Research Involving Animals* (NAS)<sup>59</sup>.

Os corpos dos animais foram acondicionados em embalagens específicas para descarte e mantidos em freezer até sua incineração realizada pelo setor responsável.

## **5.5 Avaliações bioquímicas**

### **5.5.1 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO**

Após serem retirados, os intestinos foram pesados e armazenados em freezer -80°C. Posteriormente, foram homogeneizados durante 1 minuto em Ultra-Turrax (IKA-WERK), na presença de cloreto de potássio (KCl) 1,15% (5 mL por g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonina (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (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 seria 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<sup>60</sup>.

### **5.5.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA**

A concentração de proteínas nos homogeneizados 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 da enzimas antioxidante<sup>61</sup>.

## **5.6 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

### **5.6.1 DETERMINAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUE REAGEM AO ÁCIDO**

#### **TIOBARBITÚRICO (TBARS)**

A lipoperoxidação foi determinada através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A técnica de TBARS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico

e conseqüente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535 nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondialdeído (MDA) e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

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

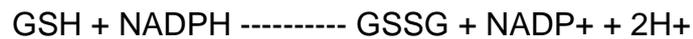
### 5.6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE

A determinação da glutathione peroxidase selênio dependente, mediante o método de Guntzler e Flohé<sup>63</sup>, consiste em medir a velocidade de consumo do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato desidrogenase) em um sistema que contenha GSH, sendo que a oxidação se registra espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm. Então:

GPx



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



Essa técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo a velocidade de oxidação do NADPH em uma reação.

Para tal, em uma cubeta de quartzo foram colocados 2,7mL de solução reguladora de fosfatos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (100 mM, pH 7,0) com 50 µL de NADPH (10mM), 150 µL de BOOH ( ) (10mM) e 50 µL de glutathione redutase (12 U/mL). A mistura foi lida durante 1 minuto, quando identificou-se uma linha de base e em seguida foram adicionados 50 µL de GSH (100mM) e 50µL do homogeneizado. As amostras foram incubadas a 25°C durante 5 minutos, e lidas numa absorvância de 340 nm. A atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína<sup>63</sup>.

## **5.7 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS eNOS e iNOS**

### **5.7.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS CITOPLASMÁTICOS**

Para o preparo das lâminas e posterior análise imunoistoquímica, foram feitas secções de 3 µm de espessura, obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas tratadas, inicialmente, com Histogrip (Zymed, USA) e levados à estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes foram des-parafinizados por incubação em xileno por 10 minutos por três vezes, seguido da reidratação dos cortes em sequência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%, 80% e 70% por 3 minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada.

A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura, foi realizada em plataforma pTLINK (DAKO) por 40 minutos a 98°C, com a solução Envision Flex solução

de recuperação antigênica, pH alto (DAKO). Logo após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH 7.2.

Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade através da estação de imunocoloração Sequenza (Thermo Shandon, USA) 2h em temperatura ambiente e diluídos em solução de diluição (*Antibody Diluent with background reducing componentes*, Dako, USA) para os seguintes anticorpos: Anti-eNos (Thermo Scientific, PA3-031A,USA) 1:800, Anti-iNOS (Thermo Scientific PA5-16855,USA) 1:800. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por três passagens de tampão PBS, pH 7.2. Para amplificação da reação antígeno-anticorpo utilizou-se para anti-eNOS o sistema Envision Flex HRP (Dako, USA) utilizado de acordo com as recomendações do fabricante . A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH 7.2 e incubadas com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, USA) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, seguido de lavagem em água corrente, até a remoção completa do corante, e incubadas em uma solução de amônia 37 mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos) e, após, dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio sintético Entellan (Merck, Alemanha)<sup>45,64,65</sup>.

### 5.7.2 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS

Foi utilizado um sistema de análise digital composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (Oberkochen, Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de uma videocâmera Retiga 2000R color (Canadá) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture Kit (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Para a análise digital das imagens, foi utilizado

o programa Image Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, EUA), que permite a captura digital da imagem e marcação e contagem da área de interesse. As imagens foram capturadas no formato TIFF (*True Image Format File*) sem compressão, pelo mesmo examinador, com uma intensidade de luz padrão para todas as fotos. A captura das imagens foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS. Foram capturadas imagens, de pelo menos dez campos aleatórios, não sobrepostos, de cada lâmina histológica, com magnificação de 200X (44 pixel = 1  $\mu\text{m}$ ). As lâminas com positividade focal para os marcadores tiveram os campos selecionados pelo método de *hot spot*. O tamanho médio das biópsias, realizadas por agulha, variou entre 2 e 4  $\text{mm}^2$ . A seleção de cores foi realizada de forma interativa através da concordância ente dois observadores treinados e, após, aplicada à leitura de todas as amostras pelo sistema de análise de imagens digital automatizado. A área inicial considerada foi 0,01 cm.

## **5.8 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS**

Para a dissecação anatômica, os tecidos foram colocados em bouin por 12 horas, e após em formol 10%. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótopo (Leitz<sup>®</sup>1512) e realizados cortes com 3 micra (3 $\mu$ ). Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante 5 minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente. Na fase de desidratação, as estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina utilizando-se Bálsamo do Canadá, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular *Nikon Labophot* nos diferentes aumentos, no serviço de patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, por um patologista cegado para o experimento.

## **5.9 TAMANHO DA AMOSTRA**

Para detectar uma diferença entre as médias dos grupos, de magnitude de 2 desvios-padrão, estimou-se que seriam necessários 6 ratos por grupo, para um nível de significância de  $\alpha=0,05$  e poder estatístico  $(1-\beta)=0,90$ . Deste modo, considerando os 4 grupos experimentais, o tamanho total da amostra foi de 24 ratos.

Durante o período de pós-operatório, ocorreu a morte de um animal, do grupo de LPVP, portanto os grupos controle, glutamina e LPVP + G ficaram com 6 animais, ao passo que o grupo da LPVP, ficou com 5.

### **5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados quantitativos foram inicialmente descritos por média e erro-padrão. Para comparação dos grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA ONEWAY), seguida pelo teste de Post hoc de SNK (Student-Newman-keuls).

O nível de significância para o experimento foi de  $\alpha=0,05$ . Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS versão 22.0.

## **6 ÉTICA**

Os procedimentos com os animais foram feitos de acordo com aqueles preconizados pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela resolução normativa 04/97<sup>59</sup>.